

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

ФЕДОРОВ СТАНІСЛАВ ВІТАЛІЙОВИЧ

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

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТАБОЛІЗМУ СУЛЬФУРВМІСНИХ СПОЛУК
В ЕРИТРОЦИТАХ ЛЮДИНИ

Спеціальність 091 Біологія

Кваліфікаційна (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)

Вінниця 2022

Федоров С.В. Дослідження метаболізму сульфурвмісних сполук в еритроцитах людини. Спеціальність 091 «Біологія». Освітня програма «Біологія». Донецький національний університет імені Василя Стуса, Вінниця, 2022.

Досліджено вплив H_2O_2 та метіоніну на стан цитоплазматичної та мембранозв'язаної фракцій 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.

Fedorov S.V. Research of the metabolism of sulfur-containing compounds in human erythrocytes. Specialty 091 «Biology». Educational program «Biology». Vasyl Stus Donetsk National University, Vinnytsia, 2022.

The influence of H_2O_2 and methionine on the state of the cytoplasmic and membrane-bound hemoglobin fractions of human erythrocytes was studied. It was shown that methionine significantly affects on distribution and quantitative ratio of the ligand forms of hemoglobin in the membrane-bound fraction under conditions of peroxide load. An increase in the concentration of methionine leads to accumulation of met- and deoxy-forms of hemoglobin in the membrane-bound fraction. The obtained results indicate the involvement of hemoglobin in metabolic processes involving methionine, in particular, in the interaction with hydrogen sulfide.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ I ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Гемоглобін.....	7
1.1.1 Особливості цитоплазматичної, мембранозв'язаної фракцій.....	7
1.1.2 Особливості лігандних форм гемоглобіну.....	9
1.2 Сірководень (H ₂ S). Його роль в метаболізмі еритроцитів.....	15
1.3 Роль циклів метіоніну та глутатіону в метаболізмі еритроцитів.....	21
РОЗДІЛ II МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	26
2.1 Матеріали дослідження.....	26
2.2 Умови проведення експерименту.....	27
2.3 Аналіз цитоплазматичної та мембранозв'язаної фракцій гемоглобіну..	30
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ, ОБГОВОРЕННЯ.....	34
3.1 Результати аналізу розподілу лігандних форм гемоглобіну еритроцитів людини, інкубованих в середовищі H ₂ O ₂ і метіоніну.....	34
3.1.1 Вплив перекису водню на розподіл форм гемоглобіну.....	34
3.1.2 Вплив метіоніну на розподіл форм гемоглобіну.....	36
3.1.3 Вплив поєднаного впливу перекису водню та метіоніну на розподіл форм гемоглобіну.....	38
3.1.4 Вплив умов інкубування еритроцитів на кількість гемоглобіну мембранозв'язаної фракції.....	43
3.2 Обговорення.....	44
ВИСНОВКИ.....	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ТА ЛІТЕРАТУРИ.....	53

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

AdoMet (SAM)	S-аденозил-L-метіонін (S-Adenosyl methionine).
CBS	цистатіонін β-синтаза (cystathionine beta-synthase).
DeoxyHb	дезоксигемоглобін (Deoxyhemoglobin).
GSH	глутатіон (Glutathione).
Hb	гемоглобін (hemoglobin).
HbCO	карбоксигемоглобін (Carboxyhemoglobin).
Hemi	геміхром (Hemichrome).
MetHb	метгемоглобін (Methemoglobin).
OxyHb	оксигемоглобін (Oxyhemoglobin).
SHb	сульфгемоглобін (Sulfhemoglobin).
Met	метіонін (Methionine).

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. Еритроцити – незамінний елемент для підтримки функціонування та гомеостазу організму – єдині клітини, які здатні проводити транспортування кисню та двоокису вуглецю, тим самим вони забезпечують енергетичне живлення організму [1]. Хоча основна функція та загальні особливості структури еритроцитів добре відомі, тим не менш залишається чимало питань стосовно їх метаболічної мережі, яка має підтримувати діяльність еритроцитів протягом близько 120 діб, враховуючи те, що ці клітини через специфіку свого біологічного призначення, позбавлені майже всіх органел, які притаманні іншим клітинам людського організму [2].

Актуальним на сьогодні питанням є встановлення метаболічних процесів, які дозволяють еритроцитам адаптуватися та виживати за різних стресових умов. Частою проблемою є вплив вільних радикалів – молекул з високою окислювальною здатністю, які здатні нанести суттєвої шкоди червоним клітинам крові, існування яких побудоване здебільшого на автономних ферментативних процесах, які позбавлені підтримки органелами [3, 4].

Для аналізу та лікування еритроцитарних патологій, що викликаються радикалами, а також для успішного використання еритроцитів у медицині (зберігання та переливання крові наприклад), важливим є повноцінне розуміння всіх процесів метаболізму еритроцитів: як функціонують енергетичні процеси, антиоксидантний захист, метаболічне забезпечення, транспортування речовин, як це пов'язується з гемоглобіном – найважливішого в функціональному плані білка еритроцитів.

Метою дослідження є встановлення біохімічних та фізіологічних зв'язків між розподілом форм гемоглобіну цитоплазматичної та мембранозв'язаної фракцій та метаболічним шляхом метіоніну в еритроцитах, які знаходяться в умовах окисного стресу.

Завдання дослідження: провести спектрофотометричний аналіз цитоплазматичної та мембранозв'язаної фракції гемоглобіну еритроцитів, які інкубувалися в 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: цитоплазматичний та мембранозв'язаний гемоглобін.

Методами дослідження ми обрали аналіз кількісного розподілу лігандних форм гемоглобіну, які були зареєстровані за допомоги спектрофотометрії. Для цього ми попередньо інкубували еритроцити в різних умовах: градієнту окисного навантаження, метіоніну, чи їх об'єднаної дії.

Наукова новизна дослідження: ми встановили, 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.

Структура роботи. Робота обсягом у 60 сторінок складається з трьох основних розділів. В першому розділі проведено огляд літературних джерел, які дозволили побудувати змістовне підґрунтя для проведеного дослідження. В другому розділі описані матеріали, обладнання, а також методи, які використовувалися під час дослідження. В третьому розділі наводяться отримані результати, їх опис та тлумачення.

РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Гемоглобін

1.1.1 Особливості цитоплазматичної, мембранозв'язаної фракцій

Гемоглобін (Hb) у здорової дорослої людини є білком, основною функцією якого є транспортування кисню від легенів до тканин і транспортування вуглекислого газу від тканин до легень. Молекула гемоглобіну містить чотири окремі складені пептидні ланцюги, які утворюють гідрофобну або водовідштовхувальну кишеню навколо групи гему. Гемова група складається з центрального атома заліза в комплексі з чотирма атомами азоту. Кисень здатний оборотно зв'язуватися з гемовою одиницею в процесі, відомому як оксигенація [5].

Основною фракцією гемоглобіну є вільний (цитоплазматичний гемоглобін), незв'язаний з мембраною еритроцита. Основна біологічна функція вільного Hb полягає в транспортуванні кисню (O_2) в артеріальній крові від легенів до м'язів, де кисень передається до нерухомого міоглобіну, який зберігає його так, щоб він був доступний, там і коли це буде потрібно для генерації енергії шляхом метаболічного окислення глюкози. Після передачі кисню, гемоглобін захоплює CO_2 , який є продуктом окислення глюкози, і транспортує його венозною кров'ю назад до легенів [6]. Окрім транспорту кисню, ще однією функцією Hb називають його пероксидазну активність. Гемоглобін 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 [7].

Другою фракцією є мембранозв'язаний гемоглобін. Виявлено, що в еритроцитах саме трансмембранний білок смуги 3 (Band3) може виступати як потенційний сайт зв'язування гемоглобіну. Встановлені різні шляхи взаємодії Hb з мембраною: електростатичне зв'язування $deoxyHb$ з білком смуги 3, ковалентний зв'язок із мембранними компонентами дисульфідними зв'язками, адсорбція на мембранних ліпідах за допомогою гідрофобних взаємодій.

Зазначено, що гемоглобін може зв'язуватися й з білками цитоскелету: спектрином та глікофорином. Відзначають також, що з мембраною переважно зв'язується частково окислений Hb, що може мати фізіологічне значення, оскільки в передмембранній області відбувається відновлення мембранозв'язаного метгемоглобіну NADPH залежною MetHb-редуктазою. [8].

Встановлено, що оборотне зв'язування Hb з мембраною носить адаптаційний характер і є інструментом налаштування властивостей мембрани і вуглеводного метаболізму при зміні умов функціонування, наприклад, при зміні кисневої напруги (pO_2). У разі дії різних окисників може відбуватися ковалентне приєднання Hb (переважно в окислених формах) до мембранних компонентів, що дестабілізує мембрану. Окрім хімічних факторів, відзначається, що на зв'язування Hb з мембраною також здатна впливати четвертинна структура самої молекули Hb, яка може порушуватися в результаті модифікації метилгліоксалем (альдегід піровиноградної кислоти, який може утворитися у процесі перекисного окиснення ліпідів, або під час гліколізу) [8, 9].

Про адаптаційний характер зв'язування з мембраною гемоглобіну говорить те, що структурні порушення в еритроцитах супроводжуються дестабілізацією макромолекули Hb. Втрачається кооперативний ефект, зменшується резистентність по відношенню до дії різних окисників. В результаті Hb накопичується у передмембранній області, утворюються білкові агрегати (тільця Гейнца), вивільняється залізо. І, зрештою, – з'єднання гемоглобіну з мембраною. [10].

Дані останніх років показують, що поєднання гемоглобіну з мембранними компонентами має досить істотне біологічне значення. Окрім того, що утворення мембранозв'язаного гемоглобіну може бути одним з механізмів формування швидкої адаптивної відповіді на змінні умови, відзначають регуляцію метаболізму глюкози, властивостей цитоскелету, формування сигналу про окисне ушкодження або старіння еритроциту. У разі

оборотної взаємодії з мембранами просторовий перерозподіл Hb дозволяє змінювати рівень клітинного метаболізму, що особливо важливо для еритроцитів, у яких відсутній апарат біосинтезу [11].

Досліджено, що порівняно з вільним, нативним, гемоглобіном, зв'язаний з мембраною гемоглобін показав знижену спорідненість до кисню та меншу реакцію на органічні фосфати, такі як 2,3-дифосфогліцерат та гексафосфат інозиту. Результати досліджень, вказують, що мембранний білок смуги 3 еритроцитів зв'язується з дезоксигемоглобіном сильніше, ніж з оксигемоглобіном; різниця в афінності зв'язування з мембраною між охуHb і деохуHb тісно пов'язана зі зміною четвертинної структури в молекулі Hb, що відбувається при оксигенації. За отриманими результатами припускається, що мембранозв'язаний гемоглобін може впливати на метаболізм еритроцитів змінюючи процеси оксигенації/деоксигенації. В першу чергу це може стосуватися транспортування йонів, що контролюється білком смуги 3, але також можливий вплив на гліколіз, адже певні ферменти (наприклад альдолаза та глюкозо-3-фосфат дегідрогеназа) зв'язуються з band3 [12].

1.1.2 Особливості лігандних форм гемоглобіну

Під типами (лігандними формами) гемоглобіну розуміють такі його різновиди, що відрізняються складом і будовою протомерів своєї білкової складової, або складом ліганду. Коли лігандом є кисень (тобто він пов'язаний з молекулою), таку форму Hb називають оксигемоглобіном (охуHb), тоді як за відсутності кисню він називається дезоксигемоглобіном (деохуHb) або відновленим гемоглобіном (RHb). У цих формах залізо присутнє у двовалентному стані (Fe^{2+}). Коли залізо присутнє у вигляді (Fe^{3+}), утворюється коричневий пігмент – метгемоглобін (MetHb). Якщо в крові присутній чадний газ, наприклад через вдихання диму, утворюється комплекс гемоглобін-монооксид вуглецю, який називається карбоксигемоглобіном (COHb). Кінцевим похідним, що представляє клінічний інтерес, є сульфгемоглобін (SHb), який містить на один атом сірки більше, ніж нормальний гемоглобін.

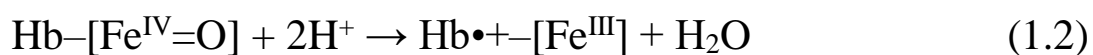
Залізо знаходиться у стані (Fe^{2+}), але зв'язування кисню пригнічується [13]. Похідні гемоглобіну мають різні максимуми поглинання. Аналіз кількісного вмісту лігандних форм базується на диференціальному спектроскопічному вимірюванні основних похідних: oxyHb , deoxyHb , MetHb , HbCO , а також, у деяких випадках, SHb . Відомо, що максимуми поглинання змінюються залежно від температури [13].

Надалі ми розглядаємо особливості кожної з перерахованих форм гемоглобіну.

Оксигемоглобін є нормальною формою гемоглобіну, що переносить кисень, у якій залізо знаходиться у відновленому стані [14]. oxyHb являє собою частку насиченого киснем гемоглобіну по відношенню до загального наявного гемоглобіну, включаючи форми гемоглобіну, що не зв'язують кисень. У здорових людей оксигемоглобін і насичення киснем приблизно рівні. Нормальний вміст насиченого киснем гемоглобіну в артеріальній крові складає 94-100%, критично мінімальна межа – 75%. У венозній крові нормальним є менший показник насичення киснем – близько 73%. Незважаючи на те, що насичення киснем часто залишається в нормальних межах, здатність крові переносити кисень може бути серйозно знижена.

Якщо насичення киснем занадто низьке, цей стан називається гіпоксією. При гіпоксії знижується вміст кисню в артеріальній крові. В еритроцитах гіпоксія може виникнути в наслідок зниження вмісту гемоглобіну або порушення здатності зв'язувати O_2 , а також через дію токсинів. Всі інші причини гіпоксії пов'язують із впливом зовнішніх факторів, найбільш часто на дихальну систему [15].

Відомо, що взаємодія oxyHb з надлишком H_2O_2 призводить до швидкого накопичення MetHb [8]:



Метгемоглобін (MetHb). Коли гемоглобінове залізо окислюється до стану заліза (Fe^{3+}), воно більше не здатне зв'язувати кисень і називається метгемоглобіном. Нормальний рівень метгемоглобіну коливається в межах 1-3%. [16].

Встановили, що саме кисень часто є причиною, за якої оксигемоглобін спонтанно окислюється до метгемоглобіну. Під час цієї реакції кисень відновлюється до супероксидного радикалу, який згодом дисмутує до пероксиду водню.

Фермент, присутній в еритроцитах, метгемоглобінредуктаза, повертає залізо в метгемоглобіні до нормального двовалентного стану, тоді як каталаза, яка також наявна в еритроцитах, каталізує дисмутацію H_2O_2 до кисню та води. Цей механізм разом із тим фактом, що окислення до метгемоглобіну відбувається досить повільно, гарантує, що за нормальних умов кількість метгемоглобіну, присутнього в еритроцитах, становить лише кілька відсотків від загального наявного гемоглобіну [17].

Хоча транспортування кисню метгемоглобін не здатний здійснювати, ця форма все ж виконує певні фізіологічні функції. Встановлено, що метаболічна роль MetHb полягає у знешкодженні вільних радикалів, які утворюються в еритроцитах через постійну взаємодію з киснем (аутоокислення) та іншими окисниками, які містяться в крові. Згідно наявних досліджень, MetHb може виступати в ролі пероксидази, та нітритредуктази. Але повноцінно антиоксидантною системою метгемоглобін не вважається, його внесок у знешкодженні вільних радикалів досить незначний, і виступає скоріше резервною системою, коли інших відновників, таких як аскорбат – не вистачає [18, 19].

Метгемоглобінемія – це стан, що характеризується підвищеною кількістю MetHb. Захворювання може виникнути в результаті генетичного дефекту метаболізму червоних кров'яних тілець або структури гемоглобіну. Проте більш поширеною причиною є вплив різних окислювачів або токсинів.

Найбільш поширеними токсичними агентами, після дії яких спостерігається підвищення MetHb, є препарати, що містять нітрати (нітрогліцерин, ізобутилнітрат і вісмут), місцеві анестетики, сульфовмісні препарати, такі як сульфаніламід, сульфасалазин, метиленовий синій.

Більшість препаратів, зокрема сульфаніламід та фенацетин, які викликають метгемоглобінемію, також можуть викликати сульфгемоглобінемію (надмірне накопичення SHb), хоча цей стан менш поширений, ніж метгемоглобінемія [20].

