

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

НИКИТЮК ЕЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА

Допускається до захисту
завідувач кафедри біофізики і
фізіології,
к.х.н., доцент

Доценко О. І.
« » 2024

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗВ'ЯЗКУ МІЖ ВМІСТОМ ЛІГАНДНИХ ФОРМ
ГЕМОГЛОБІНУ І ЙОГО ПЕРОКСИДАЗНОЮ АКТИВНІСТЮ

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 2024

Никитюк Е. О. Дослідження зв'язку між вмістом лігандних форм гемоглобіну і його пероксидазною активністю. Спеціальність 091 «Біологія». Освітня програма «Біологія». Донецький національний університет імені Василя Стуса, Вінниця, 2022.

Методом спектрофотометрії було досліджено рівень пероксидазної активності залежно від вмісту в еритроцитах мет- і оксигемоглобіну. За результатами регресійного аналізу показано, що пероксидазна активність цитоплазматичної фракції достовірно залежить тільки від вмісту оксигемоглобіну. Проте, пероксидазна активність мембранозв'язаної фракції достовірно залежить тільки від вмісту метгемоглобіну.

Nikityuk E. O. Study of the relationship between the content of ligand forms of hemoglobin and its peroxidase activity. Specialty 091 "Biology". Educational program "Biology". Vasyl Stus Donetsk National University, Vinnytsia, 2022.

The level of peroxidase activity depending on the content of met- and oxyhemoglobin in erythrocytes was investigated by spectrophotometry. According to the results of the regression analysis, it is shown that the peroxidase activity of the cytoplasmic fraction reliably depends only on the content of oxyhemoglobin. However, the peroxidase activity of the membrane-bound fraction reliably depends only on the content of methemoglobin.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Гемоглобін, будова, механізм зв'язування кисню	8
1.2. Лігандні форми гемоглобіну. Дослідження вмісту лігандних форм методом спектрофотометрії	13
1.3. Пероксидазна активність гемоглобіну. Механізм реакції, фізіологічна роль пероксидазної активності гемоглобіну	18
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	21
2.1. Матеріали дослідження	21
2.2. Визначення вмісту лігандних форм гемоглобіну	22
2.3. Реєстрація спектральних змін розчинів мембранозв'язаного гемоглобіну	23
2.4. Визначення пероксидазної активності гемоглобіну	23
2.5. Статистична обробка результатів	24
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ	26
3.1. Аналіз впливу вмісту окси- і метгемоглобіну на пероксидазну активність гемоглобіну цитоплазматичної фракції еритроцитів	26
3.2. Аналіз впливу вмісту окси- і метгемоглобіну на пероксидазну активність гемоглобіну мембранозв'язаної фракції еритроцитів	32
ВИСНОВКИ	38
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ТА ЛІТЕРАТУРИ	40

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

Hb	Гемоглобін
Mb	Міоглобін
oxyHb (Fe ²⁺)	Оксигемоглобін
metHb (Fe ³⁺)	Метгемоглобін
deoxyHb	Дезоксигемоглобін
ferrylHb (Hb ⁴⁺)	Феррил гемоглобін
PDA	Парафінілендіамін
Tyr	Тирозин
RO	Алкосильні радикали
ROO	Алкілпероксильні радикали
ROOH	Гідроперекиси ліпідів
ONOO ⁻	Пероксинітрит
HBOC (Hemoglobin-based oxygen carriers)	Переносники кисню на основі гемоглобіну
MBHb (Membrane-Bound Hemoglobin)	Мембранозв'язаний гемоглобін
CDB3 (Cytoplasmic Domain of Band 3 protein)	Цитоплазматичний домен білка полоси 3 (Band3)

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. Гемоглобін - один з найбільш вивчених білків тваринного походження, функція якого пов'язана з транспортом кисню. Проте додаткові функції гемоглобіну добре відомі. Деякі з них мають фізіологічне значення і призначені для підвищення рівня адаптаційного потенціалу клітин, інші є наслідком хімічних і термодинамічних властивостей білка [1].

Пероксидазна активність гемоглобіну може бути використана для перевірки будь-яких структурних змін, які могли статися в молекулі гемоглобіну в результаті хімічних модифікацій [2]. Хоча H_2O_2 зв'язується безпосередньо з гемовим залізом, субстрат може віддавати свої електрони на краю гему або в деяких випадках навіть взаємодіяти з білковою частиною ферменту (за аналогією з пероксидазами), оскільки деякі субстрати надто об'ємні, щоб проникати у гемову кишеню [2]. Відповідно, будь-які зміни в хімічному або структурному середовищі кишені гема можуть відобразитися у зміні швидкості окислення даного субстрату.

До підвищення пероксидазної активності гемоглобіну може приводити дисоціація гемоглобіну на мономери, або утворення зшивок за рахунок окислення амінокислотних залишків. Рідер та ін. продемонстрували [3, 4], що утворення ковалентного зв'язку між гемом та білковим фрагментом для Hb або Mb, оброблених перекисом водню підвищує пероксидазну активність і токсичність останніх.

Вважають, що мет- і оксигемоглобін відноситься до псевдопероксидаз - гем-вмісних білків, які виконують важливі функції в клітинах і спочатку не призначені для того, щоб взаємодіяти з H_2O_2 , але в результаті змін оточення і при розвитку окисного стресу вони можуть перетворюватися в пероксидазу. При взаємодії з H_2O_2 ці сполуки дають гіпервалентне ферилогемове залізо (-FeIV=O) та глобіновий тирозиновий радикал, здатний ініціювати подальші реакції окиснення [5]. Однак існує багато свідчень того, що глобіни є

справжніми пероксидазами зі специфічною біологічною роллю [4]. В дослідженнях показано, що оксигемоглобін у присутності пероксиду та аскорбату чи уратів функціонує як справжня ферментативна пероксидаза [6]. Пероксидазна активність оксигемоглобіну низька (ця величина в 5 раз вище для метгемоглобіну, порівняно з оксигемоглобіном), але його високий вміст сприяє споживанню перекису водню у великій кількості, тим самим запобігаючи окисленню гемоглобіну, потраплянню H_2O_2 в цикл псевдопероксидази та пригнічуючи токсичність ферилового Nb [7]. Але багато моментів щодо пероксидазної активності гемоглобіну залишається незрозумілими. Не зрозуміла фізіологічна роль пероксидазної активності гемоглобіну еритроцитів, не досліджена її роль в умовах гіпоксії.

Метою дослідження пероксидазна активність гемоглобіну еритроцитів людини залежно від вмісту його окси- і мет-форми в цитоплазматичній і мембранозв'язаній фракції.

Задачі дослідження:

1. Експериментально дослідити вміст лігандних форм гемоглобіну в цитоплазматичній і мембранозв'язаній фракції, пероксидазну активність фракцій гемоглобіну в еритроцитах здорових донорів.
2. Статистичними методами знайти залежність пероксидазної активності від співвідношення окси- і мет-форми в дослідженій фракції.
3. Зробити висновки про фізіологічну (патологічну) роль пероксидазної активності гемоглобіну.

Предмет дослідження: пероксидазна активність гемоглобіну в залежності від вмісту окси- і метгемоглобіну.

Об'єкт дослідження: цитоплазматичний і мембранозв'язаний гемоглобін.

Методами дослідження є визначення пероксидазної активності та вмісту лігандних форм гемоглобіну методом спектрофотометрії.

Структура роботи. Робота складається з трьох розділів. У першому розділі роботи розглянуто ключові джерела літератури, які становлять

теоретичну базу для виконання дослідження. У другому розділі описано використані матеріали, обладнання та методи, які використовувалися під час проведення експерименту. В третьому розділі представлені отримані результати, їх докладний аналіз та пояснення.



РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Гемоглобін, будова, механізм зв'язування кисню

Гемоглобін (Hb) є білковим комплексом клітин крові – еритроцитів, що займає 34% від усієї маси еритроциту, а також 90% його сухої маси, і є ключовим для перенесення кисню в організмі хребетних тварин. Гемоглобін відноситься до класів білків хромопротеїдів, головною ознакою яких є наявність, у будові молекули, забарвленої простетичної групи, а також металопротеїнів – до складу яких входять іони металів [8]. У крові людини концентрація гемоглобіну складає, у нормі, 120-140 г/л у жінок, у чоловіків – 140-160 г/л. Для дітей показник нормальної концентрації гемоглобіну в крові коливається в залежності від віку: до 3-х днів після народження він становить 145-225 г/л, а протягом 3-6 місяців знижується до мінімального рівня 95-135 г/л, далі, від 1 до 18 років його концентрація поступово зростає до нормального, визначеного за статтю, показника.

Під час ембріонального періоду у зародка відбуваються послідовні зміни у типах гемоглобіну на різних стадіях ембріонального розвитку еритроцитів. На 7-12 тижні розвитку плода в його еритроцитах утворюється примітивний гемоглобін (HbP), фетальний гемоглобін (HbF) на 9 тижні, а пізніше, перед народженням - гемоглобін дорослих (HbA). Різниця між фетальним гемоглобіном і гемоглобіном дорослих полягає в тому, що перший має більшу спорідненість до O₂.