Як зазначено вище, метгемоглобінредуктаза виконує роль відновника MetHb, але ця функція виконується й іншими системами, які представлені в наступному переліку:

1. Власне метгемоглобінредуктазою є NADH-метгемоглобінредуктазна система ферментів, яка присутня в еритроцитах і використовує NADH, що утворюється в результаті гліколізу, для зниження рівня метгемоглобіну. Ця система (інша її назва – NADH-цитохром b5-редуктаза), безумовно, є найважливішою у здорових суб'єктів, на неї припадає понад дві третини активності, що знижує метгемоглобін.

2. Аскорбінова кислота (аскорбат) також може викликати зниження метгемоглобіну шляхом прямого хімічного впливу, хоча швидкість цієї реакції досить повільна.

3. Відновні ферменти на основі глутатіону мають невелику активність метгемоглобінредуктази.

4. Фермент NADPH-дегідрогеназа в еритроцитах може знижувати рівень метгемоглобіну за допомогою NADPH, що утворюється пентозофосфатним шляхом. У фізіологічних умовах ця система майже не діє і розглядається як «резервна» метгемоглобінредуктаза.

Геміхром (hemi) являє собою форму низькоспінового метгемоглобіну. Геміхроми передують процесам денатурації гемоглобіну (Hb), переважно продукуються частково денатурованими гемоглобінами та утворюють гістидинові комплекси. Геміхроми можуть утворюватися у фізіологічних

умовах в результаті змін рН і температури, а також автоокислення оксигемоглобіну. Досліджено, що геміхроми можуть накопичуватися на мембранах еритроцита, утворюючи комплекси з білком смуги 3 [21]. Встановлено, що геміхроми виконують сигнальну функцію, шляхом зв'язування з мембраною еритроцита [12].

Дезоксигемоглобін (deoxyHb) в еритроцитах існує в «напруженій» структурі з низькою спорідненістю. В процесі оксигенації він зазнає переходу до oxyHb із «розслабленою» структурою, яка має нижчу здатність зв'язувати СО, ця характеристика була названа гем-гемовою взаємодією [22].

Нативний вміст дезоксигемоглобіну в крові різний. В артеріях, особливо тих, що виходять з легень, 97% гемоглобіну насичене киснем (відповідно вміст дезоксигемоглобіну складає до 3%), тоді як насичення киснем венозного гемоглобіну становить 70% і менше [23].

Досліджено, що деоксигенація еритроцитів може впливати на структурні властивості мембрани. Встановили, що дезоксигемоглобін конкурує за зв'язування зі смугою 3 з анкірином (адаптерний білок, що бере участь у приєднанні інших білків до різних ділянок клітинної мембрани). Таким чином deoxyHb, поєднуючись з мембраною, може впливати на властивості еритроцита: як механічні, так і транспортні [24]. Зокрема, зазначають, що через взаємодію з основним інтегральним білком мембрани еритроциту – білком смуги 3 дезоксигенований Hb залежно від кисневих умов змінює енергетичний обмін, морфологію та деформованість еритроцитів, вивільнення регуляторів судинного тону – NO та АТР [12].

Карбоксигемоглобін (HbCO) утворюється в результаті поєднання монооксиду вуглецю (СО) з гемовим залізом. Спорідненість чадного газу з гемоглобіном у 240 разів перевищує спорідненість кисню. Як тільки одна молекула монооксиду вуглецю зв'язується з гемоглобіном, вона зміщує криву дисоціації гемоглобіну та кисню вліво, ще більше збільшуючи її спорідненість і серйозно погіршуючи вивільнення кисню до тканин.

Частина карбоксигемоглобіну виробляється ендогенним шляхом, але зазвичай він становить менше 2% загального гемоглобіну. Екзогенний чадний газ утворюється з вихлопних газів автомобілів, тютюнового диму та промислових забруднювачів, таких як спалювання вугілля, газу та деревного вугілля

Діючи як прямий токсин на клітинному рівні, карбоксигемоглобін порушує клітинні процеси [25].

Ендогенне утворення і накопичення HbCO пов'язують з впливом вільних радикалів. Так у роботі [26] вказують, що ймовірним механізмом є активація процесів вільнорадикального окислення з пошкодженням клітинних мембран. Також є свідчення, що ендогенну продукцію CO може підвищити будь-яке порушення гомеостазу еритроцитів, спричинене прискореним руйнуванням гемопротейнів. Посилене виробництво CO є результатом ряду різних захворювань, включаючи гемолітичні, окислювальні та запальні стани. Підвищене виробництво CO під час захворювання може представляти адаптивну реакцію на стрес і служити непрямим показником запалення або окисного стресу. Відповідно, ендогенну продукцію CO можна використовувати як біомаркер окисних і запальних процесів [27].

Сульфгемоглобін (SHb) є сумішшю окислених, частково денатурованих форм Hb, які утворюються під час окисного гемолізу чи окислення гемоглобіну. Сірка (джерело якої може бути різним) вбудовується в гемові кільця Hb, у результаті чого утворюється зелений гемохром. Подальше окислення зазвичай призводить до денатурації та осадження Hb у вигляді тілець Гейнца. SHb не здатний транспортувати O₂, але він може з'єднуватися з чадним газом (CO) з утворенням карбоксисульфгемоглобіну. На відміну від метгемоглобіну, SHb не може бути відновлений назад до Hb, і він залишається в клітинах, поки вони не розпадуться. Зазвичай так форма гемоглобіну відсутня в еритроцитах, або є в дуже малих кількостях [28]. Встановлено, що в SHb молекула сірки, зазвичай потрапляє з глутатіону. Сульфур включається

в гемоглобін після окислення фрагмента гему (включення атома сірки в порфіринове кільце гемоглобіну внаслідок окисного стресу) [29].

В роботі [30] вказується, що гемоглобін у формі ферилу може окислювати сірководень і таким чином перетворюватися на сульфгемоглобін, де сірка ковалентно вставляється на край гема (рис 1.1.)

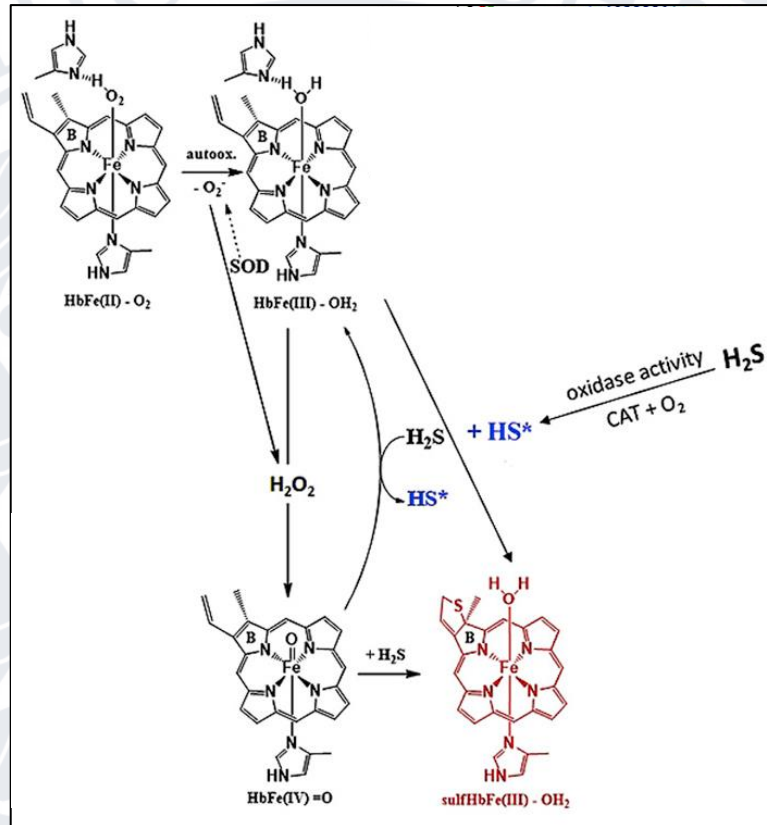


Рис. 1.1. Утворення сульфгемоглобіну

1.2 Сірководень (H₂S). Його роль в метаболізмі еритроцитів

Відомо, що сірководень (H₂S) природним шляхом синтезується в багатьох тканинах ссавців. Встановлено, що його синтез із L-цистеїну відбувається переважно посередництвом активності наступних ферментів: цистатіонін-γ-ліаза (CSE), цистатіонін-β-синтаза (CBS) і 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза (3-MST) [31]. У роботі [32] зазначають, що шлях транссульфурації є єдиним відомим шляхом для біосинтезу цистеїну de novo у ссавців і відіграє центральну роль у метаболізмі сірки та регуляції окисно-відновного процесу. Метаболізм ендogenous утворення сірководню описується наступним чином. Шлях складається з двох ферментативних

етапів. На першому етапі цистатіонін-бета-синтаза (CBS) необоротно відводить сірку з метіонінового циклу шляхом конденсації гомоцистеїну (Hcy) із серином (Ser) у цистатіонін (Cth). На другому етапі цистатіонін-гамма-ліаза (CSE) гідролізує Cth до цистеїну (Cys), який є необхідним для синтезу білка, біосинтезу глутатіону та таурину, регуляції окисно-відновного процесу та біогенезу газоподібної сигнальної молекули сірководню. І CBS, і CSE є піридоксаль-5'-фосфат (PLP)-залежними ферментами, які відповідають за більшу частину біосинтезу H_2S . Не маючи суворої специфічності до субстрату та реакції, CBS та CSE каталізують реакції утворення H_2S , використовуючи Hcy та Cys [32].

Зазначається, що реакція за участю CBS (конденсація цистеїну з гомоцистеїном з утворенням цистатіоніну та сірководню зазвичай залежить від S-аденозил-метіоніну (SAM) [33].

Схему описаних реакцій наводять в роботі [34], де також зазначено, що Цистатіонін- β -синтаза є ключовим ферментом у транс-сульфураційному шляху метаболізму метіоніну, шляху, що веде до синтезу цистеїну та, зрештою, глутатіону (рис. 1.2.1.).

Хоча описані вище процеси характерні для більшості клітин ссавців, для еритроцитів вони досі залишаються мало вивченими. Остаточно підтвердженої інформації про діяльність (чи взагалі наявність) ферменту CBS у метаболічній мережі зрілих еритроцитів немає. Однак наявність циклу глутатіону, а також циклу SAM у зрілих еритроцитах є доведеною [35, 36].

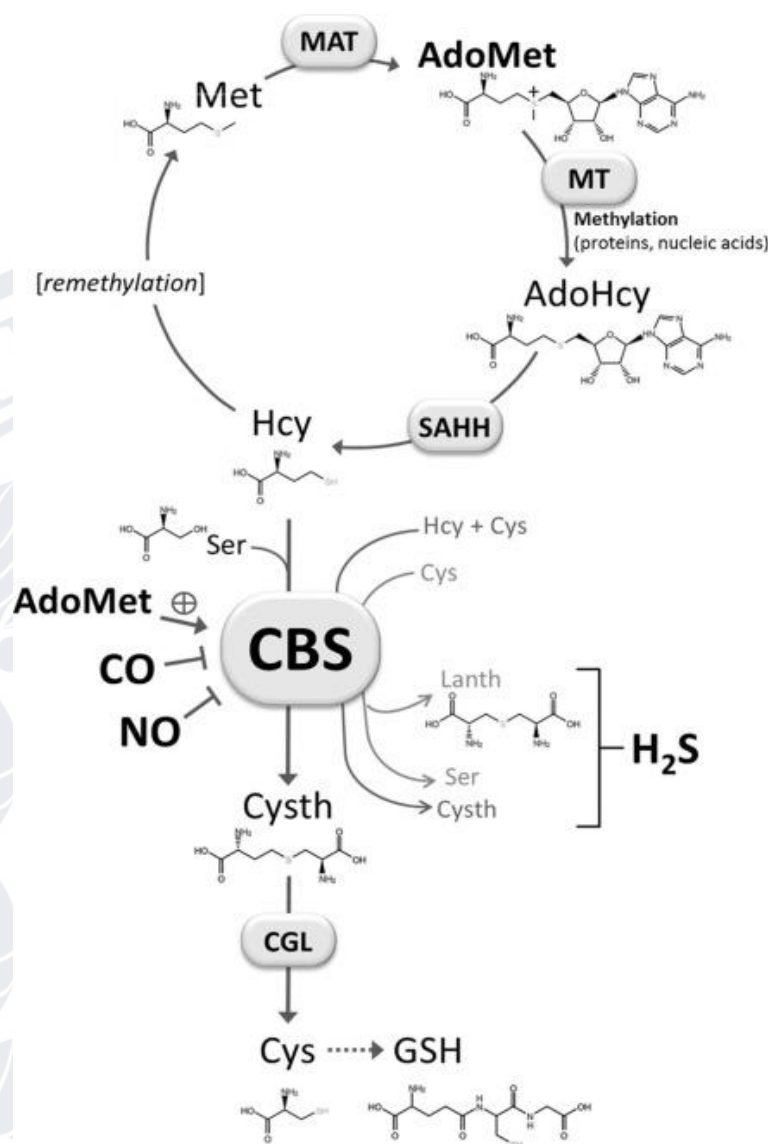


Рис. 1.2.1. Схема реакцій, що каталізуються CBS і шлях транссульфування метіонінового циклу. CBS каталізує конденсацію гомоцистеїну (Hcy) з цистеїном (Cys) або серином (Ser), утворюючи цистатіонін (Cyst) і H₂S або H₂O. CBS також може каталізувати перетворення Cys в Ser або лантіонін (Lant) з супутня продукція H₂S. CBS алостерично активується AdoMet і інгібується NO • і CO. Met - метіонін; MAT – метіонін-аденозилтрансфераза; MT – метилтрансферази (беруть участь в реакціях метилювання); SAHH, S-аденозил-1-гомоцистеїнгідролаза; CGL, цистатіонін γ-ліаза; GSH, глутатіон [34].

Чи бере участь H₂S у регуляції функцій еритроцитів – питання, яке досі є не до кінця вивченим. В роботі [37] вказується, що дана молекула присутня в еритроцитах і здатна зв'язуватися метгемоглобіном, в результаті чого

сірководень окислюється до суміші тіосульфату та гідрополісульфідів (рис. 1.2.2.)

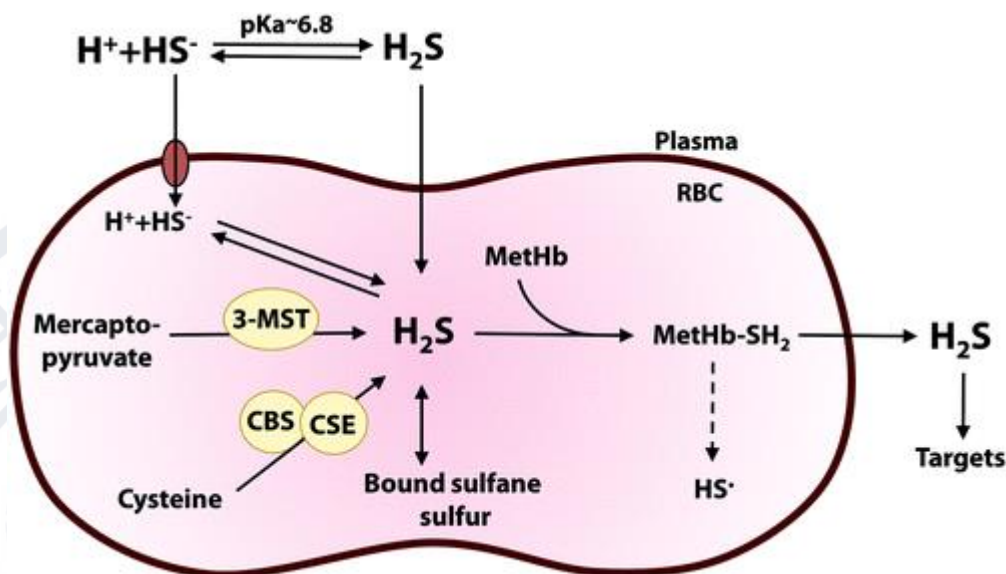
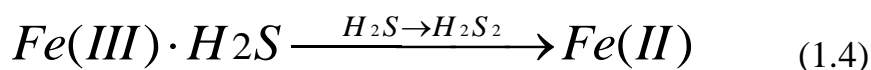
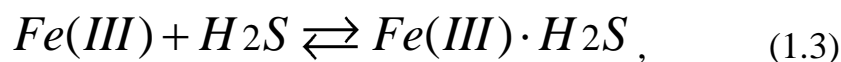


Рис. 1.2.2. Схема метаболізму надходження сірководню в еритроцит та його зв'язування з метгемоглобіном [37].

Одним із шляхів утворення сірководню в еритроцитах, аналогічно до процесів у клітинах інших тканин, називають метаболізм цистеїну. Припускається діяльність в еритроцитах ферментів 3-MST та CBS, які відповідають за метаболізм цистеїну [38]. У статті [39] зазначено, що еритроцити людини ефективно контролюють гомеостаз та проникність клітинної мембрани посередництвом сигнальної молекули сірководню. Червоні клітини крові ендогенно продукують H₂S за допомогою як глутатіонзалежних, так і ферментативних (через 3-MST) процесів. І, як зазначалося, еритроцити ефективно розщеплюють H₂S за допомогою каталізованого метгемоглобіном окислення.

В роботі [40] можна знайти відомості, які доводять, що тривалентне залізо гема (тобто метгемоглобін), пов'язуючись з сірководнем здатне відновлюватися до двовалентного стану:



Згідно результатів, наведених у дослідженні [41], зв'язування метгемоглобіну з сірководнем має досить важливе біологічне значення. Автори виявили, що зв'язування H_2S і MetHb відбувається досить швидко, але при цьому, значно повільніше, відбувається відновлення гему (із тривалентного стану до двовалентного). Цей процес є настільки повільним, що дозволяє припускати потенційну роль метгемоглобіну як переносника H_2S у крові, паралельно з функцією переносника кисню значно більш поширеного двовалентного гемоглобіну. Автори припускають, що metMb у серці може брати участь у передачі окисно-відновних сигналів за участю H_2S .

У дослідженні [42] виявлено, що сірководень посилює вивільнення гемоглобіну (здебільшого форми $oxHb$) з мембрани. Це пов'язують з S-сульфгідратацією гемоглобіну. Автори з'ясували наступне: H_2S сприяє вивільненню гемоглобіну з мембрани в цитозоль, що посилює прикріплення бісфосфогліцератмутази (BPGM) до мембрани. Це призводить до зниження виробництва 2,3-бісфосфогліцерату (2,3-BPG). На основі даних, які автори отримали, (відображення процесів наведене в схемі (рис.1.2.4)) припускається, що сірководень є регулятором спорідненості Hb до кисню.

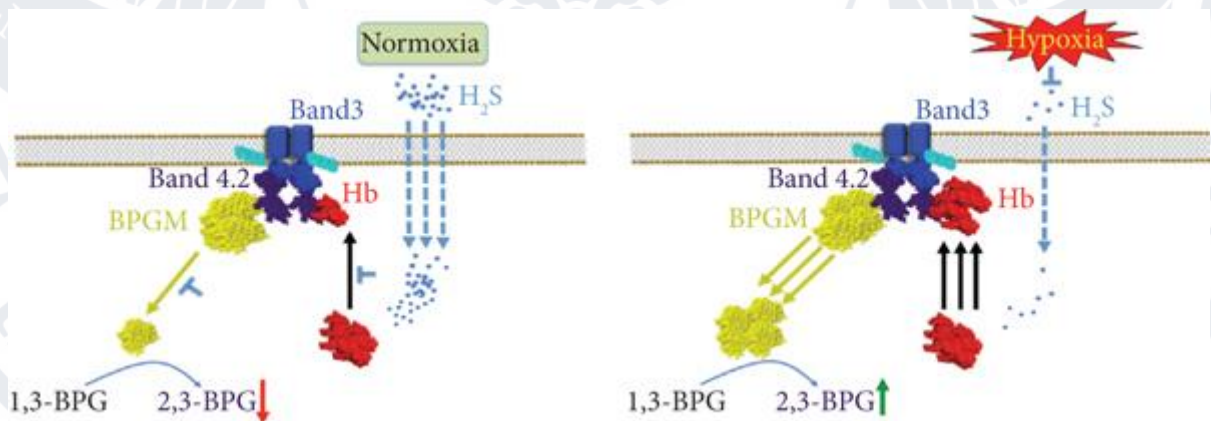


Рис.1.2.4. Інтегрована схема потенційних механізмів, що лежать в основі модуляції H_2S 2,3-BPG і афінності зв'язування Hb-O₂ в умовах нормоксії та гіпоксії. H_2S пригнічує транслокацію гемоглобіну з цитозолу на мембрану і, у свою чергу, сприяє прикріпленню BPGM до мембрани і, таким чином, запобігає підвищенню рівня 2,3-BPG при нормоксії. Під час гіпоксії знижений рівень H_2S сприяє прикріпленню гемоглобіну до мембрани та вивільненню

BPGM у цитозоль із мембрани, що зрештою призводить до збільшення продукції 2,3-BPG в еритроцитах [42].

У роботі [40] описані принаймні дві функції сірководню в еритроцитах. Перша має пряме відношення до гемоглобіну, відзначають здатність H_2S зв'язувати та модифікувати гем. Відповідно, одним із основних метаболітів, які сприяють утворенню сульфгемоглобіну в еритроцитах вважають саме сірководень. Окрім того, знову зазначається регулювальна роль H_2S по відношенню до пропускної здатності мембрани та пулу АТФ у червоних клітин крові. Активація К-АТФ-каналів була пов'язана авторами із взаємодією H_2S з декількома залишками цистеїну в комплексі. Також було припущено, що активація К-АТФ може бути опосередкована взаємодією H_2S з гемопротейнами, такими як цитохром-с-оксидаза (CсО) і гемоглобін (Hb), що знижує клітинний АТФ і активує К - АТФ - канали.

Цитохром-с-оксидаза є одним із ключових ферментів, відповідальних за клітинне дихання. Автори пишуть, що реакція між CсО і H_2S індукує зниження виробництва АТФ. Зменшення клітинного АТФ дозволяє активувати К-АТФ-канали, які в іншому випадку блокуються АТФ.

Підсумовуючи вищерозглянуте ми можемо відзначити наступне:

- 1) накопичення H_2S у еритроцитах пов'язують з метаболізмом цистеїну, в першу чергу через систему глутатіону з ферментом CBS, а також ферментом 3-MST;
- 2) встановлено, що сірководень може зв'язуватися метгемоглобіном, який, відповідно до різних досліджень: або каталізує його розчеплення, або використовує H_2S для транспортування чи відновлення власного заліза;
- 3) H_2S посилює вихід $oxuHb$ з мембрани в цитозоль еритроцита, а також модифікує гем, утворюючи сульфгемоглобін;
- 4) припускається регуляція пропускної здатності мембрани сірководнем через його здатність активувати К-АТФ-канали.

1.3 Роль циклів метіоніну та глутатіону в метаболізмі еритроцитів

Глутатіон (GSH) є важливим поглиначем вільних радикалів, який присутній у всіх клітинах. Це трипептид, синтезований з глутамату, цистеїну та гліцину за допомогою цитозольних ферментів глутаматцистеїнлігази (GCL) (EC6.3.2.2) і глутатіонсинтетази (GS) (EC 6.3.2.3).

Нормальна стаціонарна концентрація глутатіону в людському еритроциті становить ~2 ммоль. Швидкість синтезу GSH контролюється за концентрацією синтетичних ферментів, швидкістю забезпечення субстратом і кінцевим продуктом, який має інгібуючий ефект на GCL. Оскільки мембрана еритроцитів (еритроцитів) людини є вільно проникною для пероксиду водню GSH в еритроцитах є важливим мобільним поглиначем активного кисню [36, 43].

Відомо, що дефіцит глутатіону ставить клітину під загрозу окисного пошкодження. Крім антиоксидантного захисту та поглинання вільних радикалів, глутатіон відновлює важливі антиоксиданти, такі як вітаміни С і Е. Окрім нейтралізації вільних радикалів, глутатіон також передбачає зв'язування перехідних металів, тим самим зменшуючи їхню токсичну здатність [44].

Згідно сучасних відомостей, в еритроцитах, що знаходяться у фізіологічно нормальних умовах, синтез GSH врівноважує витрати, коли або окислений GSH, або GSH, пов'язаний із ксенобіотиками, активно експортується з клітини. Коли окисне навантаження збільшується, ці втрати збільшуються, зниження концентрації GSH у еритроцитах зменшує ефект зворотного інгібування внутрішньоклітинного синтезу GSH. Відповідно, синтез GSH збільшується до вищих показників. Таким чином зберігається оптимальна концентрація GSH. Існують відомості про зниження концентрації GSH при захворюваннях, пов'язаних із високим окисним стресом, і частина лікування захворювання передбачає підтримку концентрації GSH шляхом забезпечення субстратів для його синтезу. Збільшення надходження попередників цистеїну використовувалося для збільшення швидкості синтезу

GSH [36]. Досліджено, що в умовах нестачі цистеїну – основного метаболіта циклу глутатіону, цистин (в якості джерела для синтезу цистеїну) незважаючи на високі співвідношення концентрацій у плазмі не є ефективним джерелом цистеїну для синтезу GSH еритроцитами. Отже, для червоних клітин крові в умовах стресових умовах (таких як окисний стрес) більш ефективним може бути залучення альтернативних шляхів синтезу цистеїну [43]. Як свідчать отримані результати роботи [45], зниження синтезу GSH може бути спричинене зниженням внутрішньоклітинних концентрацій субстрату та зниженням транспорту амінокислот.

Метаболізм глутатіону, що характерно для переважної більшості клітин, здатний підтримуватися через цикл S-аденозилметіоніну. 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) [46]. Схема представлена на рисунку 1.3.1:

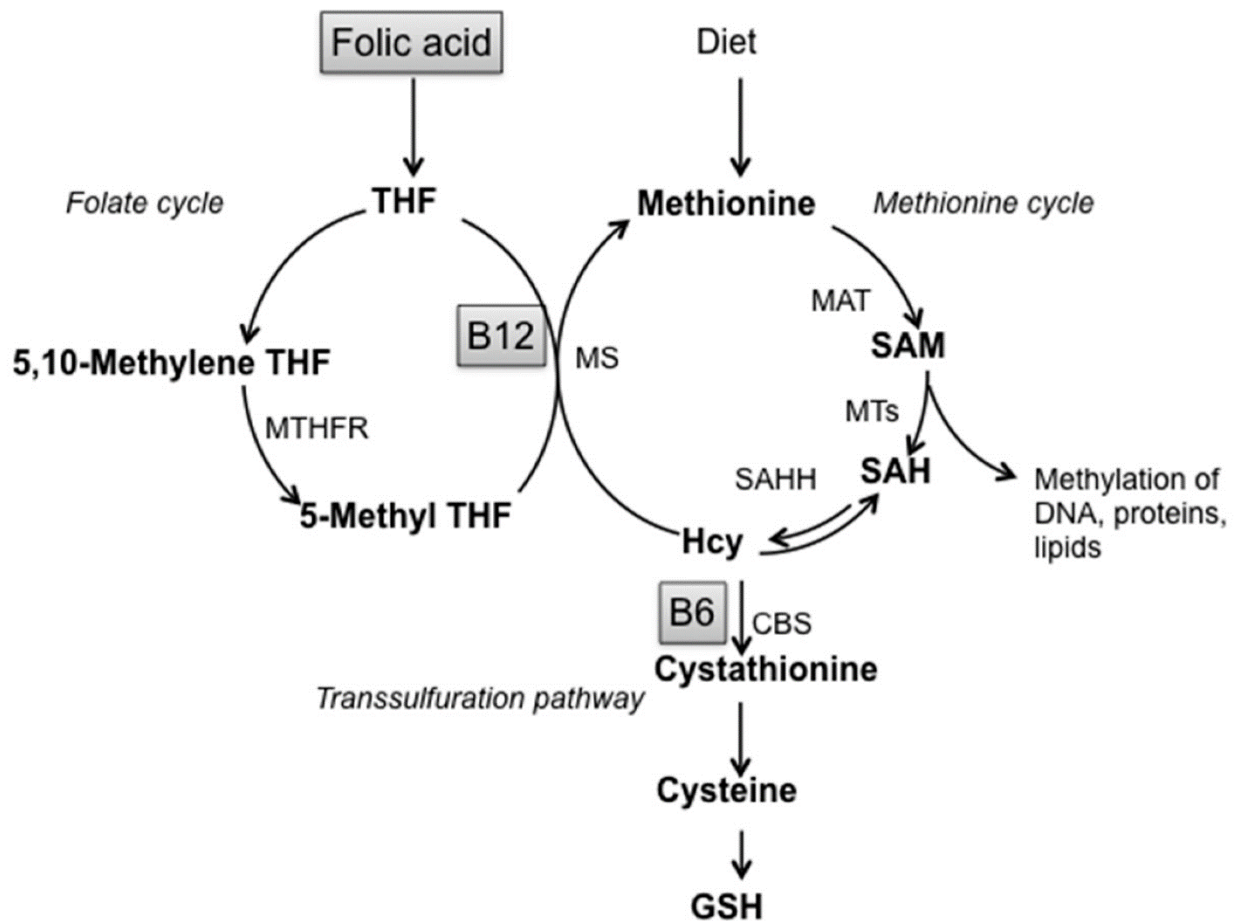


Рис.1.3.1. Схематичне зображення одновуглецевого метаболізму. Скорочення: SAM: S-аденозилметіонін; SAH: S-аденозилгомоцистеїн; Hcy: гоцистеїн; GSH: глутатіон; ТГФ: тетрагідрофолат; B12: Вітамін B12; B6: Вітамін B6; MTHFR: метилентетрагідрофолатредуктаза; MS: метіонінсинтаза; MAT: метіонін-аденозилтрансфераза; MT: метилтрансферази; SAHH: S-аденозилгомоцистеїн гідролаза; CBS: Цистатіонін-β-синтаза [47].

Стосовно роботи цих процесів у еритроцитах поки остаточно підтверджених даних немає. Але існують дослідження, які можуть прямо чи опосередковано доводити наявність оговорених шляхів у еритроцитарному метаболізмі. Наприклад, робота метою якої було визначення, як в плазмі крові накопичується гоцистеїн [48]. Автори цього дослідження інкубували кров із додаванням міченого метіоніну. На основі результатів, вони зробили наступний висновок: «Інкубація крові у присутності метіоніну, міченого сіркою 35, продемонструвала включення мітки в гоцистеїн та продукти

транссульфурації. Подібні інкубації фракцій клітин крові дозволяють припустити, що синтез гомоцистеїну, який є попередником цистеїну, відбувався в еритроцитах» [48]. Отже, Hcy, скоріш за все, синтезується в еритроцитах із посередництвом метіоніну, тобто через метіоніновий цикл.

Зауважимо, що субстратом для циклу SAM є метіонін (Met), який може надходити в еритроцити через транспортну систему мембрани еритроцита, наприклад за допомоги L-системи чи N (або SN). [49-52].

Хоча зв'язки між циклами GSH та SAM для еритроцитів не встановлені, існують дослідження, які можуть описати й інші важливі процеси, які підтримуються через метаболічний шлях метіоніну. В роботі [53] розписано дослідження, згідно якого еритроцити інкубувалися в середовищі SAM, після чого визначали кількість пуринових нуклеотидів. На основі отриманих результатів, автори зробили висновок, що SAM використовується для функціонального відновлення запасу АТФ, а також інших нуклеотидів в еритроцитах. Також автори визначили, що аденозин має брати участь у метилюванні різних білків та фосфоліпідів, у наслідок чого й відновлюються нуклеотиди (в першу чергу – аденін, так як АТФ – основна форма енергії в метаболічних процесах).

У роботі [54] зазначається, що основна частина пулу S-аденозилметионіну в еритроцитах може підтримуватися для реакції карбоксильного метилювання мембранних та цитозольних білків. Функція метилювання в еритроцитах є значно меншою, в порівнянні з іншими клітинами, що в свою чергу пояснює менший вміст SAM в червоних клітинах [55]. В дослідженні [56] доводиться порушення роботи при оксидантному стресі, ферменту PIMT, який діє для переносу метильних груп із S-аденозил-L-метіоніну в карбоксильні групи бічних ланцюгів альфа пошкоджених L-ізоаспартильних та D-аспартилових амінокислот. Наявність цих ізоаспартильних залишків у еритроцитах була визначена в якості маркеру пошкодження мембранних білків червоних клітин. Тобто, SAM, через функцію метилювання, може відновлювати мембранні білки еритроцитів.