Рівень насиченості крові гемоглобіном визначається за кольоровим показником. У нормі він складає 0,8-1. Іншим показником кількісного вмісту гемоглобіну еритроцитах є киснева ємність крові, тобто кількість O₂, що може бути зв'язана 1 см³ крові. Середня нормальна величина для людини – 14 г/100 см³ крові [9].

У зв'язку зі зниженням кількості гемоглобіну в крові у людини можуть виникати анемії, що спричиняють зменшення здатності крові переносити

кисень. При нестачі кисню у організмі у хворих на анемії часто виникають такі симптоми, як висока втомлюваність, задишка, серцебиття, шум у вухах, спостерігається зниження працездатності. Причинами виникнення анемії можуть бути зменшення кількості еритроцитів або кількості в них гемоглобіну. Найпоширенішим видом є залізодефіцитна анемія, яка може бути результатом недостатнього споживання заліза, особливо у дітей, або проблем з його засвоєнням організмом. Іншими причинами можуть бути гельмінтози, кровотечі, спричинені виразковою хворобою, та дефіцит вітаміну В12 [9].

Структурно, гемоглобін побудований з двох частин: білкової олігомерної глобули і небілкової простетичної групи – гема, і представлений чотирма субодинамиціями, кожна з яких містить одиничний поліпептидний ланцюг та гемовий зв'язуючий сайт (Рис. 1.1.). У людини основні форми гемоглобіну включають: HbA, який складається з двох α -субодинамиць і двох β -субодинамиць; та HbA₂, що також включає дві α -субодинамиці та дві δ -субодинамиці, кожна з яких складається з 141 і 146 амінокислотних залишків. Усього молекула гемоглобіну включає 574 амінокислоти, серед них найчастіше зустрічаються [10].

α -субодинамиці та β -субодинамиці утворюються з 7 та 8 спіралей, відповідно названих А–Н, які з'єднані неспіральною сегментами (називаються кутами). Кожна субодинамиця має зв'язувальну кишеню для гему, утворену спіралями Е і F. Гем складається з іона заліза, який утримується в центрі порфірину і координується чотирма атомами азоту порфіринового кільця. Fe також ковалентно прикріплюється до гемоглобіну в проксимальній кишені гема за допомогою імідазолу із залишку гістидину, розташованого на спіралі F (відомого як проксимальний гістидин або His (F8)) [11]. Ця установка дозволяє Fe зв'язувати O₂ або інші гази в дистальній кишені гему за допомогою ковалентного зв'язку для виконання октаедричної координації шести лігандів. Молекула O₂ зв'язується за геометрією, де один атом кисню зв'язується з Fe, а інший виступає під кутом. Імідазол із залишку гістидину в

дистальній кишені (His E7) стабілізує зв'язаний O₂ через взаємодію водневих зв'язків. За відсутності кисню (у деоксигенованому гемоглобіні) в α -щілині дуже слабо зв'язана молекула води заповнює це місце, утворюючи спотворений октаедр [11, 12, 13].

Гемова група утворена простим з'єднанням молекул порфірину й заліза, яке сприймає кисень у процесі окисно-відновної реакції, утворюючи оксигемоглобін. Гемова група містить протопорфірин IX та атом двовалентного заліза, який зв'язаний з глобіном через проксимальний гістидин F8 (координаційне зв'язування). Крім того, гем утворює водневі зв'язки з певними амінокислотами (α Val93, β Val94) та взаємодіє з багатьма гідрофобними регіонами. Ці гідрофобні взаємодії формують сприятливе середовище для транспорту кисню без окислення двовалентного заліза гему в еритроцитах.

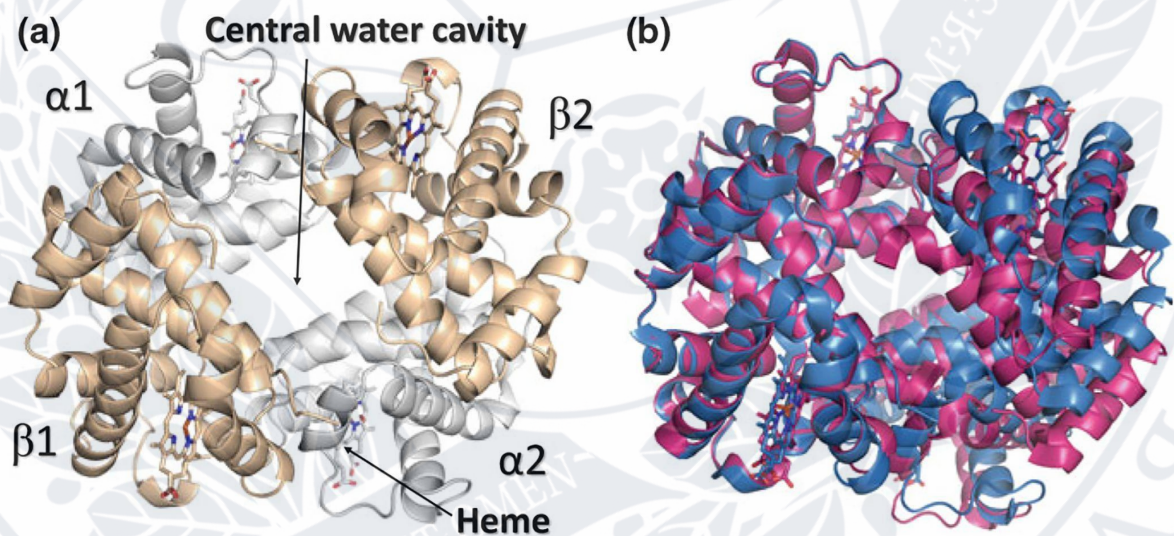


Рис. 1.1. Кристалічна структура гемоглобіну. (a) Загальна четвертинна структура гемоглобіну з двома ланцюгами α та β , пофарбованими в сірий і жовтувато-коричневий кольори відповідно. (b) Структура насиченого киснем (стан R) гемоглобіну (пурпурний), накладена на структуру насиченого киснем (стан T) гемоглобіну (синій) [11].

Йон заліза (Fe^{2+}) розташований у центрі гема і має шість координаційних валентностей: чотири валентності використовуються для зв'язування з азотними атомами протопорфірину IX, одна з азотом проксимального гістидину F8, і одна, що утримує молекулу кисню у відповідності до часткового тиску кисню. 2,3-дифосфогліцерат також впливає на зв'язування кисню, розташовуючись у кишені, оточеній чотирма субодиницями хромопротеїну. У тетрамері ($\alpha_2\beta_2$), лише атоми заліза можуть зв'язати кисень, тому його окислювальний стан має велике значення [14].

Навпроти йона заліза у молекулі гемоглобіну розташований дистальний гістидин F7. Область, що утворюється між ними, є вільною для захоплення лігандів атомом заліза, що знаходиться у шостій координаційній валентності. Таким чином утворюються лігандні форми гемоглобіну: оксигемоглобін (HbO_2), карбоксигемоглобін (HbCO), сульфоглобін (SHb), нітрозилгемоглобін (NOHb).

У легенях гемоглобін та кисень утворюють нестійку сполуку, яку називають оксигемоглобіном. Кров із гемоглобіном має яскраво-пурпуровий колір. Коли оксигемоглобін віддає кисень, він перетворюється на відновлений гемоглобін, що робить кров темно-вишневою (венозною). Гемоглобін може утворювати сполуки з вуглекислим газом (CO), утворюючи карбоксигемоглобін, який має більшу стійкість. Гемоглобін, коли утворює сполуки з потужним окисником (перманганат калію), називається метгемоглобіном. Кров з таким гемоглобіном має коричневий відтінок, при цьому залізо у гемоглобіні переходить у форму: $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$. У результаті справжнього окислення гемоглобін стає неефективним у перенесенні O_2 і втрачає здатність переносити його, такий стан може виникнути внаслідок прийому препаратів з окислювальними властивостями. Міоглобін, аналог гемоглобіну, є білком, що зв'язує кисень у скелетних м'язах та м'язах серця, що забезпечує м'язи киснем [10, 13].

Зміна ліганду в гемоглобіні призводить до змін як у магнітних властивостях, так і у просторовій структурі молекули. У молекулі

дезоксигемоглобіну (RHb) атом заліза у протопорфіриновому кільці знаходиться у високоспіновому стані і знаходиться над площиною протопорфіринового кільця, утворюючи з його площиною піраміду (рис. 1.2., А). У цьому випадку координаційний зв'язок з гістидином F8 не збалансований взаємодією з лігандом. Ця ситуація призводить до зміни конформації молекули, внаслідок чого поліпептидні ланцюги α - і β -спіралей наближаються один до одного.