Важливість цих процесів для червоних клітин зумовлена тим, що вони не мають органел, які могли б синтезувати нові білки, тому їм потрібно відновлювати вже існуючі. Також встановлено, що метилуються карбоксильні групи білків. Цей процес встановили, як у цитоскелетних білках, так і в мембранних білках, що відповідають за аніонний транспорт в еритроцитах, що надає S-аденозилметіоніну статус чинника, який впливає на транспортну систему кров'яних тілець [57, 58]. Зазначено, що метилуються також цитозольні білки еритроцитів. Досліджено, що молекула гемоглобіну метилується за участі SAM. Встановлено, що активність метилювання Hb залежить від віку еритроцита та рівню оксидантного навантаження відповідно [59]. Досліджено, що швидкість метилювання гемоглобіну пригнічується S-аденозилгомоцистеїном, відомим інгібітором кінцевого продукту метилтрансфераз, що є додатковим свідченням того, що перенесення метильної групи включає її зв'язування із певними специфічними ділянками у молекулі гемоглобіну. Проте значення метилювання гемоглобіну поки не встановлено [60].

Отже, із вищерозглянутих свідчень стосовно діяльності метаболічних циклів глутатіону та метіоніну, ми можемо виділити наступне:

- 1) Обидва цикли встановлені для еритроцитів і грають вагомую роль в еритроцитарному метаболізмі;
- 2) Досі остаточно не встановленими є біохімічні зв'язки між циклами GSH і SAM, припускається можливість підтримки глутатіонової системи циклом метіоніну через постачання цистеїну (посередництвом ферменту CBS), що особливо важливо у стресових умовах, коли надходження цистеїну ззовні є недостатнім.

РОЗІЛ II

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали досліду

Список реактивів:

- 1) NaCl (М 58,14), чда;
- 2) натрій фосфорнокислий двозаміщений, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (М 358,14), фарм;
- 3) натрій фосфорнокислий 1-заміщений, NaH_2PO_4 (М 119,98), чда, (Німеччина);
- 4) перекис водню (34%)
- 5) тритон X-100.
- 6) набір реактивів для визначення концентрації гемоглобіну в крові;

Список розчинів, що використовувалися в дослідах:

- 1) Фізіологічний розчин: NaCl (0.9%).
- 2) Na-фосфатний лізуючий буфер (0,001 М, рН 7,4).
- 3) Буферний розчин 1: Na-фосфатний буфер (0,015 М, рН 7,4) + 0,15 М NaCl.
- 4) Розчин Тритону X-100 (5%): 0,5 г тритонX-100 + 9,5 мл H_2O .
- 5) Перекис водню (H_2O_2): 0,021 М.
- 6) Розчин метіоніну (0,00373 г у 25 мл фізіологічного розчину).
- 7) Набір реактивів для визначення концентрації гемоглобіну в крові.

В дослідах використовувався спектрофотометр марки SPEKOL ® 1500 UV/Vis.

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

2.2 Умови проведення експерименту

Для дослідження розподілу лігандних форм гемоглобіну цитоплазматичної та мембранозв'язаної фракції, залежно від впливу метіоніну та перекису водню, ми поділили експериментальні проби на 4 групи, залежно від умов інкубування еритроцитів: в середовищі H_2O_2 змінної концентрації, в середовищі метіоніну змінної концентрації, в середовищі перекису (змінної концентрації) у присутності метіоніну фіксованої концентрації.

Для дослідження впливу перекису водню (перша група), суспензія еритроцитів вводилася у заздалегідь приготовані розчини H_2O_2 , концентрація яких варіювалася в діапазоні 10^{-3} - 10^{-8} М. Для створення градієнту концентрацій перекису водню, ми використали відтитрований розчин H_2O_2 (0,021 М), який у кількості 0,5 мл розбавляли в 4,5 мл фізіологічного розчину. Отриманий розчин (з концентрацією $21 \cdot 10^{-3}$ М) повторно у кількості 0,5 мл розбавляли фізіологічним розчином (4,5 мл). Таким чином ми проводили покрокове розбавлення до концентрації H_2O_2 $21 \cdot 10^{-8}$ М.

Для дослідження впливу метіоніну (друга група) суспензія еритроцитів вводилася у Na-фосфатний буфер (0,015 М, рН 7,4), що містив 0,15 М NaCl (буферний розчин 1). Для приготування розчинів метіоніну змінної концентрації, наважку метіоніну (0,00373 г) розчиняли у 25 мл фізіологічного розчину. Отриманий розчин метіоніну концентрацією 10^{-3} М вводили середовищі варіювали від 10^{-10} до 10^{-4} М.

В експериментах по дослідженню сумісної дії метіоніну і перекису водню (третья і четверта групи) суспензія еритроцитів вводилася у буферний розчин з додаванням фіксованої кількості метіоніну у концентрації 10^{-4} та 10^{-6} М. Вміст H_2O_2 варіювали в діапазоні 10^{-8} – 10^{-3} М.

Еритроцити тричі відмивали центрифугуванням з Na-фосфатним буфером (0.015 моль, рН 7.4), що містив 0.15 моль NaCl (буферний розчин 1). В кожену пробу вводилося по 0,25 мл еритроцитарної суспензії. Кількість еритроцитів в середовищі інкубування підтримували на рівні 3,0-3,2 г/л ($\sim 1 \cdot 10^8$ клітин/л). Клітини інкубували при 20°C . продовж години.

Експериментальні проби усіх чотирьох груп були приготовані відповідно до таблиць 2.1-2.4.

Таблиця 2.1 – Склад експериментальних точок першої групи еритроцитів

№ проби	Об'єм суспензії еритроцитів, мл	Об'єм фізіологічного розчину, мл	Об'єм H ₂ O ₂ , мл	Вихідна концентрація H ₂ O ₂ , М	Концентрація H ₂ O ₂ в точці, М
1	0,25	2	0,25	21·10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
2	0,25	2	0,25	21·10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
3	0,25	2	0,25	21·10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
4	0,25	2,13	0,12	21·10 ⁻⁶	5·10 ⁻⁶
5	0,25	2	0,25	21·10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
6	0,25	2,13	0,12	21·10 ⁻⁵	5·10 ⁻⁵
7	0,25	2	0,25	21·10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
8	0,25	2	0,25	21·10 ⁻³	10 ⁻³
К0	0,25	2,25	-	-	-
К1	0,25	2,25	-	-	-

Таблиця 2.2 – Склад експериментальних точок другої групи еритроцитів

№ проби	Об'єм суспензії еритроцитів, мл	Об'єм буферного розчину 1, мл	Вихідна концентрація метіоніну, М	Об'єм метіоніну в точці, мл	Концентрація метіоніну в точці, М
1	0,25	2	10 ⁻³	0,25	10 ⁻⁴
2	0,25	2	10 ⁻⁴	0,25	10 ⁻⁵
3	0,25	2	10 ⁻⁵	0,25	10 ⁻⁶
4	0,25	2	10 ⁻⁶	0,25	10 ⁻⁷
5	0,25	2	10 ⁻⁷	0,25	10 ⁻⁸
6	0,25	2	10 ⁻⁸	0,25	10 ⁻⁹
7	0,25	2	10 ⁻⁹	0,25	10 ⁻¹⁰
К0	0,25	2,25	-	-	-
К1	0,25	2,25	-	-	-

Таблиця 2.3 – Склад експериментальних точок третьої групи еритроцитів

№ проби	Об'єм буферного розчину 1, мл	Об'єм H ₂ O ₂ в точці (мл)	Об'єм метіонін у в точці (мл)	Вихідна концентрація H ₂ O ₂ , М	Вихідна концентрація метіоніну, М	Концентрація H ₂ O ₂ в точці (М)	Концентрація Метіоніну в точці (М)
1	1,75	0,25	0,25	$21 \cdot 10^{-8}$	10^{-5}	10^{-8}	10^{-6}
2	1,75	0,25	0,25	$21 \cdot 10^{-7}$	10^{-5}	10^{-7}	10^{-6}
3	1,75	0,25	0,25	$21 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	10^{-6}	10^{-6}
4	1,88	0,12	0,25	$21 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-6}
5	1,75	0,25	0,25	$21 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	10^{-5}	10^{-6}
6	1,88	0,12	0,25	$21 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-6}
7	1,75	0,25	0,25	$21 \cdot 10^{-4}$	10^{-5}	10^{-4}	10^{-6}
8	1,75	0,25	0,25	$21 \cdot 10^{-3}$	10^{-5}	10^{-3}	10^{-6}
K0	2,25	-	-	-	-	-	-
K1	2,25	-	-	-	-	-	-

Таблиця 2.4 – Склад експериментальних точок четвертої групи еритроцитів

№ проби	Об'єм буферного розчину 1, мл	Об'єм H ₂ O ₂ в точці (мл)	Об'єм метіонін у в точці (мл)	Вихідна концентрація H ₂ O ₂ , М	Вихідна концентрація метіоніну, М	Концентрація H ₂ O ₂ в точці (М)	Концентрація Метіоніну в точці (М)
1	1,75	0,25	0,25	$21 \cdot 10^{-8}$	10^{-5}	10^{-8}	10^{-4}
2	1,75	0,25	0,25	$21 \cdot 10^{-7}$	10^{-5}	10^{-7}	10^{-4}
3	1,75	0,25	0,25	$21 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	10^{-6}	10^{-4}
4	1,88	0,12	0,25	$21 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-4}
5	1,75	0,25	0,25	$21 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	10^{-5}	10^{-4}
6	1,88	0,12	0,25	$21 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}
7	1,75	0,25	0,25	$21 \cdot 10^{-4}$	10^{-5}	10^{-4}	10^{-4}
8	1,75	0,25	0,25	$21 \cdot 10^{-3}$	10^{-5}	10^{-3}	10^{-4}
K0	2,25	-	-	-	-	-	-

K1	2,25	-	-	-	-	-	-
----	------	---	---	---	---	---	---

Порівняння проводили з контрольними пробами, які готувалися в тих самих умовах, але без метіоніну в середовищі інкубування. Перша контрольна проба (K0) аналізувалася одразу після приготування, інша (K1) – після години інкубування.

Зауважимо, що дози метіоніну, які використовувалися в експериментах підібрані відповідно до фізіологічних можливостей еритроцита. За даними роботи [61] оптимальна концентрація метіоніну в плазмі крові та еритроцитах знаходиться в межах 10^{-6} - 10^{-8} М/л.

Після інкубування, проводили лізис еритроцитів у 3 мл Na-фосфатного лізуючого буфера (протягом 20 хв, $T = 4^{\circ}\text{C}$), Тіні осаджували центрифугуванням (10 хв, 3000 об/с).

Осаджені мембрани еритроцитів (тіні) відділяли від гемолізату. 2мл гемолізату використовували для аналізу цитоплазматичного гемоглобіну, тоді як тіні, використовували для аналізу мембранозв'язаного гемоглобіну.

2.2 Аналіз цитоплазматичної та мембранозв'язаної фракції гемоглобіну

Для дослідження мембранозв'язаного гемоглобіну, до осаду тіней еритроцитів додавали 0,5 мл 5% розчину тритону X-100. Проби витримували протягом 5 хв до повного просвітлення розчину, потім додавали 0,2 мл буферу 1.

Спектри поглинання мембранозв'язаної фракції Hb еритроцитів реєстрували на спектрофотометрі в інтервалі довжин хвиль 340 – 650 нм в кюветах з товщиною 1 мм. В якості розчину порівняння для спектрофотометричних вимірів при вивченні мембранозв'язаного гемоглобіну використовували розчин, що містив 0.5 мл тритону X-100 + 0.3 мл буферного розчину 1.

Для дослідження цитоплазматичного Нв, гемолізат розбавляли до 3 мл буферним розчином 1.

Спектри поглинання цитоплазматичного гемоглобіну реєстрували аналогічно мембранозв'язаному, але іншим з інтервалом довжин хвиль: 645-495 нм. В якості розчину порівняння для спектрофотометричних вимірів при вивченні цитоплазматичного гемоглобіну використовували буферний розчин 1.

Зареєстровані спектри поглинання були відображені у вигляді графіку (рис.2.1).

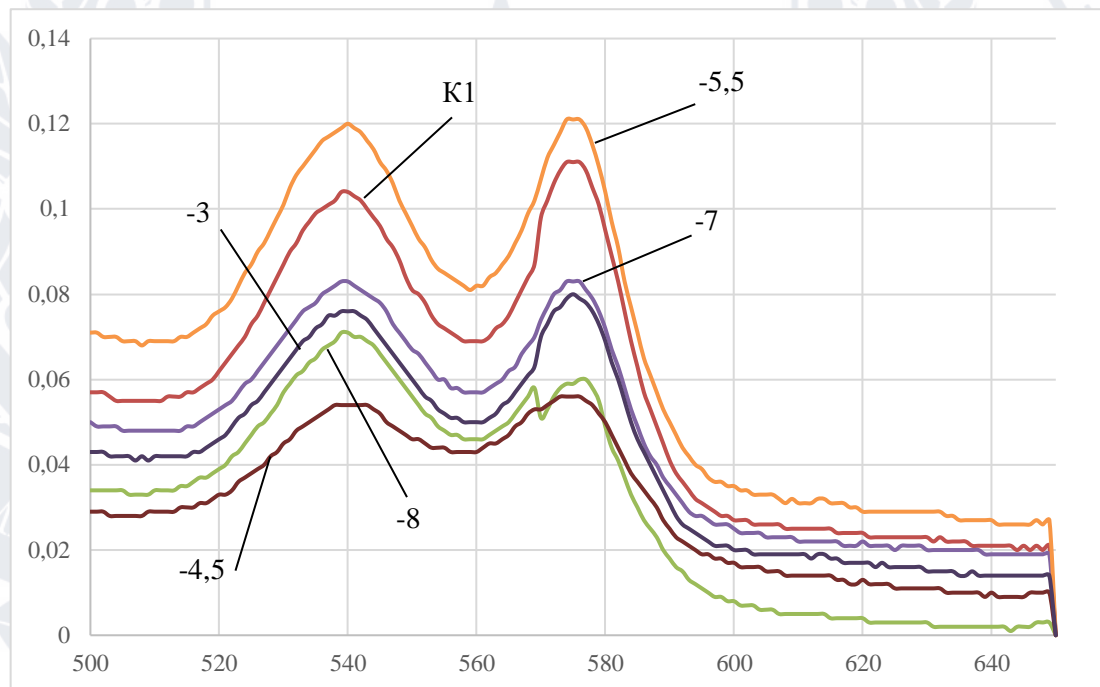


Рис. 2.1. Приклад графіку, що відображує спектри поглинання гемоглобіну, зареєстровані в мембранах еритроцитів, що інкубувалися в середовищі, з концентраціями H_2O_2 : 10^{-8} - 10^{-3} М у присутності Метіоніну концентрації 10^{-4} М. Де K1 – спектри зареєстровані для контрольної точки; (-3) – (-8) – десятковий логарифм концентрації перекису водню в точці.

Проби готувалися на основі методик, викладених у джерелах [62, 63].

Загальний вміст цитоплазматичної та мембранозв'язаної фракцій гемоглобіну, визначали за поглинанням на довжині хвилі 523 нм з використання коефіцієнту екстинції 7120 М/см [62].

Вміст лігандних форм гемоглобіну (в моль/л) обчислювали за допомогою рівнянь, наведених у [64, 65].

$$C_{SHb} = \frac{\{A_{620} - 0.46241784A_{500} + 0.10425144A_{569} + 0.066173573A_{577}\}}{19.28380181}, \quad (2.1)$$

$$C_{MetHb} = \frac{\{7.587561597A_{500} - 2.1061484A_{569} - A_{577}\}}{56.06121255}, \quad (2.2)$$

$$C_{HbCO} = \frac{\{A_{569} - 2.86651145A_{500} + 15.72636593C_{MetHb} + 6.117605743C_{SHb}\}}{2.726668607}, \quad (2.3)$$

$$C_{oxyHb} = \frac{A_{500} - 5.279A_{HbCO} - 9.067C_{MetHb} - 6.502C_{SHb}}{5.154}, \quad (2.4)$$

$$C_{SHb} = \frac{A_{630} - 0.50894752A_{500} + 0.125060228A_{569} + 0.71535595A_{578}}{13.0348879}, \quad (2.5)$$

$$C_{HbCO} = \frac{A_{569} - 2.186651145A_{500} + 15.72636593C_{MetHb} + 7.643888242C_{SHb}}{2.726668607}, \quad (2.6)$$

$$C_{MetHb} = \frac{7.384939433A_{500} - 2.014372479A_{569} - A_{578} - 31.17514683C_{SHb}}{54.48031867}, \quad (2.7)$$

$$C_{HbO_2} = \frac{A_{500} - 5.279C_{HbCO} - 9.067C_{MetHb} - 7.2C_{SHb}}{5.154} \quad (2.8)$$

Де $C(\text{oxyHb}/\text{HbO}_2, \text{MetHb}, \text{SHb}, \text{HbCO})$ – концентрація оксигемоглобіну, метгемоглобіну, сульфгемоглобіну та карбоксигемоглобіну відповідно.

Оскільки ми використовували по декілька різних рівнянь для розрахунку концентрації кожної форми гемоглобіну, в якості остаточно виведеної концентрації ми представили середній показник з цих розрахунків.

Для зручності аналізу, отримані концентрації лігандних форм Hb ми перевели в частку (%). Розрахунок вели наступним чином:

$$\frac{[\text{MetHb}.n] \cdot 100\%}{[\text{Hb}_s.n]} \quad (2.9)$$

де $[\text{MetHb}.n]$ – це концентрація метгемоглобіну в точці n (наприклад в контрольній), а $[\text{Hb}_s.n]$ – це концентрація сумарного гемоглобіну в цій самій точці.

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.

РОЗДІЛ ІІІ

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ, ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Результати аналізу розподілу лігандних форм гемоглобіну еритроцитів людини, інкубованих в середовищі H_2O_2 і метіоніну

Для оцінювання розподілу лігандних форм гемоглобіну, ми побудували графіки залежності (рис. 3.1.1 – 3.1.4). Де на осі Y представлена частка форми гемоглобіну (%), на осі X – десятковий логарифм концентрації речовини, яка додавалася в середовище інкубування із змінною концентрацією (метіонін чи перекис водню).

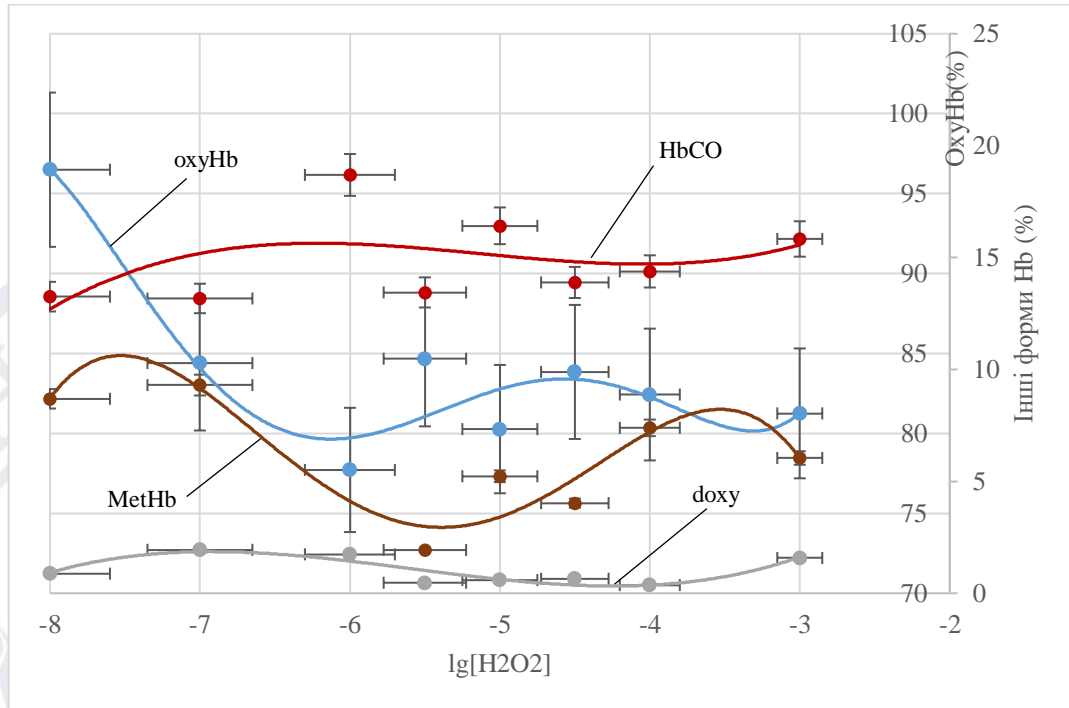
3.1.1 Вплив перекису водню на розподіл форм гемоглобіну

На рис. 3.1.1 показано розподіл лігандних форм цитоплазматичного та мембранозв'язаного гемоглобіну в еритроцитах, які були інкубовані в присутності різних концентрацій H_2O_2 .

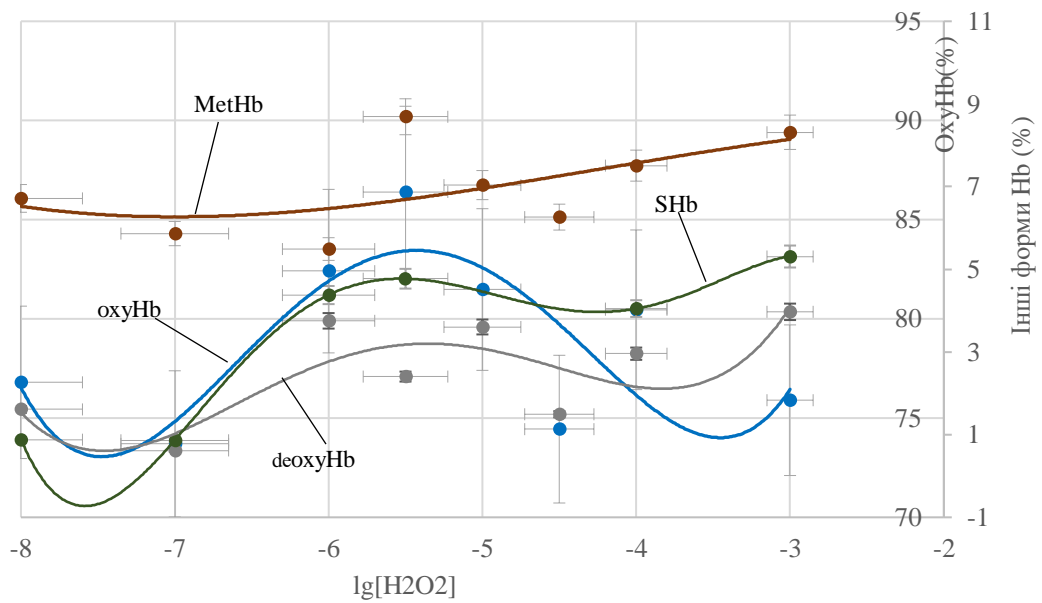
Контрольні проби для цитоплазматичного Hb показали наступний розподіл лігандних форм: $\text{oxyHb} \sim 84\%$, $\text{MetHb} \sim 7,3\%$, $\text{HbCO} \sim 9,5\%$, $\text{deoxyHb} \sim 0,8\%$.

Для мембранозв'язаного Hb показаний наступний розподіл лігандних форм: $\text{oxyHb} \sim 76\%$, $\text{MetHb} \sim 5,8\%$, $\text{SHb} \sim 0,28\%$, $\text{deoxyHb} \sim 4,4\%$.

З графіку, що наведений на рис. 3.1.1. (А), де показана цитоплазматична фракція Hb, ми бачимо, що рівень оксигемоглобіну піднявся до 95% за концентрації H_2O_2 10^{-8} М, але всі інші точки (включно з контролем), демонструють, що oxyHb утримується в межах 80-85%, що є несуттєво нижчим за норму (Нормальний вміст oxyHb складає 94-100%). Конкретних змін у відповідь на окисне навантаження - не виявлено, в порівнянні з контролем: де вміст oxyHb складав 83-84 %, тоді як у точках з перекисом (на інтервалі концентрацій 10^{-7} - 10^{-3} М) ми можемо спостерігати несуттєве зниження oxyHb на 1-2%. Рівень карбоксигемоглобіну в контролі складає близько 9%, при збільшенні навантаження H_2O_2 спостерігається приріст частки даної форми до 13-15%, що є вищим за нормальні показники: 2-5% [25].



А



Б

Рис. 3.1.1. Розподіл лігандних форм (%) гемоглобіну цитоплазматичної (А) та мембранозв'язаної фракції (Б) у складі еритроцитів, що інкубували з додаванням H_2O_2 в діапазоні $10^{-8} - 10^{-3}$ М.

Вміст deoxyHb не демонструє суттєвих змін (частка складає до 3% [23]). Вміст метгемоглобіну не виявляє особливих тенденцій до змін майже на всіх інтервалах концентрацій H_2O_2 (його рівень складає близько 6-8%, нормальний вміст MetHb – в межах 1- 3%. [16]). Ці показники хоча є більшими за норму, але в контрольних пробах, які інкубувалися годину вони також складають близько 7%.

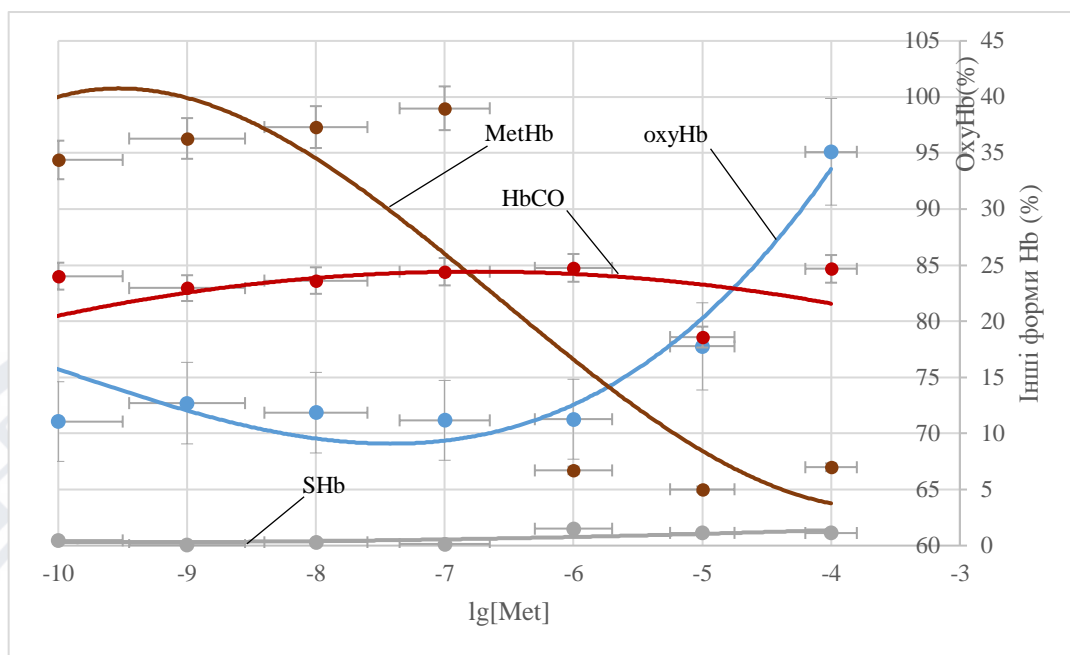
З рис. 3.1.1 (Б), можемо побачити, що збільшення концентрації H_2O_2 в середовищі інкубування впливає на рівень оксигемоглобіну мембранозв'язаної фракції наступним чином: в діапазоні концентрацій перекису 10^{-8} – 10^{-5} М оксигемоглобін зростає від 75% (приблизно така його кількість і в контрольних пробах) до 80-85%, але в діапазоні 10^{-5} - 10^{-3} М рівень охуHb знижується до рівня контролю. Вміст мембранозв'язаного метгемоглобіну (MetHb) в порівнянні з діапазоном мінімальних концентрацій H_2O_2 і контрольними пробами без перекису (частка 5,8%) зростав до 8-9%. Досить вираженим є приріст сульфгемоглобіну (SHb) мембранної фракції – до 5% (в порівнянні з контролем, де рівень складав до 1%). Також спостерігався приріст мембранного дезоксигемоглобіну – його рівень збільшувався в дослідженому діапазоні H_2O_2 від 1 до 3%.

3.1.2 Вплив метіоніну на розподіл форм гемоглобіну

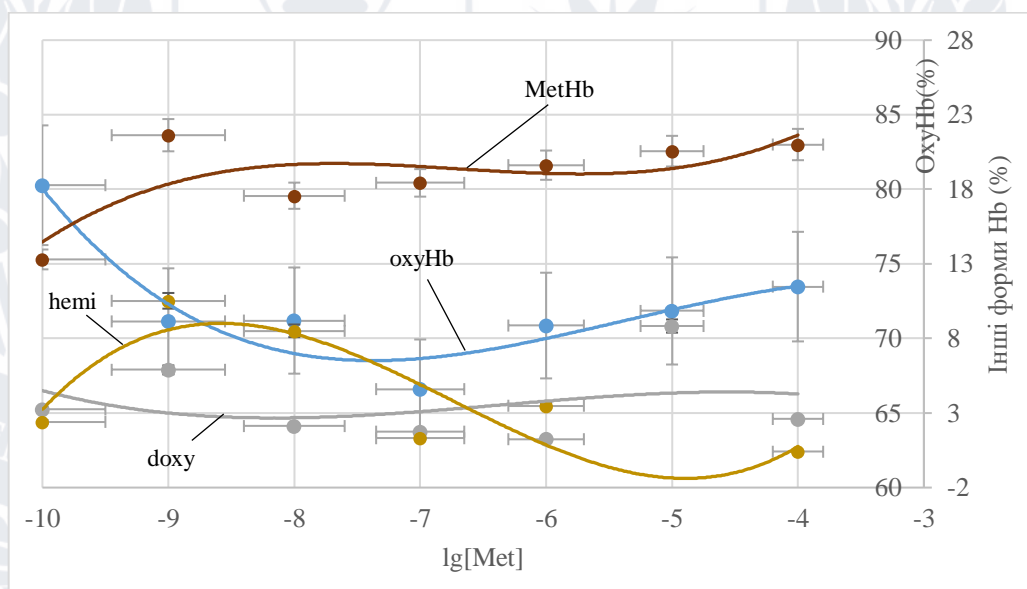
На рис. 3.1.2 показано розподіл лігандних форм цитоплазматичного та мембранозв'язаного гемоглобіну в еритроцитах, які були інкубовані в присутності різних концентрацій метіоніну.

Контрольні проби для цитоплазматичного Hb показали наступний розподіл лігандних форм: охуHb ~ 81%, MetHb ~ 9%, HbCO ~ 10%, deoxyHb ~ 0%.

Для мембранозв'язаного Hb показаний наступний розподіл лігандних форм: охуHb ~ 80%, MetHb ~ 14%, hemi ~ 2,3%, deoxyHb ~ 1,5%.



A



Б

Рис. 3.1.2. Розподіл лігандних форм (%) гемоглобіну цитоплазматичної (А) та мембранозв'язаної фракції (Б) у складі еритроцитів, що інкубували з додаванням метіоніну в діапазоні концентрацій 10^{-10} – 10^{-4} М.