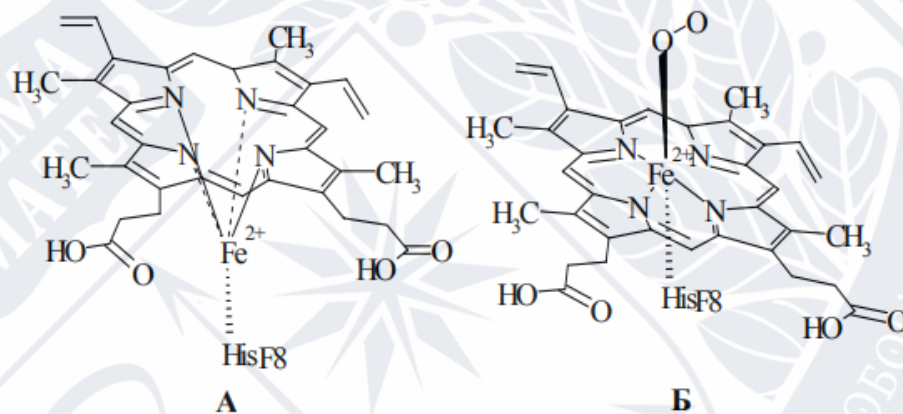


Рис. 1.2. Будова гемової компоненти дезокси- (А) та окси- (Б) гемоглобіну [15].

Унікальна властивість гемоглобіну – його здатність зворотно зв'язувати O_2 . У разі зв'язування O_2 радіус йона Fe^{2+} зменшується, він переходить у більш низькоспіновий стан. В оксигемоглобіні основний стан є діамагнітним [15]. Йон Fe^{2+} переміщається від His F8 на 0,06 нм у площину протопорфіринового кільця, займаючи більш енергетично вигідне положення (рис. 1.2., Б). З'ясовано, що в оксигемоглобіні кисень перебуває у вигляді супероксидйону O_2^- , а йон Fe^{2+} переходить з високоспінового стану у низькоспіновий, не зазнаючи окиснення до Fe^{3+} . Згідно з даними рентгеноструктурного аналізу кисень утворює з йоном Fe^{2+} монодентантний комплекс, у якому молекула кисню координована з йоном заліза лише одним атомом (рис. 1, Б) [13].

За певних умов рівноважне зв'язування кисню може перемикається на реакцію незворотного аутоокислення Hb до metHb. Цей процес представляє

основне джерело кисневих вільних радикалів в еритроциті. Генерований в ході реакції аутоокислення супероксид аніон O_2^- може бути перетворений на перекис еритроцитарного водню супероксиддисмутазою. У той же час концентрація глутатіонпероксидази і каталази на 3-4 порядку перевищує концентрацію генерованих O_2 і H_2O_2 . Процес аутоокислення до metHb та наступна преципітація білка може протікати значно швидше для мутантних варіантів Hb, несуть амінокислотні заміни [16].

Як припускають у разі міоглобіну, реакція аутоокислення гемопротейну протікає як нуклеофільне витіснення пов'язаної молекули O_2 у вигляді супроксиданіону вбудовується молекули води. Раніше були вивчені деякі закономірності реакції аутоокислення Hb людини [17] Було припущено, що реакція аутоокислення HbO_2 включає взаємодію порфіринового циклу з молекулами води і вимагає протонування азоту дистального His.

Одночасно з процесом аутоокислення в еритроцитах можуть протікати реакції окислення Hb цілим рядом ендогенних та екзогенних сполук.

1.2. Лігандні форми гемоглобіну. Дослідження вмісту лігандних форм методом спектрофотометрії.

В нормі еритроцити містять суміш похідних гемоглобіну (Hb), з них фізіологічно важливими є дезоксигемоглобін (RHb) і оксигемоглобін (HbO_2), але є й інші неактивні Hb-похідні, такі як карбоксигемоглобін ($HbCO$), метгемоглобін (MetHb) і сульфгемоглобін (SHb), концентрації яких підвищуються при багатьох патологічних станах [9].

$HbCO$ є неактивним похідним Hb, що утворюється шляхом зв'язування монооксиду вуглецю (CO) з Hb. Пряме вимірювання $HbCO$ в крові може задокументувати вплив та отруєння CO. Відсоток $HbCO$ корелює з клінічними симптомами. Інтоксикація чадним газом дає поширені розлади нервової системи; спостерігалися погіршення навичок водіння та зниження толерантності до фізичних навантажень особи з рівнем $HbCO$ 6%; більш явні

симптоми, такі як головний біль і втома розвивається на 10–20%; рівень насичення приблизно 20-30% є достатнім, щоб викликати сильний головний біль, нудота, блювота, запаморочення, розмитість зору та непритомність; 30–40% викликає нудоту, блювоту, непритомність, прискорене серцебиття та дихання, а також порушення неврологічна функція; 40–50% викликає кому, судоми, порушення серцево-судинної системи і неврологічна функція, на рівні 50–60% кома, судоми, пригнічене дихання і пригнічений серцево-судинний статус; 60–70% рівнів викликають кому, судоми, серцево-респіраторна депресія, брадикардія та виражена гіпотензія; на рівнях >70% настає дихальна недостатність і смерть [20].

Іншим неактивним похідним Hb є сульфгемоглобін (SHb), в якому тіол група вставляється в тетрапірольне кільце молекули Hb, що робить її нездатною зв'язувати та переносити кисень. Сірководень (H₂S) утворюється і поглинається в кишечник. У нормі він виводиться з легенів або руйнується. Якщо H₂S в надлишку або якщо присутні речовини, що сприяють його реакції з гемоглобіном, виходить SHb. У нормі крові SHb дуже низька, а патологічні значення коливаються від 1 до 10% [15].

metHb є ще одним неактивним гемоглобіном, в якому міститься гемове залізо гемоглобіну окислюється з двовалентного заліза (Fe²⁺) до заліза (Fe³⁺) і тому не здатне зв'язувати та переносити кисню, що призводить до гіпоксії тканин і пов'язаних із нею захворювань [21]. У нормі у фізіологічному стані metHb утворюється шляхом аутоокислення гемового заліза оксигемоглобіну (HbO₂), за допомогою активних форм кисню, індукованих нормальним метаболічним процесом. Швидкість аутоокислення становить близько 3% на добу [22]. Окислений гемоглобін *in vivo* піддається відновленню НАДН-метгемоглобінредуктазною системою та допоміжними засобами механізми, такі як аскорбат і відновлений глутатіон (GSH) [23] для досягнення

рівноважний рівень MetHb; це становить у нормальній крові 0,51%.

Якщо утворення MetHb перевищує відновлення до Hb, рівень MetHb підвищується в крові і може з'явитися ціаноз. Існує два механізми розвитку метгемоглобінемії: набута метгемоглобінемія та вроджена метгемоглобінемія. Останнє є спадковим захворюванням, спричиненим або дефіцитом антиоксидантного ферменту (глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, G6PD), що призводить до внутрішньосудинного гемолізу і підвищення швидкості окислення Hb, як при дефіцитній анемії G6PD, або дефіциту НАДН-залежної метгемоглобінредуктази або до спадкової аномалії структури гемоглобіну, як у гемоглобінів M [23]. При вродженій метгемоглобінемії спостерігаються значення до 30% і виключно Повідомлялося про рівні 40–50% . Причиною є набута метгемоглобінемія токсичними речовинами, такими як нітрати, або окислювачами, такими як сульфон і анілін. У новонароджених, оскільки активність NADH-метгемоглобінредуктази зазвичай низька, проковтування токсичних речовин, таких як вода, забруднена нітратами, може призвести до тяжкої метгемоглобінемії [21].

Зазвичай лігіндні форми гемоглобіну досліджують спектрофотометрично, шляхом реєстрації спектрів поглинання розчинів гемоглобіну в діапазоні 350-450 і 450-750 нм (Рис. 1.3) [15]. Показано, що дезоксигемоглобін в діапазоні від 450 до 750 нм відзначається сильним поглинанням світла на довжині хвилі 430 нм ($\epsilon = 119\ 000$), відомої як смуга Soret (рис. 1.3., A), що значно менше за порівнянням з іншими спектрами. Переміщення атома заліза в площину гему у молекулі оксигемоглобіну призводить до збалансування взаємодій між зв'язками His F8 та O₂ з утворенням комплексом іону. Ця зміна в спектрах поглинання молекули оксигемоглобіну викликає зсув смуги Soret до більш короткої довжини хвилі (415 нм) та збільшення інтенсивності поглинання ($\epsilon = 135\ 000$). На рис. 1.3., B у оксигемоглобіні спостерігається зсув α -смуги, у порівнянні з дезоксигемоглобіном, у бік хвилі 577 нм, а також збільшення інтенсивності поглинання порівняно з дезоксиформою ($\epsilon = 14\ 600$). Однією з основних відмінностей у спектральних характеристиках оксигемоглобіну від

дезоксигемоглобіну є поява β -смуги у діапазоні 542 нм (Рис. 1.3, Б) ($\epsilon = 13\ 800$).

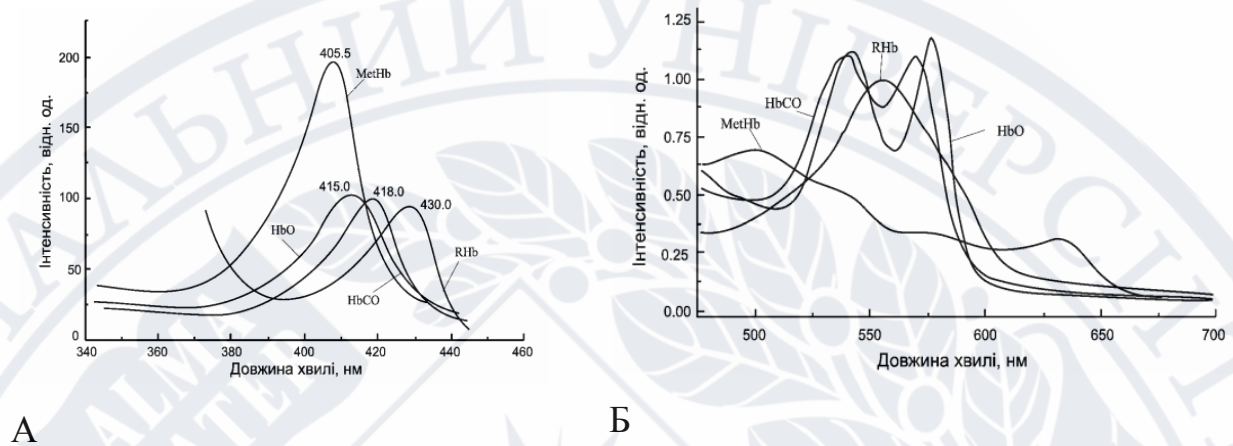


Рис. 1.3. Спектри поглинання різних лігандних форм гемоглобіну: А - в діапазоні 350-450 нм; Б - в діапазоні 450-750 нм [15].

Спектр поглинання молекули карбоксигемоглобіну подібний до спектра оксигемоглобіну. Смуга Соре, порівняно з дезоксигемоглобіном, зміщена до короткохвильової ділянки світлового спектру (418 нм) і має ще більшу інтенсивність ($\epsilon = 191\ 000$). На більш довгих хвилях спостерігаються дві смуги поглинання – α - (569 нм) і β -смуга (539 нм), які мають однакову інтенсивність ($\epsilon = 13\ 400$). Подібність спектральних характеристик окси- та карбоксигемоглобіну свідчить про невеликі зміни у структурі при заміні одного ліганду іншим. Це пояснює високу подібність гемоглобіну до СО та його здатність заміщувати кисень у молекулі оксигемоглобіну.

На електронних спектрах поглинання молекули метгемоглобіну помітна інтенсивна смуга з піковим значенням на довжині хвилі 405 нм (рис. 1.3, Б). Інтенсивність цієї смуги значно перевищує поглинання смуги Соре у відновлених формах гемоглобіну ($\epsilon = 251\ 000$), а пікове значення поглинання зміщене до більш короткої хвилі у світловому спектрі. Значна різниця у електронному спектрі поглинання гемоглобіну порівняно з описаними його

відновленими формами, можливо, пояснюється тим, що атом заліза знаходиться у більш окисненому стані.

Відомо, що зв'язування гемоглобіну з лігандом супроводжується конформаційними перебудовами молекули загалом. Екзогенні токсичні сполуки та метаболіти, виступаючи у ролі лігандів, можуть призводити до порушення гідрофобності у молекулі гемоглобіну і в оточенні Феруму гему, що призводить до вивільнення активної форми кисню – супероксид-аніон радикала (O_2^-), переходу Fe^{2+} у Fe^{3+} та накопичення метгемоглобіну. Сполуки екзогенного чи ендogenous походження часто конкурують із киснем за центри зв'язування у гемі. Зв'язуючись із гемоглобіном, вони впливають на його кооперативність, блокуючи тим самим його основну функцію – транспорт кисню, і порушують стабільність структури не лише цього гемопротейну, але й еритроцита [24].

На основі спектрів поглинання індивідуальних речовин були запропоновані рівняння для розрахунку вмісту лігандних форм гемоглобіну. Для визначення вмісту лігандних форм гемоглобіну, використовували поглинання при 540, 560, 576 і 630 нм. Вміст лігандних форм гемоглобіну (в моль/л) обчислювали за допомогою рівнянь, наведених у [25]:

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

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

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

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

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

1.3. Peroksidazna aktivníst' gemoглобіну. Mehaniz'm reakcii, fiziologična rol' peroksidaznoї aktivnosti gemoглобіну.

Гемпероксидази — це ферменти з гемовою простетичною групою в каталітичному центрі, де залізо зв'язане чотирма координаційними зв'язками з похідним протопорфірину IX. У присутності H_2O_2 гем-пероксидази активуються до високореакційноздатних проміжних продуктів. Гідропероксиди ліпідів також реагують з каталітичним центром пероксидази. За винятком комплексів цитохром с (cyt c)/кардіоліпін (CL), швидкість їх реакції з гемом нижча, ніж у H_2O_2 .

Обов'язковими вимогами до пероксидазної активності гемвмісного білка (тобто його здатності утворювати реакційноздатні проміжні продукти) є: (1) Peroксидази діють, маючи залізо у формі заліза (Fe^{3+}) або $Fe(III)$. (2) Гемове залізо пероксидази має п'ять координаційних зв'язків: чотири з атомами азоту тетрапірольного кільця, а п'ятий гемовий ліганд на проксимальній стороні гему – це висококонсервативне імідазольне кільце залишку гістидину, що зв'язує гем із білком. На дистальній стороні гему залізо зв'язує молекулу води. Ця молекула H_2O замінюється на H_2O_2 при активації пероксидази. (3) Peroксидази характеризуються специфічним розташуванням амінокислот в активному центрі для ефективної координації та використання H_2O_2 . На дистальному ділянці гему консервативна пара гістидин-аргінін бере участь у мережі пероксиду водню .

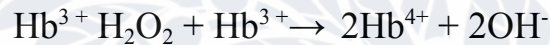
Як гемопротейн, гемоглобін в присутності окислювальних еквівалентів, таких як H_2O_2 , може діяти як пероксидаза з дуже високим окислювальним потенціалом. В ході цих реакцій гемоглобін утворює форми з високоокисненим залізом ($FeIV$) та радикали глобіну, що мають високу окисну активність і є токсичними для клітин. Крім того, пероксидазна активність може свідчити про будь-які структурні зміни, які могли статися в молекулі гемоглобіну в результаті хімічних модифікацій [26].

Пероксидні властивості Hb, коли він реагує з фізіологічними окислювачами, такі як перекис водню, призводять до поширення окисного пошкодження клітин і тканин. In vivo можна знайти приклади окисної активності Hb з великою внутрішньосудинною експозицією гемоглобіну, що викликає ліпиди перекисного окислення та подальшої модифікації білка пероксиду ліпідів у нирках тварин, які зазнали впливу. Виділення окислювально модифікований гемоглобін в сечі цих тварин свідчить про те, що гемоглобін безпосередньо бере участь у процесах, що призводять до пошкодження паренхіми. Крім того, було показано, що вільний гем або продукти окислення гемоглобіну або обидва поширюють запальні реакції та підвищують сприйнятливості клітин до окислювального стресу [27].

Деякі комплекси заліза реагують з перекисом водню (H_2O_2), утворюючи гідроксильний радикал (OH^\cdot), що може мати відношення до гемоглобіну. Проте, якщо це був би головний шлях, стехіометрія реакції вимагала б практично всіх утворених OH^\cdot для окислення гему. Це не відповідало б високій реактивності OH^\cdot , яка сприяє реакціям всередині кишені гему перед виходом радикалу. Спектральні зміни з оксиміоглобіном та H_2O_2 свідчать про утворення феррилового виду, який залишається стабільним у великих кількостях H_2O_2 , але поступово перетворює надлишок оксиміоглобіну на метміоглобін. Феррилогемоглобін та ферриломіоглобін також окислюють різноманітні донори електронів, включаючи аскорбат, кіноліни, йодид та ферроціанід [28].

Пероксидативна активність метгемоглобіну та метміоглобіну добре вивчена. Спочатку Джорджем та Айрвайном було запропоновано, що реакція між метміоглобіном та H_2O_2 може утворювати OH^\cdot . Вони спостерігали феррилміоглобін як продукт, стехіометрію метміоглобіну: H_2O_2 приблизно 1:1, а також докази існування короткочасного реактивного проміжного продукту. Однак подальше дослідження показало, що цей проміжний продукт еквівалентний комплексу $Hb^{3+}+H_2O_2$, з одним окиснювальним еквівалентом, розташованим на гемі (феррил) та одним на глобіні, тобто утворює

феррилгемоглобін-глобіновий радикал [16]. Радикальний характер цього виду спостерігався за допомогою ЕПР-спектроскопії як для гемоглобіну, так і для міоглобіну. Початково радикал знаходиться на залишках гістидину або фенілаланіну, а потім переміщується на тирозин. Теоретично він може виникати внаслідок OH^\cdot , утвореного в кишені гему, але доказів цьому немає. (Цей вид відрізняється від комплексу $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2$ пероксидази хрину, у якому обидва окиснювальних еквівалента пов'язані з гемом.)



Цей проміжний радикал пройшов ряд реакцій, включаючи радикальну дисмутацію та інші реакції, що призводять до незворотних окислених похідних гему, наприклад, холеглобіну або модифікованих глобінів. У результаті однієї з таких реакцій відбувається зв'язування глобіну. У випадку міоглобіну було ідентифіковано принаймні 10 етапів загальної реакції [16].

Цей короткочасний метгемоглобін-пероксидний радикал також має великий окислювальний потенціал для екзогенних донорів електронів та ймовірно сприяє реакціям окислення-відновлення з ліками та гемоглобіном.