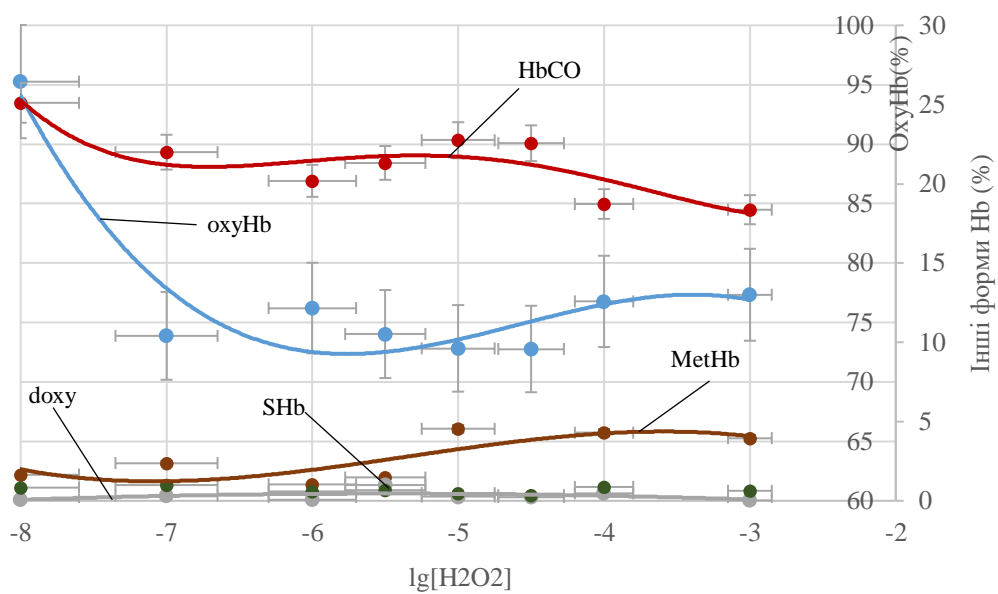
З графіку на рис. 3.1.2 (А) ми можемо побачити, що збільшення концентрації метіоніну (у інтервалі від 10^{-10} М, до 10^{-6} М включно) показує знижений вміст цитоплазматичного oxyHb: у контрольних пробах без метіоніну, рівень оксигемоглобіну складає близько 80%, тоді як в пробах, де

концентрація метіоніну була більшою – рівень знизився до меж 70-73%, але в пробах, де концентрація Met була максимальною (10^{-5} , 10^{-4} M) рівень оксигемоглобіну істотно виріс до 95%. Рівень HbCO в контрольних пробах складав 15-20%, тоді як в усіх точках з метіоніном частка цієї форми є вищою (близько 23-24%). Дезоксигемоглобін цитоплазматичної фракції в усіх точках (включно з пробами) відсутній, окрім трьох проб, де концентрація метіоніну була найбільшою (від 10^{-6} до 10^{-4} M), частка deoxyHb зросла не істотно – до 1%. Цитоплазматичний метгемоглобін показав певну залежність від концентрації метіоніну. У контрольних точках, а також у пробах, де концентрація Met була невеликою (10^{-10} - 10^{-7} M), вміст MetHb складав 35-36%, але на інтервалі концентрацій Met 10^{-6} - 10^{-4} M, рівень знизився майже в 6-7 разів (до 5-6%).

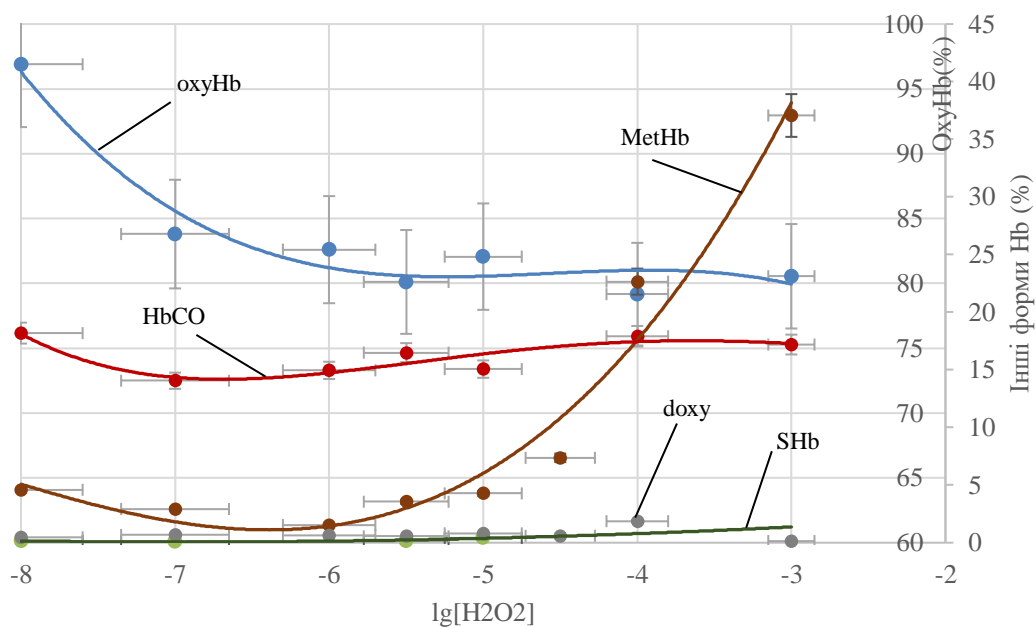
На рис 3.1.2 (Б), показаний значний приріст метгемоглобіну (з 14% до 21%) у складі мембранозв'язаної фракції в кореляції з ростом концентрації метіоніну. Рівень MetHb майже вдвічі перевищував показники експерименту, де був виключно перекис водню в середовищі інкубування. Також у складі мембранозв'язаного гемоглобіну фіксується геміхром в діапазоні концентрацій метіоніну 10^{-11} - 10^{-6} M. Рівень oxuHb знизився приблизно на 10%, в порівнянні з показниками проб, де метіонін був у мінімальних концентраціях або відсутній. Вміст дезоксигемоглобіну тримався в межах 5% як за мінімальних, так і при максимальних концентраціях метіоніну. Сульфгемоглобіну у складі мембранозв'язаної фракції не було виявлено.

3.1.3 Вплив поєднаного впливу перекису водню та метіоніну на розподіл форм гемоглобіну

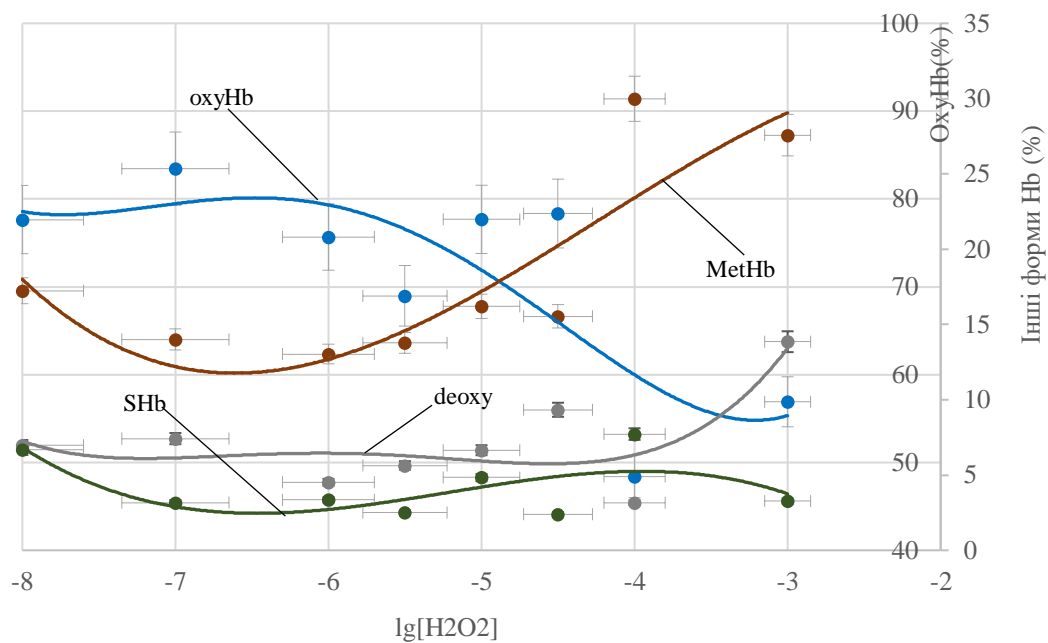
На графіках, що представлені рисунками 3.1.3 (А-Г) показаний розподіл лігандних форм цитоплазматичного та мембранозв'язаного гемоглобіну еритроцитів, що інкубувалися в умовах одночасного впливу перекисного навантаження із присутністю метіоніну фіксованої концентрації.



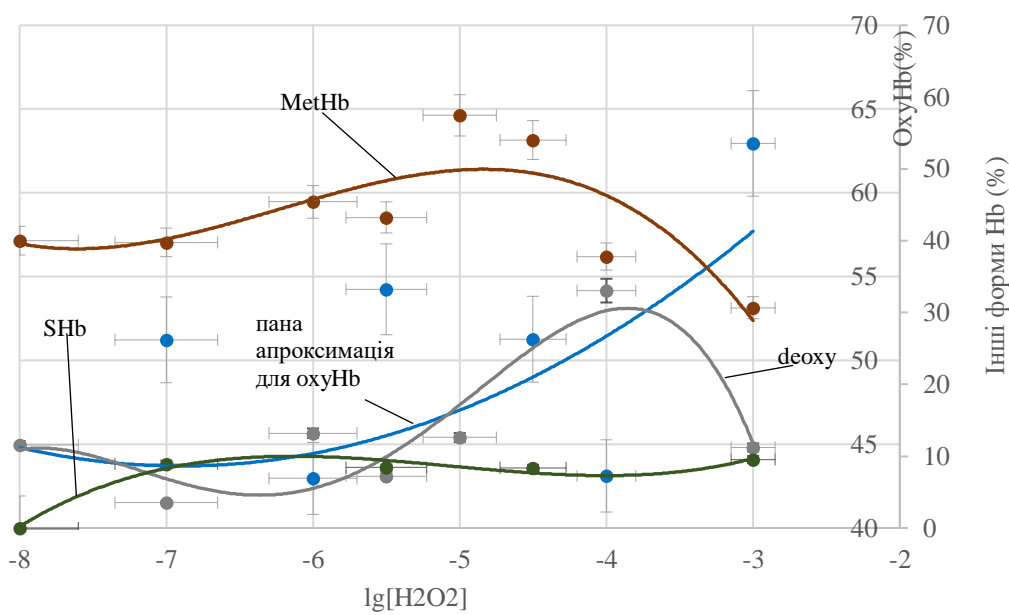
А



Б



B



Г

Рис. 3.1.3. Розподіл лігандних форм (%) гемоглобіну цитоплазматичної (А, Б) та мембранозв'язаної фракції (В, Г) у складі еритроцитів, що інкубували в середовищі фіксованої кількості метіоніну у концентрації 10^{-6} (А, В) та 10^{-4} М (Б, Г) відповідно. Вміст H_2O_2 варіювали в діапазоні 10^{-8} – 10^{-3} М.

Для досліду, де концентрація метіоніну була 10^{-6} М. Контрольні проби для цитоплазматичного Hb показали наступний розподіл лігандних форм: охуHb ~ 69%, MetHb ~ 1,2%, HbCO ~ 25%, deoxyHb ~ 0,18%.

Для мембранозв'язаного Hb показаний наступний розподіл лігандних форм: охуHb ~ 75%, MetHb ~ 16%, SHb ~ 6%, deoxyHb ~ 7%.

Для досліду, де концентрація метіоніну була 10^{-4} М. Контрольні проби для цитоплазматичного Hb показали наступний розподіл лігандних форм: охуHb ~ 79%, MetHb ~ 0,25%, HbCO ~ 17,5%, deoxyHb ~ 0,05%.

Для мембранозв'язаного Hb показаний наступний розподіл лігандних форм: охуHb ~ 66%, MetHb ~ 23%, SHb ~ 9%, deoxyHb ~ 11%.

З рисунку 3.1.3 (А) ми спостерігаємо зниження рівнів цитоплазматичної фракції охуHb та HbCO. Вміст оксигемоглобіну у контрольній пробі, яка досліджувалася без інкубації а також в точці, де перекис водню був у концентрації 10^{-8} складав 84-95% , але у інтервалі концентрацій H_2O_2 10^{-7} - 10^{-3} М знизився до меж 72-77%. Вміст карбоксигемоглобіну в контрольних точках та за концентрації H_2O_2 10^{-8} М складав близько 25%, проте в діапазоні більших концентрацій перекису (10^{-7} - 10^{-5} М) наявний у меншій кількості –22%, а за найбільших доз H_2O_2 (10^{-4} - 10^{-3} М) – знизився ще – до 18%. Частка цитоплазматичного MetHb показує неістотне зростання: в контролі показники сягали близько 1%, але при збільшенні концентрації перекису, особливо у діапазоні 10^{-5} - 10^{-3} М, вміст метгемоглобіну виріс до 4%. Частка цитоплазматичного дезоксигемоглобіну в усіх точках складає до 1%. Спостерігається сульфгемоглобін, але його вміст не сягає навіть 1% і не демонструє залежностей.

У експерименті, де фіксована концентрація метіоніну була збільшена до 10^{-4} М (Рис 3.1.3 (Б)), вміст цитоплазматичного оксигемоглобіну демонструє схожу тенденцію: у точці з мінімальним вмістом перекису водню (10^{-8} М) частка охуHb складає 96% - це більше ніж в контролі (де частка складає 74-79%), але при збільшенні концентрації перекису (10^{-7} - 10^{-3} М), рівень охуHb знизився до межі 82-80%. Рівень карбоксигемоглобіну не відрізняється від

контрольних точок і складає близько 15-18%. Вміст MetHb за концентрацій перекису 10^{-8} М складає $\sim 4\%$, в контрольних пробах – 0,3%. В діапазоні концентрацій перекису 10^{-7} - 10^{-6} М, частка MetHb в цитоплазмі знижується до 1,5%, проте на інтервалі (10^{-5} - 10^{-3}) концентрацій H_2O_2 – демонструється зростання: ~ 7 - 22 - 37% , тобто збільшення у вигляді арифметичної прогресії, де вміст метгемоглобіну кожної наступної точки на ϵ 15% більшим. Форми сульфгемоглобіну та дезоксигемоглобіну спостерігаються у приблизно ідентичній кількості відповідно до показників, зображених на рис 3.1.2 (А).

На рисунках 3.1.3 (В, Г) 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 наявності метіоніну у середовищі інкубування у концентрації 10^{-6} М спостерігали суттєве збільшення вмісту мембранного метгемоглобіну (до 30%) при підвищенні концентрації H_2O_2 . Цей показник істотно більший, ніж у дослідях окремо з перекисом (збільшення вмісту MetHb до 9%) чи метіоніном (збільшення вмісту MetHb до 20%) (рис. 3.1.3 (В)). Рівень охуHb мембранної фракції, відповідно, знижувався від 80 до 60 % при зростанні концентрації H_2O_2 . Підвищення концентрації метіоніну в середовищі інкубування еритроцитів до 10^{-4} М привела до збільшення рівня MetHb в мембранах до 45-50% за умов високих концентрацій перекису.

В усіх пробах де метіонін присутній в поєднанні з перекисом (рис. 3.1.3 В, Г), вміст дезоксигемоглобіну у складі мембранозв'язаної фракції є більшим майже в 2 рази, ніж в еритроцитах, які інкубувалися виключно з перекисом чи метіоніном. Вміст SHb у складі мембранозв'язаного гемоглобіну за умов інкубування де концентрація метіоніну 10^{-6} М, перебував в межах 3-5% (рис. 3.1.3 (В), тобто його рівень майже не змінився порівняно з показниками дослідів, 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 3.1.3 (Г)).

3.1.4 Вплив умов інкубування еритроцитів на кількість гемоглобіну мембранозв'язаної фракції

На рисунку 3.1.4 показаний графік, де відображені зміни загальної кількості мембранозв'язаного гемоглобіну, залежно від умов, в яких інкубувалися еритроцити, де вісь X – концентрація перекису водню, вісь Y – кількість мембранозв'язаного гемоглобіну (мкмоль).