Отже, будь-яка реакція, що включає оксигемоглобін чи метгемоглобін та H_2O_2 , може утворювати ці окиснюючі види, які здатні принаймні до деяких реакцій OH^\cdot радикалів. Наприклад, H_2O_2 та будь-який вид гемоглобіну легко окислюють метіонал до етилену [28]. Перш ніж інші реакції з участю гемоглобіну можна віднести до OH^\cdot , необхідно виключити комплекси гемоглобіну-пероксиду. Крім того, ці види повинні мати високу здатність завдавати шкоду клітинам, і чи утворюється OH^\cdot також може бути не рішучо важливим.

РОЗДІЛ II

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали дослідження.

В роботі використовували:

- еритроцити донора;
- NaCl (М 58,14), чда;
- калій фосфорнокислий однозаміщений KH_2PO_4 (М 136,09), ч, «Китай»;
- натрій фосфорнокислий двозаміщений, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (М 358,14), фарм;
- натрій фосфорнокислий 1-заміщений, NaH_2PO_4 (М 119,98), чда, «Німеччина»;
- тритон X-100;
- перикис водню, 30%;
- п-фенілендіамін,
- набір реактивів для визначення концентрації гемоглобіну в крові;

Склад розчинів, що використовуються в роботі:

Буферні розчини:

1. Буферний розчин 1: Na-фосфатний буфер (0,01 моль, рН 7,4), що містить 0,15 моль NaCl. Використовується в якості середовища для відокремлених від плазми еритроцитів;
2. лизируючий буфер Na,K-фосфатный буфер, (0,01 моль, рН=7,4);
3. - 5% водный раствор тритона X-100 готовили добавлением к 0,6 мл тритон X-100 11,4 мл Na-фосфатного буфера, содержащего 0,15 моль NaCl;
4. H_2O_2 , (2мМ)
5. п-фенілендіамін, (20 мМ, рН 7,4).

2.2. Визначення вмісту лігандних форм гемоглобіну.

В експериментах використовували свіжу кров донорів, приблизно однієї вікової групи і однієї статі. Еритроцити відділяли від плазми центрифугуванням і тричі відмивали з Na-фосфатним буфером (0.015 моль, рН 7.4) (буферний розчин 1), що містив 0.15 моль NaCl. В отриманій еритроцитарній пасті визначали загальний вміст гемоглобіну геміглобінціанідним уніфікованим методом з використанням стандартного набору.

До 3 мл лізуючого буфера додавали 0,03 мл пасту еритроцитів. Витримували 20 хв за кімнатної температури до повного лізису.

Тіні еритроцитів осаджували центрифугуванням (10 хв, 3000 об/с).

2 мл надосадової рідини відбирали та переносили в окрему пробірку, додавали 3 мл лізуючого буфера. Цей розчин використовували для визначення загального вмісту гемоглобіну, лігандних форм і пероксидазної активності цитоплазматичної фракції гемоглобіну.

Тіні еритроцитів відмивали буфером 1, після чого надосадову рідину видаляли центрифугуванням. До осаду тіней еритроцитів додавали 0,5 мл 5% розчину тритону X-100. Пробу витримували протягом 5 хв до повного просвітлення розчину, потім додавали 0,2 мл лізуючого буфера (розчину 2). У цьому розчині також визначали вміст лігандних форм гемоглобіну у мембранозв'язаній фракції та пероксидазну активність.

Спектри поглинання цитоплазматичного та мембранозв'язаного гемоглобіну еритроцитів реєстрували в інтервалі довжин хвиль 500 – 700 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 (0.2) мл 5% тритону X-100 і буферний розчин 2.

Загальний вміст цитоплазматичної та мембранозв'язаної фракцій гемоглобіну, визначали за поглинанням на довжині хвилі 523 нм з використання коефіцієнту екстинції 7120 М/см [29].

2.3. Реєстрація спектральних змін розчинів мембранозв'язаного гемоглобіну. Для визначення присутності різних окислених форм у розчині мембранозв'язаного гемоглобіну використовували спектри поглинання в інтервалі довжин хвиль 500-700 нм. При візуальному аналізі смуг поглинання мають бути враховані такі моменти: (1) MetHb дає характерний пік або плече за 630 нм, (2) геміхром (hemichrome) у сумішах проявляється невеликим плечем при 560 нм, (3) присутність холеглобіну призводить до збільшення поглинання при 700 нм [30]. Відмінність між ferrylHb і hemichrome більш тонка, хоча ця форма гемоглобіну може зробити внесок у поглинання в цьому спектральному діапазоні.

Для визначення вмісту лігандних форм гемоглобіну, використовували поглинання при 540, 560, 576 і 630 нм [31]. Вміст лігандних форм гемоглобіну (в моль/л) обчислювали за допомогою рівнянь, наведених у [32]:

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

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

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

$$C_{\text{HemiCr}} = ((1.8787 \cdot A_{560} - 1.0406 \cdot A_{576} - A_{630}) / 8.6888) \cdot 10^{-4} \text{ (Attia et al., 2015),}$$

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

2.4. Визначення пероксидазної активності гемоглобіну.

Концентрацію пероксиду водню у вихідному розчині здійснювали методом спектрофотометрії, використовуючи при цьому значення коефіцієнту екстинкції $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Вихідний розчин п-фенілендіаміну (PDA) готували шляхом розчинення точної наважки у буферному розчині 1.

Рівень PDA активності визначали спектрофотометрично, реєструючи окиснення PDA при 485 нм продовж 3-х хвилин [26]. Для визначення активності до 2 мл 20 мМ розчину п-фенілендіаміну (рН 7,4) додавали 0,1 мл гемолізату еритроцитів. Реакцію запускали введенням 0,1 мл перекису водню. Концентрація перекису водню в реакційній суміші становила 2мМ. Всі вимірювання проводили при температурі 37°C. Значення v_0 визначали за початковими лінійними ділянками кінетичних залежностей. Активність ферменту розраховували з використанням молярного коефіцієнту екстинції $1,545 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ і виражали в ммоль фенілендіаміну окисленого за 1 хв.

В роботі досліджено зразки 21 донора. Експериментальні дані були проаналізовані у програмі Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Експериментальні дані представлені як $x \pm m$ (x – середнє, m – відносна похибка).

2.5. Статистична обробка результатів.

Статистична обробка результатів дослідження проводилася шляхом регресійного аналізу у програмі Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA).

У лінійний регресійний аналіз входить широке коло завдань, пов'язаних із побудовою (відновленням) залежностей між групами числових змінних:

$$X = (x_1, \dots, x_n), Y = (y_1, \dots, y_n).$$

Припускається, що X - незалежні змінні (предиктори, що пояснюють змінні) впливають на значення Y - залежних змінних (відгуків, змінних, що пояснюються).

За наявними емпіричними даними (X_i, Y_i) , $i=1, \dots, n$ потрібно побудувати функцію $f(X)$, яка приблизно описувала б зміну Y при зміні X :

$$Y \approx f(X).$$

Передбачається, що безліч допустимих функцій, з якого підбирається $f(X)$, є параметричним:

$$f(X) = f(X, \theta),$$

де θ -невідомий параметр (власне кажучи, багатовимірний). При побудові $f(X)$ вважатимемо, що

$$Y = f(X, \theta) + \varepsilon, (1)$$

де перший доданок - закономірна зміна Y від X , а друге - ε - випадкова складова з нульовим середнім; $f(X, \theta)$ є умовним математичним очікуванням Y за умови відомого X і називається регресією Y по X .

Нехай n раз виміряні значення факторів x_1, \dots, x_n та відповідні значення змінної y ; передбачається, що

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_n x_{in} + \varepsilon_i, i = 1, \dots, n (2)$$

(другий індекс у x відноситься до номера фактора, а перший - до номера спостереження); передбачається також, що

$$M\varepsilon_i = 0, M\varepsilon_i^2 = \sigma^2, (3)$$

$$M(\varepsilon_i \varepsilon_j) = 0, i \neq j$$

тобто. ε_i - некорельовані випадкові величини. Співвідношення (2) зручно записувати у матричній формі:

$$Y = X\beta + \varepsilon, (4)$$

де $Y = (y_1, \dots, y_n)^T$ - вектор-стовпець значень залежної змінної, t - символ транспонування, $\beta = (\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_n)^T$ - вектор-стовпець (розмірності n) невідомих коефіцієнтів регресії, $\varepsilon = (\varepsilon_1, \dots, \varepsilon_n)^T$ - вектор випадкових відхилень,

$$X = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & \dots & x_{1k} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ 1 & x_{n1} & \dots & x_{nk} \end{bmatrix}$$

-матриця $n(k+1)$; у i -му рядку $(1, x_{i1}, \dots, x_{in})$ знаходяться значення незалежних змінних у i -му спостереженні перша змінна - константа, що дорівнює 1.