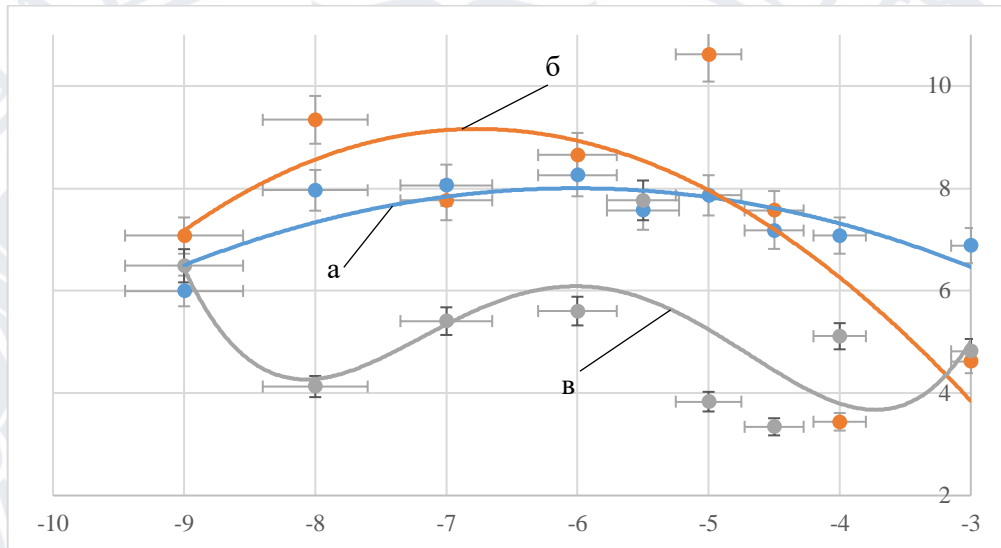


Рис. 3.1.4. Зміна кількості мембранозв'язаного гемоглобіну в еритроцитах, що інкубувалися: а) у середовищі перекису водню; б) у середовищі H_2O_2 , у присутності фіксованої концентрації метіоніну (10^{-6} М); у середовищі H_2O_2 , у присутності фіксованої концентрації метіоніну (10^{-4} М).

З графіку на рис 3.1.4 ми можемо побачити, що при інкубуванні в середовищі виключно перекису, кількість гемоглобіну мембранозв'язаної фракції зростає до меж 7-8 мкмоль, тоді як в контролі рівень мембранного Нв складає близько 6 мкмоль. Присутність метіоніну в концентрації 10^{-6} М не виявляє особливих відмінностей в контролі та на інтервалі концентрацій перекису 10^{-8} - 10^{-5} М, але при збільшенні окисного навантаження ($5 \cdot 10^{-5}$ - 10^{-3} М) вміст гемоглобіну знизився до 3-4 мкмоль.

За концентрації метіоніну 10^{-4} М в точках, рівень гемоглобіну мембранозв'язаної фракції тримається в межах 4-5 мкмоль, доді як в контролі його рівень складає 6 мкмоль.

3.2 Обговорення

Встановлено, що еритроцити мають досить специфічні та різноманітні механізми пристосування та адаптивних відповідей на зміну умов існування. Постійна взаємодія еритроцитів з киснем зумовлює розвиток негативного накопичувального ефекту – окисного стресу – явища, яке може спричинити чисельні порушення в метаболічних процесах червоних клітин крові. Відповідно, метаболічна система еритроцитів має забезпечувати надійний антиоксидантний захист [66]. На сьогодні 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 [67]. Виходячи з вищезазначеного ми обрали перекис водню, в якості чинника, який має створювати окисний стрес в еритроциті, тим самим впливаючи на вміст лігандних форм Hb.

Метіонін був обраний нами для дослідження циклу S-аденозилметіоніну в метаболічній мережі червоних клітин, та його ролі в протидії окисному навантаженню еритроцита. Відповідно до розглянутої нами літератури в розділі I, метіонін є субстратом для циклу SAM, який є притаманним для метаболізму більшості клітин [49]. Зазначається зокрема можливий зв'язок циклу SAM із циклом глутатіону, посередництвом цистеїну, який за умов недостатнього зовнішнього надходження, може синтезуватися внутрішньоклітинно з гомоцистеїну, який виробляється і циклі SAM, за участі ферменту цистоціонін- β -синтази (CBS) [34].

Ми досліджували вплив H_2O_2 , метіоніну, а також поєднаного впливу H_2O_2 і метіоніну на стан цитоплазматичного та мембранозв'язаного гемоглобіну в еритроцитах. Згідно наших припущень, розподіл лігандних форм гемоглобіну має змінюватися в залежності від середовища, в якому еритроцити інкубувалися.

Для цитоплазматичної фракції Hb виявлено наступне. Частка оксигемоглобіну в еритроцитах, що інкубувалися з перекисом водню, незалежно від наявності метіоніну особливих змін не виявляє і демонструє схожий розподіл (80-85%) на графіках (рис. 3.1.1 (А)-3.1.2 (А, Б)). У експерименті, де еритроцити інкубувалися виключно із метіоніном в середовищі (рис. 3.1.1 (Б)), цитоплазматичний оксигемоглобін показав зниження з 81 до 70 % на інтервалі концентрацій метіоніну 10^{-10} - 10^{-6} М, тобто ми спостерігаємо стан, який можна прирівняти до гіпоксії. Але при зростанні концентрації Met до 10^{-5} - 10^{-4} М рівень ОхуHb значно підвищився: до 95%. Важливо відмітити, що при цьому загальна кількість гемоглобіну в усіх точках є приблизно однаковою, отже метіонін спричинив певний вплив на можливість гемоглобіну зв'язувати кисень. Ми спостерігаємо кореляцію між рівнем оксигемоглобіну та метгемоглобіном в цьому ж експерименті: вміст MetHb цитоплазматичної фракції в контролі та пробах з концентрацією метіоніну 10^{-10} - 10^{-6} , зріс до 35-36%, тоді як, обернено до зростання цитоплазматичного охуHb, за концентрації Met до 10^{-5} - 10^{-4} М, рівень метгемоглобіну знизився до 5-6%, тобто в 6-7 разів. Такий результат може свідчити про те, що за вказаних концентрацій метіоніну еритроцити відновили здатність зв'язувати кисень, в той час як година інкубування, ймовірно, суттєво вплинула на функціональні можливості червоних клітин. Це підтверджується, якщо порівняти контрольні проби: ті, які були проаналізовані одразу після приготування містили усього 1% MetHb, тоді як після години інкубування частка зросла до 35%. Це можна пояснити тим, що буферний розчин 1, в якому інкубувалися еритроцити не міг забезпечувати повною мірою метаболічні потреби клітин. З цією проблемою також стикаються при зберіганні крові для переливання. У роботі [68] зазначено, що донорські еритроцити істотно змінюються під час обробки та зберігання таким чином, що погіршується ефективність транспортування кисню. Великі біофізичні та фізіологічні зміни функції еритроцитів, що виникають внаслідок накопичення, називаються «ураженням накопичення». Можливо,

метіоніновий цикл здатний підтримувати функціональність цитоплазматичного гемоглобіну через метилювання [59], або іншим, посереднім метаболічним шляхом (наприклад через синтез нуклеотидів [53]).

Ще одним маркером деструктивних процесів у метаболізмі еритроцитів ми можемо назвати карбоксигемоглобін цитоплазматичної фракції, який є істотно вищим за норму в усіх точках. Як ми зазначили в розділі I, накопичення CO і утворення HbCO відповідно, може бути спричинене як під впливом вільнорадикального окислення, так і через інші порушення в гомеостазі еритроцитів [26]. Якщо вміст HbCO (15-20%) у групах еритроцитів, які інкубувалися з перекисом можливо пояснити вільнорадикальним впливом останнього, то причину, за якої в точках, де перекису не було, а вміст HbCO все одно високий, назвати вже складніше (в контрольних пробах, а також в точках з метіоніном різної концентрації, рівень HbCO – 15-25%). Хоча на графіку 3.1.2 (А) ми бачимо незначне зниження вмісту цієї форми, конкретних тенденцій чи певних кореляцій між умовами інкубування та рівнем карбоксигемоглобіну в цитоплазмі не спостерігаємо.

Дезокси та сульфідні форми гемоглобіну цитоплазматичної фракції також не показали залежностей, їх рівень здебільшого ледь сягав 1%.

Аналіз розподілу форм гемоглобіну мембранозв'язаної фракції, як і очікувалося – показав достатньо відмінні результати від тих, що ми бачимо у цитоплазматичному Hb. В експерименті, де еритроцити інкубувалися в середовищі, яке містило тільки перекис водню, ми можемо побачити досить типові наслідки: рівень $oxHb$ коливається в межах 75-85%, що є меншим за норму, але не критично. Важливо відмітити, що на інтервалі концентрацій перекису 10^{-6} - 10^{-4} M, тобто для більшості точок з перекисом, ми спостерігаємо більшу частку оксигемоглобіну ніж у контролі. Ці результати корелюють з підвищенням вмісту дезоксигемоглобіну. Зауважимо, що частка $deoxHb$ мембранозв'язаної фракції є більшою в декілька разів для усіх точок (включно з точками з експериментів за участю метіоніну), у порівнянні з цитоплазматичною фракцією. Більший вміст мембранного $deoxHb$

пояснюється в розглянутих у розділі I джерелах, де зазначається, що через взаємодію з мембранним білком еритроциту (band3) дезоксигенований Hb, залежно від окисного навантаження, змінює енергетичний обмін, морфологію та деформованість еритроцитів [12]. Це пояснює, чому при зростанні концентрації перекису водню зростала також частка deoxyHb. Проте в контрольних точках рівень мембранозв'язаного deoxyHb був вищим ніж у пробах, де концентрація H₂O₂ складала 10⁻⁸ та 10⁻⁷ М. Найбільш ймовірним поясненням може бути активність еритроцитарних ферментів, що взаємодіють з перекисом – наприклад каталази, яка діє на мембранах еритроцита: каталізує реакцію розщеплення перекису водню до кисню та води [17, 69, 70].



Можливо, перекис водню у незначних концентраціях може виступати джерелом кисню для еритроцита, таким чином рівень deoxyHb був знижений, тоді як частка oxyHb – більшою. Однак за високих концентрацій H₂O₂, рівень оксигенованого гемоглобіну впав з 80-85% до 75%, що видно на інтервалі концентрацій перекису 10⁻⁶-10⁻³ М. На цьому ж інтервалі ми спостерігаємо характерний для окисного стресу в еритроцитах розподіл лігандних форм гемоглобіну. Окрім зростання дезоксигемоглобіну з 0,5 до 4%, також виросла частка метгемоглобіну (з 5% у контролі до 8% за концентрації H₂O₂ 10⁻³ М). Також ми спостерігаємо істотне зростання сульфгемоглобіну: в контролі його частка складала до 1%, але разом із збільшенням концентрації перекису, його частка зросла до понад 5%. Як і MetHb, встановлено, що SHb може утворюватися в наслідок окисних процесів у еритроциті [28]. Можливо сірка утворюється в наслідок деструктивних процесів, або надходить з системи глутатіону – поки немає остаточної доведених процесів [29, 30].

В експериментах, де ми залучили метіонін, спостерігаються досить суттєві зміни розподілу лігандних форм. Найбільші відмінності демонструє метгемоглобін. В контрольних точках вміст MetHb складав 14%, при збільшенні концентрації метіоніну від 10⁻¹⁰ до 10⁻⁴ М показане зростання

частки MetHb до 21%. Відповідно – частка оксигемоглобіну знижена, адже, як ми бачимо – значний відсоток гемоглобіну був окислений до форми MetHb, а також геміхрому, який спостерігається в цьому досліді у кількості 3-8%, але на інтервалі концентрацій Met (10^{-10} - 10^{-6} M). Для геміхрому (похідного від метгемоглобіну) характерно накопичуватися в мембранах еритроцита, він, як і дезоксигемоглобін зв'язується з білком смуги 3 [21]. Це може пояснювати, чому частка мембранозв'язаного deoxyHb в цьому експерименті є найменшою (близько 3%) в порівнянні з показниками експериментів, де залучений перекис, а також - за відсутності геміхрому.

У дослідях, де еритроцити інкубувалися поєднано з перекисом та метіоніном (фіксованої концентрації) ми спостерігаємо наступну тенденцію: чим більшою була концентрація метіоніну в пробах, тим вищою була частка метгемоглобіну при наростанні окисного навантаження. За концентрації метіоніну MetHb 10^{-6} M зростав з 10-15 до 30%, тоді як при концентрації 10^{-4} M – до 40-50%. Отже, ми бачимо, що метіонін зумовлює зростання мембранозв'язаного MetHb, і цей ефект посилюється при навантаженні перекисом водню. Ми припускаємо, що такий ефект може бути наслідком взаємопов'язаності метаболічних циклів SAM, субстратом якого є метіонін та глутатіону, який має активно діяти, за-для знешкодження вільних радикалів, тобто перекису водню.

Розглянемо все по порядку. Глутатіон є основною антиоксидантною системою еритроцитів [36]. Надходження GSH чи амінокислот, з яких він синтезується ззовні – неможливо, виходячи з умов, у яких червоні клітини інкубувалися. Отже, глутатіон має синтезуватися ендогенно, за рахунок ресурсів, які наявні в еритроцита. Стосовно метгемоглобіну: якби його накопичення було б зумовлене лише окисною діяльністю пероксиду водню, кількість цієї форми Hb навряд би збільшувалася при додаванні метіоніну. В якості аргументу можна навести те, що в нашому досліді MetHb активно накопичувався без участі перекису взагалі. Це дозволяє припускати, що саме метіонін може впливати на дану форму гемоглобіну. Воходячи з того, що

метгемоглобін здатний зв'язувати сульфовмісні молекули (здебільшого гідроген сульфід) [41], найбільш ймовірним виглядає можливість його накопичення саме через сірководень, який утворюється в процесах, пов'язаних із циклом S-аденозилметіоніну. H_2S не міг надходити ззовні, найбільш вірогідним його ендogenous джерелом може бути метаболізм цистеїну, як зазначалося в роботі [38] у розділі I. Якщо проводити аналогію з клітинами інших тканин, де цикл GSH підтримується за рахунок метаболізму цистеїну, основним постачальником якого є цикл SAM [46], стає зрозумілим, що названий цикл може працювати аналогічним чином і в еритроцитах. Відповідно серед метаболітів червоних тілець має також бути фермент цистатіонін- γ -ліаза, який має каталізувати перехід гомоцистеїну в цистатіонін – попередник цистеїну, який вже надходить у цикл глутатіону [46].

Утворення сульфгемоглобіну мембранозв'язаної фракції спостерігається в усіх точках, де вводився перекис водню. Проте найбільше його накопичення (8-9%) ми спостерігаємо при поєднаному впливі H_2O_2 та метіоніну концентрації 10^{-4} М. Це узгоджується з даними описаними вище, адже, як зазначалося у роботі [29], джерелом сірки для утворення SHb може бути цикл глутатіону. Ця форма гемоглобіну – не відновлюється і поки вважається безкорисною для метаболізму еритроцитів [28]. Утворення SHb в такій кількості може говорити, що еритроцит не здатний підтримувати свій метаболізм на нормальному рівні, можливо, концентрація метіоніну 10^{-4} М є занадто високою, і тому, сірководень, що можливо утворився з надлишком в ході реакцій циклів SAM і GSH, почав приєднуватися до гемоглобіну. Більша частина H_2S , ймовірно, зв'язується метгемоглобіном, який потім здатний повільно відновлюватися до нормальної деоксигенованої форми гемоглобіну [40]. Це пояснює, чому саме мет-, а не сульф- форми гемоглобіну утворюється найбільше. І, можливо, збільшення deoxyHb в цьому досліді до понад 10% може вказувати не тільки на адаптаційні механізми [24], але також на процеси відновлення MetHb.

Якщо проівнювати розподіл лігандних форм гемоглобіну цитоплазматичної та мембранозв'язаної фракцій, то ми можемо спостерігати істотну різницю. Наприклад в експериментах, де еритроцити інкубувалися виключно з метіоніном, цитоплазматичний метгемоглобін знизився в декілька разів, тоді як мембранозв'язаний – навпаки збільшувався, хоча при поєднаному впливі метіоніну концентрації 10^{-4} М та H_2O_2 (10^{-5} - 10^{-3} М) вміст цитоплазматичного метгемоглобіну також піднявся, всі інші показники схожих тенденцій не показують. На даний момент єдиним поясненням можливо назвати функціональні розбіжності між цитоплазматичним та мембранозв'язаним гемоглобіном. Як зазначалося, зв'язування з мембраною гемоглобіну є адаптаційною відповіддю на зміну умов, зокрема на окисний стрес. Можливо, гемоглобін окислюється до мет форми, зв'язується з мембраною, де відновлюється, пов'язуючись з сірководнем, утвореним в метаболізмі SAM-GSH, а після відновлення до двовалентного стану та насичення киснем, за участі знову ж таки H_2S повертається в цитозоль [42]. Таким чином можна пояснити низький вміст MetHb в цитоплазмі, та його надмірне накопичення в мембранах разом з дезоксигемоглобіном.