Оцінка коефіцієнтів регресії проходить за рівняннями:

$$\|Y - \hat{Y}\|^2 = \|Y - X\tilde{\beta}\|^2 \rightarrow \min \text{ по } \tilde{\beta}$$

$$\tilde{\beta} = (X^T X)^{-1} X^T Y (5)$$

РОЗДІЛ III

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

За результатами дослідження пероксидазної активності гемоглобіну еритроцитів людини залежно від вмісту його лігандних форм, а саме окси- і метгемоглобіну, в цитоплазматичній і мембранозв'язаній фракціях були отримані наступні результати:

3.1. Аналіз впливу вмісту окси- і метгемоглобіну на пероксидазну активність гемоглобіну цитоплазматичної фракції еритроцитів.

Оксигемоглобін (HbFe^{2+}) бере участь у циклі відновлення пероксидів шляхом пероксидазної реакції. У гемовій кишені H_2O_2 зв'язується з активним центром гема і за участі клітинного аскорбата відбувається відновлення перекису водню до води. Аскорбат (вітамін С) виступає як антиоксидант та коензим у цій реакції, допомагаючи відновлювати оксигемоглобін з Fe^{3+} назад у активну форму Fe^{2+} . Аскорбат діє, зокрема, через цикл відновлення аскорбінової кислоти в еритроцитах, коли окисдована форма вітаміну С відновлюється до активної, антиоксидантної форми. Цей процес сприяє зниженню рівня окиснювальних забруднень в еритроцитах, допомагаючи підтримувати функціональну активність гемоглобіну та зберігати його здатність до переносу кисню [33].

Хоча каталітична активність HbFe^{2+} є слабкою, його високий вміст у цитоплазматичній фракції призводить до того, що загальна кількість активності ферменту є вищою, ніж у HbFe^{3+} (Рис. 3.1.).

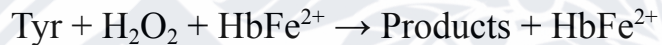
Оксигемоглобін, що вступає у реакцію з H_2O_2 окислюється до феррильної форми гемоглобіну (HbFe^{4+}), яка має властивості, спроможні викликати окислювальні процеси та мати потенційно негативний вплив на клітини через перекисне окиснення ліпідів.

Реакція окислення HbFe^{2+} до HbFe^{4+} :



Однак реакція HbFe^{2+} з Tyr та H_2O_2 сприяє каталізу реакції Tyr з перекисом водню, що призводить до утворення продуктів (H_2O і OH) та регенерації HbFe^{2+} . Цей процес запобігає утворенню окисленої форми гемоглобіну (ферилового Hb), зберігаючи його у менш окисленому стані та зменшуючи можливу токсичність, а також попереджаючи його входження і псевдопероксидазний цикл [35].

Реакція каталізування Tyr з H_2O_2 у присутності HbFe^{2+} :



Таким чином, реакція Tyr з H_2O_2 , яка призводить до елімінації більшості H_2O_2 , значною мірою пригнічує окисне пошкодження, спричинене H_2O_2 і пригнічує окислення HbFe^{2+} до токсичного HbFe^{4+} . В результаті Hb може трансформуватися з токсичної ролі в корисний. Однак, за низької концентрації тирозину в еритроцитах, захисний ефект, що полягає у реакції тирозину з перекисом водню, буде обмеженим [7, 34]. Це означає, що здатність ефективно використовувати тирозин для нейтралізації H_2O_2 буде обмеженою. Недостатня кількість Tyr може зменшити потенцій захисного впливу проти окислювальних пошкоджень, що може призвести до більшої вразливості еритроцитів на окислювання та ймовірно виникнення окислених форм гемоглобіну. Такі умови можуть сприяти виникненню токсичних ефектів, пов'язаних з окисними пошкодженнями, перекисним окисненням ліпідів і підкреслюють важливість належного балансу антиоксидантних механізмів у клітинах організму.

При окисленні ліпідів утворюються алкоксильні (RO) і алкілпероксильні (ROO) радикали та гідроперекиси ліпідів (ROOH), які також можуть окислювати MetHb з утворенням нових порцій ферил гемоглобіну. Тобто, на відміну від каталаз і пероксидаз, гемоглобіни можуть ініціювати, в першу чергу, перекисне окиснення поліненасичених жирних кислот, що призводить до утворення простагландиноподібних молекул, що володіють потенційною судинноскорочувальною активністю. При

автоокисленні оксигемоглобіну утворюється радикал O_2^- , що може взаємодіяти з NO з утворенням пероксинітриду ($ONOO^-$), який є набагато сильнішим окислювачем ніж O . Хоча утворення $ONOO^-$ в еритроцитах є мало ймовірним, проте цей процес може мати значне значення для цитоплазматичних гемоглобінів [35].

У таблиці 3.1. показано відсотковий вміст окси-, мет-, дезоксигемоглобіну і пероксидазної активності гемоглобіну цитоплазматичної фракції у пробах еритроцитів пацієнтів. За даними таблиці у цитоплазматичній фракції значно переважає вміст оксигемоглобіну. Оскільки метгемоглобін є менш активним у перенесенні кисню, більша кількість оксигемоглобіну в цитоплазмі еритроцитів має значення для забезпечення ефективності транспорту кисню у тканини та підтримки відповідного рівня окисенованого гемоглобіну для життєво важливих фізіологічних процесів.

Дезоксигемоглобін ($dOxyHb$) не здатний каталізувати пероксидазну активність гемоглобіну. Дезоксигемоглобін виконує регулюючу функцію, адже його присутність у еритроцитах може впливати на баланс лігандних форм гемоглобіну та, отже, на його активність у реакціях з перекисами. Це спостереження дозволяє зрозуміти, як різні форми гемоглобіну можуть взаємодіяти та впливати на окисативні процеси у еритроцитах.

Як ми бачимо за даними, представленими у таблиці і на рисунку 3.1, вплив співвідношення вмісту окси- і метгемоглобіну на пероксидазну активність є нелінійним. Спостерігається підвищення рівня пероксидазної активності при збільшенні вмісту $OxyHb$ у цитоплазматичній фракції гемоглобіну. Загальною тенденцією є те, що пероксидазна активність змінюється, але не має чіткого кореляційного зв'язку між співвідношенням лігандних форм оксигемоглобіну і метгемоглобіну, і їхнього впливу на пероксидазну активність. Варіація значень активності може бути пов'язана з індивідуальними особливостями та можливо характеризує різні

функціональні стани еритроцитів у різних пацієнтів. Значення пероксидазної активності гемоглобіну коливаються від 1,5 до 7,4 мкМ/хв/мкМ.

Таблиця 3.1. Вміст лігандних форм у % та пероксидазна активність гемоглобіну цитоплазматичної фракції еритроцитів у мкМ/хв/мкМ Hb

Пацієнт	ОхуHb, %	MetHb, %	dOхуHb,%	Hb Peroxydase activity, мкМ/хв/мкМ Hb
1	92,08	6,03	1,87	4,36 ± 0,3
2	94,4	5,25	0,33	3,93± 0,06
3	89,9	7,92	0,43	2,25± 0,16
4	92,08	5,07	2,19	2,14± 0,34
5	83,85	16,5	1,21	3,18±0,28
6	80,74	22,23	1,28	1,929±1,17
7	85,15	17,6	1,68	2,88±0,007
8	82,02	23,01	4,44	4,08±0,098
9	84,38	15,26	0,71	2,906±0,016
10	83,72	16,91	0,789	2,61±0,095
11	83,77	14,92	2,44	3,69±0,093
12	85,32	13,51	2,45	3,92±0,15
13	84,9	14,47	2,06	3,39±0,77
14	89,52	9,88	3,65	3,45±0,125
15	89,03	5,936	0,86	1,59±0,21
16	90,81	1,27	1,108	4,99±0,22
17	90,55	1,16	1,76	4,26±0,045
18	93,13	0,99	1,77	7,23±0,28
19	96,33	0,47		7,4±0,098
20	92,69	0,96	1,01	4,88±0,22
21	92,11	1,32	0,9	5,23±0,28

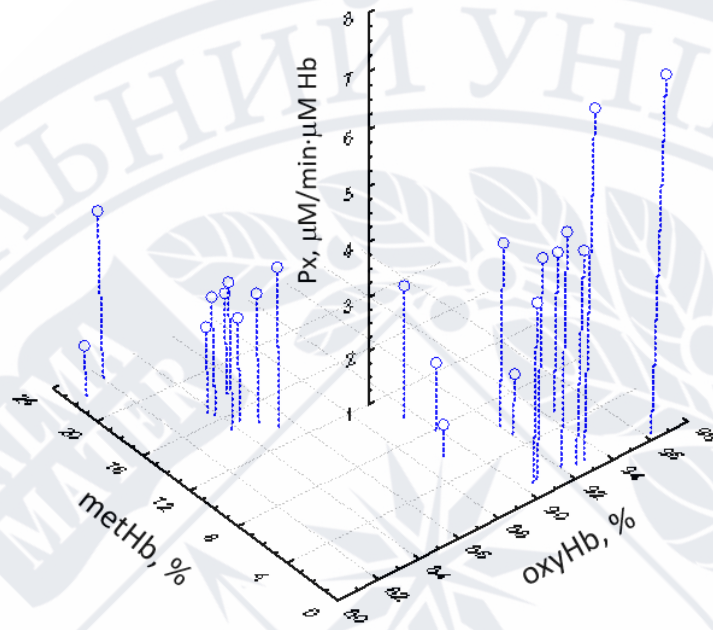


Рис. 3.1. Peroксидазна активність залежно від співвідношення окси- і метгемоглобіну у цитоплазматичній фракції гемоглобіну.

Завдяки своїй здатності переносити і віддавати кисень, гемоглобін (Hb) використовувався в медицині в переносниках кисню на основі гемоглобіну (НВОС), які можуть зменшити потребу в еритроцитах отримані клінічно для використання для екстреного лікування [7]. Але клінічні випробування НВОС виявили різноманітні несприятливі ефекти. Багато з яких пов'язані до природи самого Hb. Доведено, що ці побічні ефекти є основною перешкодою для клінічного застосування НВОС. Основним побічним ефектом НВОС є окисне пошкодження. Надходження великої кількості кисню до ішемізованої тканини у короткий період часу створює високі рівні активних форм кисню (АФК) і призводить до ішемії/реперфузійного пошкодження [36, 37]. Сам Hb може вступати в складні окисно-відновні реакції і окислюватися до більш реакційноздатного окисного стану, що далі посилює ішемію/реперфузійне пошкодження. По-перше, двовалентний Hb (HbFe^{2+}) може автоокислюватися та утворювати тривалентний Hb (HbFe^{3+} або metHb) і супероксид-аніон (O^{-2}).

По-друге, сильні окислювачі АФК, такі як H_2O_2 можуть окислювати HbFe^{2+} або HbFe^{3+} в HbFe^{4+} (ферил Нб) відповідно. H_2O_2 може привести HbFe^{3+} до псевдопероксидазного циклу [38]. HbFe^{4+} сильно окислює білки та інші органічні молекули. Постійна доступність ендogenousного перекису водню, характерного для патологічного такі стани, як ішемія/реперфузія та геморагічний/септичний шок, можуть викликати цю реакцію, що призводить до серії окисно-відновних переходів між фериловим та фериловим станами білок. Сильно окислювальний HbFe^{4+} може окислювати а відновний субстрат або HbFe^{2+} .

Якщо сильно окислювальний HbFe^{4+} не нейтралізується або не виводиться, що може призвести до токсичності тканин, включаючи перекисне окислення ліпідів, інактивацію ферментів і апоптоз клітин. Вони також можуть викликати структурні модифікації, включаючи змінене утворення гемопротейнового продукту, інтенсивне перехресне зшивання ланцюгів α -глобіну19 та необоротна окислювальна модифікація певних амінокислот в області зв'язування CD163 ланцюга β -глобіну Нб. Такі модифікації можуть призвести до збою кліренсу Нб ендogenousні механізми, які потім погіршують стан тканин органів. Тому постійно генерується HbFe^{4+} є вважаються токсичними, а ендотеліальні клітини особливо чутливі до індукованої гемоглобіном токсичності через їх близькість до циркулюючої крові [37].

HbFe^{2+} можуть окислюватися до HbFe^{3+} і також вступати в цикл, однак, у дослідженні [39] Нб був або залізом або досліджуваним кислі умови, які спричиняють швидке окислення HbFe^{2+} до HbFe^{3+} . Отже, ці дослідження фактично повідомляли про каталізатор активність HbFe^{3+} , а саме псевдопероксидазну активність [39].

На відміну від псевдопероксидазної активності гемоглобіну заліза (III), HbFe^{2+} і НВОСs мають пероксидазну активність, яка може каталізувати окислення тирозину перекисом водню, а продукт окислення трирозин — дитириозин. Цю активність пероксидази можна пригнічувати окислення двовалентного заліза до заліза Нб під час ішемії/реперфузії, таким чином

зменшуючи його входження в псевдопероксидазний цикл. Перекисний каталіз реакції тирозину з перекис водню HbFe^{3+} також інгібується, таким чином зменшуючи окисне пошкодження клітин. Таким чином, за цих умов Нб проявляє антиоксидантні властивості і більше не є токсичним, що робить це корисно для розробки НВОС.

3.2. Аналіз впливу вмісту окси- і метгемоглобіну на пероксидазну активність гемоглобіну мембранозв'язаної фракції еритроцитів.

Визначення вмісту лігандних форм гемоглобіну у мембранозв'язаній фракції гемоглобіну визначалося шляхом відмивання "тіней" еритроцитів і їх лізису у різних розчинах. Після осадження тіней еритроцитів та їх "відмивання" буфером, до отриманого осаду додавали 5%-й розчин тритону Х-100 для лізування мембран та утворення розчину із мембранозв'язаною фракцією. Подальша обробка з використанням лізуючого буфера (розчину 2) дозволяла вимірювати вміст лігандних форм гемоглобіну у цій фракції за допомогою спектрофотометрії в інтервалі 500–700 нм.

Еритроцити дуже чутливі до зміни концентрації солей в оточуючому середовищі. У гіпертонічному розчині вони зморщуються, віддаючи воду, у гіпотонічному - набухають, з них виходить гемоглобін (гемоліз) та іони K^+ . В результаті цього еритроцити перетворюються у "тіні" - залишається лише оболонка і строма. Таким чином, термін "тіні еритроцитів" означає відокремлені компоненти або осад, що утворюються після лізування еритроцитів та їх подальшого осадження чи очищення для подальших досліджень чи аналізу.

Відмиті мембрани еритроцитів містять близько 3% Нб, за спектрофотометричними властивостями ідентичного розчинного Нб. У нативних еритроцитах під дією ряду факторів частка Нб, що перейшла з розчинного в мембранозв'язаний стан (МВНб), може змінюватися в діапазоні від 0,5-12% [40].

Оскільки гемоглобін крім зв'язування газів може виявляти ряд ферментативних активностей (пероксидазну, нітритредуктазну, NO діоксигеназну), можна припустити, що зв'язування Hb з мембранами перемикає його з транспортною на ферментативну функцію. MbHb має відносно високу спорідненість до O₂, низький коефіцієнт Хілла, набагато більш високу пероксидазну активність у порівнянні з цитозоль [40].

Характерно, що кількість MetHb в мембранозв'язаній фракції значно більша, ніж в цитоплазматичній, це підтверджується результатами дослідження, що представлені у таблиці 3.2. Можемо спостерігати, що значення вмісту OxyHb коливається від 30,19% до 88,91%, що у середньому менше ніж у цитоплазматичній фракції. Відсоток вмісту dOxyHb показує високі значення у деяких випадках, особливо у зразках з високим вмістом метгемоглобіну. Якщо ж у цитоплазматичній фракції вміст дезоксигемоглобіну не перевищував 4,5%, то у мембранозв'язаній фракції його вміст сягає майже до 21%.

Пероксидазна активність також різноманітна та варіюється серед пацієнтів. Значення коливаються від близько 1,95 до 5,45 мкМ/хв/мкМ Hb. Зразки з високим вмістом метгемоглобіну та дезоксигемоглобіну часто відображають підвищену пероксидазну активність гемоглобіну, але існують винятки із цієї тенденції. Отримані дані свідчать про потребу в подальших дослідженнях для кращого розуміння впливу співвідношення лігандних форм гемоглобіну на його пероксидазну активність у мембранозв'язаній фракції еритроцитів та можливі механізми цих взаємозв'язків.

На рисунку 3.2. можна спостерігати, що пероксидазна активність метгемоглобіну у мембранозв'язаній фракції є значно вищою, ніж у цитоплазматичній. Проте пероксидазна активність залишається так само доволі високою у точках, де переважає вміст оксигемоглобіну. Це свідчить про те, що оксигемоглобін також виявляє здатність до каталізу реакцій пероксидази, навіть при наявності метгемоглобіну.

У тих точках, де відсоток вмісту окси- і метгемоглобіну наближаються один до одного, спостерігається зниження пероксидазної активності. Це може свідчити про те, що при оптимальному співвідношенні лігандних форм гемоглобіну активність пероксидази має тенденцію до зниження, вказуючи на особливості взаємодії між оксигемоглобіном і метгемоглобіном у контексті пероксидазних процесів.

Виконаний регресійний аналіз показав, що пероксидазна активність цитоплазматичної фракції достовірно залежить тільки від вмісту оксигемоглобіну.