Ще одним підтвердженням описаних вище процесів можна назвати залежність загальної кількості мембранного Hb від умов інкубування еритроцитів (рис. 3.1.4): при збільшенні окисного навантаження за одночасного більшого вмісту метіоніну в клітинах – рівень мембранозв'язаного гемоглобіну демонструє зниження. Такий ефект є демонстрацією того, що метіоніновий цикл (ймовірно посередництвом H_2S) підтримує антиоксидантні механізми еритроцита, а також сприяє відновленню гемоглобіну в умовах стресу.

ВИСНОВКИ

1) Показано, що перекисне навантаження спричиняє достатньо типові зміни співвідношення форм гемоглобіну, що характерно для окисного стресового стану в еритроциті: підвищення рівню метгемоглобіну в обох фракціях, накопичення deoxyHb та SHb в мембранах, та HbCO в цитоплазмі. Відповідно, рівень окисенованого гемоглобіну, хоча й не істотно – знижується.

2) Виявлено, що збільшення концентрації метіоніну в середовищі інкубування еритроцитів зумовлює наступний перерозподіл форм гемоглобіну: рівень MetHb знижується в цитоплазматичній фракції і накопичується в мембранній, при цьому спостерігається відповідна кореляція з oxyHb – підвищення рівня в цитоплазмі та зниження в мембранах. Дезоксигемоглобін також демонструє накопичення в мембранній фракції.

3) Встановлено, що за одночасного посилення окисного навантаження та збільшення концентрації метіоніну в середовищі інкубування, загальна кількість мембранозв'язаного гемоглобіну зменшується в порівнянні з кількістю, яка зареєстрована при інкубації з перекисом водню. При цьому в мембранній фракції істотно накопичується метгемоглобін та дезоксигемоглобін, тоді як окисенований гемоглобін підтримувався на більш-менш нормальному, стабільному рівні у цитоплазматичній фракції. Також спостерігається істотне підвищення рівню сульфгемоглобіну, в порівнянні з показниками цієї форми в інших експериментах.

4) Проведені дослідження показують, що метіонін суттєво впливає на розподіл лігандних форм гемоглобіну, а також на його зв'язування з мембраною еритроцита. Накопичення сульфгемоглобіну, мет і дезокси- форм в мембранній фракції вказує на взаємодію гемоглобіна з сірководнем.

5) Отримані результати не дають повної можливості остаточно закрити всі прогалини та неточності, які на сьогодні присутні в метаболічній мережі еритроцитів. Проте вони дають підґрунтя для подальших досліджень. В перспективі є проведення повторних дослідів цього напрямку, із варіюванням

умов експерименту, що дозволить більш точно оцінити процеси, які оговорювалися вище.



СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ТА ЛІТЕРАТУРИ

1. Ingley E., Klinken S.P. Erythrocytes. Encyclopedia of Respiratory Medicine, 2006.
2. Castoldi G.L., Senno Ld., Erythrocytes. Encyclopedia of Immunology (Second Edition), 1998.
3. Franco R., Navarro G., & Martínez-Pinilla E. Antioxidant Defense Mechanisms in Erythrocytes and in the Central Nervous System. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2019. 8(2), 46.
4. May J.M. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. Front Biosci. 1998; 3:d1-10.
5. Krieger G. R., Philips S.D., Blood. Encyclopedia of Toxicology (Second Edition), 2005.
6. Wittenberg J.B., Wittenberg B.A. Mechanisms of Cytoplasmic Hemoglobin and Myoglobin Function. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry 1990 19:1, 217-241.
7. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Гемоглобины – разнообразие структур и функций (обзор). Прикладная биохимия и микробиология, 2009, том 45, № 6, с. 627-653.
8. Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Альтернативные и дополнительные функции эритроцитарного гемоглобина. Обзор. Биохимия, 2019, том 84, вып. 1, с. 3 – 23/
9. Bose T., Bhattacharjee A., Banerjee S., Chakraborti A.S. Methylglyoxal-induced modifications of hemoglobin: structural and functional characteristics. Arch Biochem Biophys. 2013; 529(2):99-104. doi: 10.1016/j.abb.2012.12.001.
10. Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Тимофеева А.Я., Топунов А.Ф., Шумаев К.Б. Карбонильный стресс в эритроцитах: роль гемоглобина. материалы Международной конференции IT + M&Eс`2015. Весенняя сессия.
11. Насыбуллина Э.И., Блиндарь В.Н., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Связывание эритроцитарного гемоглобина с мембраной как способ

- осуществления сигнально-регуляторной функции (обзор). Прикладная биохимия и микробиология, 2019, том 55, No 2, с. 107–123.
12. Tsuneshige A., Imai K., Tyuma I., The Binding of Hemoglobin to Red Cell Membrane Lowers Its Oxygen Affinity, *The Journal of Biochemistry*, Volume 101, Issue 3, March 1987, Pages 695–704.
 13. Sherwood R.A. Haemoglobins (hemoglobins). *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, 2005.
 14. Weiss D.J., Tvedten H. Erythrocyte Disorders. *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods (Fifth Edition)*, 2012.
 15. Kreuzer J. Oxygen saturation. Technical University of Munich, Germany. 2020.
 16. Lee Goldman M.D. Approach to the Anemias. *Goldman-Cecil Medicine*, 2020.
 17. Everse J. Heme Proteins *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, 2013.
 18. Umbreit J. Methemoglobin – it's not just blue: a concise review. *Am J Hematol.* 2007 Feb;82(2):134-44. doi: 10.1002/ajh.20738. PMID: 16986127.
 19. Coopera C.E., Silaghi-Dumitrescu R., Rukengwaa M., Alayashb A.I., Buehler P.W. Peroxidase activity of hemoglobin towards ascorbate and urate: A synergistic protective strategy against toxicity of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers (HBOC). *Biochimica et Biophysica Acta* 1784. 2008. 1415–1420.
 20. Cooling L. The RBC as a Physiological Object. *Pathobiology of Human Disease*, 2014), (Rehman H.U. Methemoglobinemia. *West J Med.* 2001 Sep;175(3):193-6.
 21. Molchanova T., Alpha and Beta human hemoglobins. Hemichromes and their stability according to the proteolysis in vitro. Engelhardt Institute Molecular Biology, Russian Academy of Sciences and Hematological Scientific Center, Moscow, Russia. 1981.
 22. Harvey J.W. The Erythrocyte. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Sixth Edition)*, 2008.
 23. Brown G.G. Magnetic Resonance Imaging as a Tool for Modeling Drug Treatment of CNS Disorders. *Translational Neuroimaging*, 2013.

24. Chu H., Breite A., Ciralo P., Franco R.S., Low P.S. Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O₂ regulation of erythrocyte properties. *Blood*. Vol. 111 (2): 932–938. 2008.
25. Otto C.N. Hemoglobin metabolism. *Rodak's Hematology (Sixth Edition)*, 2020.
26. Kursov S., Nikonov V., Biletskyi O., Feskov O. Formation of excessive amount of endogenous carbon monoxide and increase of carboxylated hemoglobin content in patients with polytrauma. *Georgian Med News*. 2019;(288):20-26.
27. Owens E.O. Endogenous carbon monoxide production in disease. *Clinical Biochemistry*. Volume 43, Issue 15, October 2010, Pages 1183-1188.
28. McPherson R.A. *Basic Examination of Blood and Bone Marrow. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 2022.
29. Kutayli W.M., Silberstein P. Methemoglobinemia. In *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 2007.
30. Mot A.C., Puscas C., Dorneanu S.A., Silaghi-Dumitrescu R., EPR detection of sulfanyl radical during sulfhemoglobin formation – Influence of catalase. *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 137, 2019, Pages 110-115.
31. Xu S., Liu Z., Liu P. Targeting hydrogen sulfide as a promising therapeutic strategy for atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 2014 Mar 15;172(2):313-7.
32. Petrosino, M., Zuhra, K., Kopec, J. et al. H₂S biogenesis by cystathionine beta-synthase: mechanism of inhibition by aminoxyacetic acid and unexpected role of serine. *Cell. Mol. Life Sci*. 2022. 79, 438.
33. Eto K., Kimura H. A novel enhancing mechanism for hydrogen sulfide-producing activity of cystathionine beta-synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002. 277 (45): 42680–5.
34. Vicente J.B., Colaço H.G., Sarti P., Leandro P., Giuffrè A. S-Adenosyl-l-methionine Modulates CO and NO• Binding to the Human H₂S-generating Enzyme Cystathionine β-Synthase. *Journal of Biological Chemistry*. Volume 291, Issue 2, 2016, Pages 572-581.
35. Nobuji M., Kazunori K., Misuzu S. And Takeshi S. Increase of atp level in human erythrocytes induced by s-adenosyl-l-methionine. Department of

- Physiology, School of Medicine, Ehime University, Shigenobu, Omen-gun, Ehime, 1986. Japan 791-02.
36. Whillier S., Garcia B., Chapman B.E., Kuchel P.W., Raftos J.E. Glutamine and α -ketoglutarate as glutamate sources for glutathione synthesis in human erythrocytes. *FEBS Journal* 278. 2011. 3152–3163.
 37. Jensen B., Fago A. A Novel Possible Role for Met Hemoglobin as Carrier of Hydrogen Sulfide in the Blood. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2020. Vol. 32, No. 4.
 38. Vitvitsky V., Yadav P.K., Kurthen A., Banerjee R.. Sulfide oxidation by a noncanonical pathway in red blood cells generates thiosulfate and polysulfides. *J Biol Chem*. 2015; 290(13):8310-20.
 39. Ghashghaeinia M. Mrowietz U. Human erythrocytes, nuclear factor kappaB (NF κ B) and hydrogen sulfide (H₂S) – from non-genomic to genomic research, *Cell Cycle*, 2021. 20:20, 2091-2101.
 40. Pietri R., Román-Morales E., López-Garriga J. Hydrogen sulfide and heme proteins: knowledge and mysteries. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15(2):393-404.
 41. Jensen B, Fago A. Reactions of ferric hemoglobin and myoglobin with hydrogen sulfide under physiological conditions. *J Inorg Biochem*. 2018; 182:133-140.
 42. 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. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. vol. 2021, Article ID 8877691, 16 pages.
 43. Whillier S., Raftos J.E., Chapman B. Kuchel P.W. Role of N-acetylcysteine and cystine in glutathione synthesis in human erythrocytes. *RedoxR eport*. 2009 Vol 14. No 3. 115-121.
 44. Drisko J.A. MD. Chelation Therapy. *Integrative Medicine (Fourth Edition)*, 2018.

45. Whillier S., Raftos J.E., Sparrow R.L., Kuchel P.W. The effects of long-term storage of human red blood cells on the glutathione synthesis rate and steady-state concentration. *Transfusion*. 2011. Volume 51, 1450-1459.
46. Filip C., Zamosteanu N., and Albu E. Homocysteine in Red Blood Cells Metabolism - Pharmacological Approaches, Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology. 2012. Terry E. Moschandreou, Intech Open, DOI: 10.5772/47795.
47. Cavallaro R.A., Nicolia V., Fiorenza M.T., Scarpa S., Fuso A. S-Adenosylmethionine and Superoxide Dismutase 1 Synergistically Counteract Alzheimer's Disease Features Progression in TgCRND8 Mice. *Antioxidants* 2017, 6, 76.
48. Malinow M.R., Axthelm M.K., Meredith M.J., MacDonald N.A., Upson B.M. Synthesis and transsulfuration of homocysteine in blood. *Lab Clin Med*. 1994; 123 (3): 421-9.
49. Tinsley G. Methionine: functions, food sources and side effects. *Healthline*. 2018.
50. Pochini L., Scalise M., Galluccio M. and Indiveri C. Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health. Department DiBEST (Biologia, Ecologia, Scienze della Terra) Unit of Biochemistry and Molecular Biotechnology, University of Calabria, Arcavacata di Rende, 2014. Italy. *Front. Chem*.
51. Angelo S., Devés R. Amino acid transport system γ +L of human erythrocytes: Specificity and cation dependence of the translocation step. *J. Membr. Biol.* 1994. 141, 183– 192.
52. Schioth H.B., Roshanbin S., Hagglund M.G., and Fredriksson R. Evolutionary origin of amino acid transporter families SLC32, SLC36 and SLC38 and physiological, pathological and therapeutic aspects. *Mol. Aspects Med.* 2013. 34, 571–585.
53. Nobuji M., Kazunori K., Misuzu S. And Takeshi S. Increase of atp level in human erythrocytes induced by s-adenosyl-l-methionine. Department of

- Physiology, School of Medicine, Ehime University, Shigenobu, Omen-gun, Ehime. 1986. Japan 791-02.
54. Oden K.L., Clarke S. S-Adenosyl-L-methionine Synthetase from Human Erythrocytes: Role in the Regulation of Cellular S-Adenosylmethionine Levels. *Biochemistry*, 1983. 22, 2978-2986.
55. Freitag C., Clarke S. Reversible Methylation of Cytoskeletal and Membrane Proteins in intact Human Erythrocytes From the Department of Chemistry and the Molecular Biology Institute, University of California, Los Angeles, 1981. California 90024.
56. D'Angelo S., Trojsi F., Salvatore A., Daniele L., Raimo M, Galletti P., Monsurrò M.R. Accumulation of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane 51 proteins from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochemistry International* 63 2013. 626-634.
57. Barber J.R., Morimoto B.H., Brunauer L.S. and Clarke S. Metabolism of S-adenosyl-L-methionine in intact human erythrocytes. Department of Chemistry and Biochemistry and the Molecular Biology Institute, University of California, Los Angeles, CA 90024 (U.S.A.). 1986. *Biochimica et Biophysica Acta* 887, 361-372.
58. LOU L.L., Clarke S. Carboxyl methylation of human erythrocyte band 3 in intact cells. Relation to anion transport activity. Department of Chemistry and Biochemistry and the Molecular Biology Institute, University of California, Los Angeles, CA 90024, U.S.A. 1986. *Biochemical Journal*.
59. Hauh-Jyun Candy Chen, and Sun Wai Ip. «Age-Associated Methylation in Human Hemoglobin and its Stability on the Dried Blood Spots as Analyzed by Nanoflow Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry». 2018. *Chem. Res. Toxicol.*
60. Kimzey A.L., McFadden P.N. Spontaneous methylation of hemoglobin by S-adenosyl-methionine by a specific and saturable mechanism. *J Protein Chem.* 1994 Aug;13(6):537-46.

61. Stegink L.D., Filer L.J. Jr., Baker G.L. Plasma Methionine Levels in Normal Adult Subjects after Oral Loading with L-Methionine and N-Acetyl-L-Methionine, *The Journal of Nutrition*, Volume 110, Issue 1, 1980, Pages 42–49.
62. Ratanasopa K., Strader M.B., Alayash A.I., Bulow L. Dissection of the radical reactions linked to fetal hemoglobin reveals enhanced pseudoperoxidase activity. *Frontiers in physiology*, 2015. 6, 39.
63. 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 H₂O₂-induced oxidative stress. *Free Radical Research*, 2015, 49(8), 990–1003.
64. Attia A.M.M., Ibrahim F.A.A., Abd El-Latif N.A., Aziz S.W., Abdelmottaleb S.A. Moussa & Mohsen Elalfy S. Determination of Human Hemoglobin Derivatives. *Hemoglobin*, 2015. 39:5, 371-374.
65. Pietri R., Román-Morales E., López-Garriga J. Hydrogen sulfide and heme proteins: knowledge and mysteries. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(2):393-404.
66. Johnson R.M., Goyette G.Jr., Ravindranath Y., Ho Ye-Shih. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free Radical Biology & Medicine* 39. 2005. 1407 – 1417.
67. Revin V.V., Gromova N.V., Revina E.S., Samonova A.Y., Tychkov A.Y., Bochkareva .S.S, Moskovkin A.A., Kuzmenko T.P. 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. 2019. *Biomed Res Int*.
68. Spinella A.P. Effect of processing and storage on red blood cell function in vivo. *Semin Perinatol*. 2012; 36(4):248-59. doi: 10.1053/j.semperi.2012.04.005.
69. Agar N.S., Sadrzadeh S.M., Hallaway P.E., Eaton J.W. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest*. 1986; 77(1):319-21. doi: 10.1172/JCI112294.

70. Bertini et al. Bioinorganic Chemistry. LibreTexts libraries. 5: Dioxygen Reactions. 2020. URL: <https://status.libretexts.org>.