Рівняння нелінійної регресії

$$P_x \text{ активність} = 97,49 - 0,023 \cdot O_{xy}Hb^2 \quad (R=0,73, p<0,00419).$$

Проте, пероксидазна активність мембранозв'язаної фракції достовірно залежить тільки від вмісту метгемоглобіну.

$$P_x \text{ активність} = 6,064 - 0,1184 \cdot metHb^{-1} + 2,5 \cdot 10^{-5} \cdot metHb^3 \quad (R=0,8, p<0,00318).$$

Таблиця 3.2. Вміст лігандних форм у % та пероксидазна активність гемоглобіну мембранозв'язаної фракції еритроцитів у мкМ/хв/мкМ Hb

Пацієнт	O _{xy} Hb, %	MetHb, %	dO _{xy} Hb,%	Hb Peroxydase activity, мкМ/хв/мкМ Hb
1	72,31	18,67	11,62	4,24±0,3
2	88,91	12,17	0,95	4,11±0,21
3	73,09	20,65	0,24	4,87±0,09
4	49,9	13,46	20,25	4,13±0,06
5	37,84	67,52	20,93	5,41±0,39
6	45,23	53,65	13,79	4,03±0,84
7	46,3	46,42	15,005	1,95±0,049

8	30,19	53,9	10,94	4,48±0,64
9	43,69	53,02	14,2	3,85±0,66
10	45,06	40,47	17,97	2,95±0,61
11	82,2	27,46	3,08	3,06±0,1
12	78,77	13,29	19,21	3,99±0,035
13	83,45	12,92	4,82	5,36±0,07
14	82,23	9,55	7,07	5,45±0,32
15	69,85	23,35	9,13	3,88±0,29
16	76,87	25,34	17,28	3,63±0,067
17	59,33	34,23	11,97	2,47±0,029

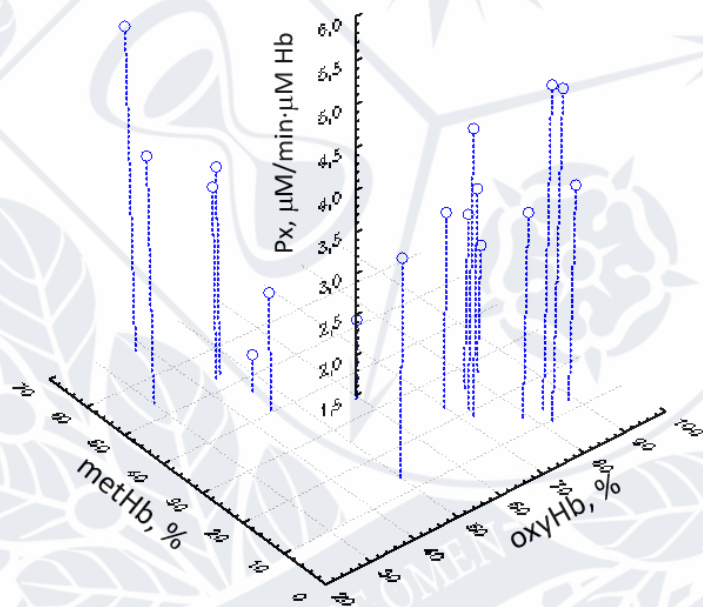


Рис. 3.2. Peroксидазна активність залежно від співвідношення окси- і метгемоглобіну у мембранозв'язаній фракції гемоглобіну.

Зв'язування Нб з мембраною може бути зворотним і необоротним. Із застосуванням флуоресцентних зондів було показано, що deoxyHb з високою спорідненістю (у 8 разів перевищує спорідненість для oxyHb) оборотно зв'язується з CDB3. Необоротним є ковалентне зв'язування Нб з

компонентами мембрани внаслідок дії окислювальних агентів, що викликають утворення вільних радикалів, ферильних та оксоферильних форм гемоглобіну. (Гем-Fe (IV) = O). Чим вищий рівень окиснення гемоглобіну (від FeIII до FeV), тим вище частка пов'язаного Hb, при цьому приблизно 50% Hb зв'язується за допомогою SH-груп [41]. Крім Band3, гемоглобін також здатний утворювати комплекс з цитоскелетним вузлом, утвореним спектрином, анкірином та білком смуги 4.2. Пов'язаний таким чином окислений metHb зберігає окислювально-відновні властивості та здатність до взаємодії із лігандами [41].

З мембраною взаємодіє частково окислений Hb, що, ймовірно, має фізіологічне значення, оскільки у примембранній області відбувається його відновлення мембранозв'язаної НАДФН-залежної metHb-редуктазою [42].

З одного боку, перехід Hb з розчинної у мембранозв'язану форму може бути адаптивною реакцією, спрямованою на регулювання енергетичного метаболізму та механічних властивостей мембрани. З іншого боку, збільшення рівня МВHb може бути результатом патологічних змін у молекулах Hb та білків мембран, які викликані активними формами кисню (АФК). Самі по собі продукти розкладання гемоглобіну (гем та двовалентне залізо) можуть бути джерелом АФК [40].

Окрім того, в окиснювальних реакціях Hb (феррилHb та оксиферрилHb) та в реакціях окисної денатурації Hb (геміхроми) може виникнути вільне радикальне окислення. Останні можуть тісно зв'язуватися з ліпідними оболонками та служити центрами утворення АФК. Оскільки область позамембранного простору майже недоступна для дії цитозольних антиоксидантних ферментів, осадження Hb на мембрані еритроцитів може лише посилити процес ліпопероксидації та спровокувати гемоліз. Незважаючи на багато вивчених властивостей та функцій МHb, досі не має повного розуміння біологічного значення цього явища.

Стабілізуючу дію на мембрани надають охуHb і metHb, тоді як продукти його окислення та денатурації (оборотні, незворотні геміхроми і

тільца Гейнца), що накопичуються під дією окислювального стресу або у процесі старіння еритроциту, порушують взаємодію мембрани з цитоскелетом [43]. Помітна стабілізуюча дія на примембранний цитоскелет пов'язана з тим, що oHuHb та metHb сприяють самоорганізації спектринового димер в тетрамер. Константа зв'язування oHuHb із спектрином на два порядки перевищує таку для CDB3.

Деструктивна дія окислених форм Hb зумовлена утворенням геміну. Було виявлено, що гемін є потужним гемолітичним агентом, який неспецифічно порушує білок-білкові та білок-ліпідні взаємодії. У еритроциті гемін слабить міжмолекулярні взаємодії всередині комплексу спектрин-білок 4.1-актин [43]. Джерелом геміну є геміхроми. Зі збільшенням окисного стресу геміхроми формують стійкі агрегати - "тільца Гейнца", які пристосовуються до мембрани еритроцитів. Цей процес супроводжується збільшенням проникності для калію, окисленням ліпідів перекисом, зварюванням мембранних білків та зниженням деформованості клітини [43].

ВИСНОВКИ

1. У цитоплазматичній фракції спостерігається значна присутність оксигемоглобіну. Більший обсяг оксигемоглобіну у цитоплазмі еритроцитів має важливе значення для ефективності транспорту кисню у тканини та підтримки відповідного рівня оксигенованого гемоглобіну, необхідного для життєво важливих фізіологічних процесів.

2. В мембранозв'язаній фракції спостерігається значно більший вміст метгемоглобіну (MetHb), ніж у цитоплазмі. Вміст дезоксигемоглобіну (dOxyHb) у деяких випадках показує високі показники, особливо у зразках з високим вмістом метгемоглобіну.

3. Присутність дезоксигемоглобіну (dOxyHb) у еритроцитах впливає на баланс лігандних форм гемоглобіну та його активність у реакціях з перекисами, виконуючи регулюючу функцію. Це спостереження підкреслює взаємодію та вплив різних форм гемоглобіну на оксидативні процеси у еритроцитах. Дезоксигемоглобін не відтворює пероксидазну активність гемоглобіну.

4. Дослідженням показано, що пероксидазна активність цитоплазматичної фракції гемоглобіну достовірно залежить лише від вмісту оксигемоглобіну (OxyHb). В той час як пероксидазна активність мембранозв'язаної фракції достовірно залежить тільки від вмісту метгемоглобіну (MetHb).

5. Фізіологічна роль пероксидазної активності гемоглобіну важлива для ефективного функціонування еритроцитів та забезпечення їхньої життєвої діяльності. Ця активність допомагає у видаленні перекису водню, що є потенційно шкідливим для клітинних структур, та сприяє збереженню стабільності еритроцитів. Фізіологічна функція пероксидази гемоглобіну полягає в захисті клітин від окислювального стресу та збереженні їхньої інтегритету.

6. У патологічних умовах пероксидазна активність гемоглобіну може мати негативний вплив на клітини та тканини. Збільшення цієї активності може призвести до накопичення оксиду водню, що сприяє окисненню біомолекул

та може викликати пошкодження клітинних структур. Такі умови можуть виникнути внаслідок різноманітних патологічних процесів, що порушують баланс окислювально-відновних реакцій у клітинах, що зрештою може призвести до загрози для здоров'я та правильного функціонування організму.



СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ТА ЛІТЕРАТУРИ

1. Paco Laveille, Anne Galarneau, Jullien Drone, Francois Fajula, Carole Bailly, et al.. Catalase-like activity of bovine met-hemoglobin: interaction with the pseudo-catalytic peroxidation of anthracene traces in aqueous medium. *Biotechnology Journal*, 2009, 4 (10), pp.1460. ff10.1002.
2. Bunkin, N. F., Bunkin, N. F., Shkirin, A. V., Shkirin, A. V., Ninham, B.W., Chirikov, S. N., Chaikov, L. L., Penkov, N. V., Kozlov, V. A., Kozlov, V. A., & Gudkov S. V. (2020). Shaking-induced aggregation and flotation in immunoglobulin dispersions: differences between water and water-ethanol mixtures. *ACS Omega*, 5, 14689-14701.
3. Reeder B.J. 2010. The redox activity of hemoglobins: From physiologic functions to pathologic mechanisms. *Antioxidants and Redox Signaling* 13, 7: 1087–1123.
4. Reeder B.J. 2017. Redox and Peroxidase Activities of the Hemoglobin Superfamily: Relevance to Health and Disease. *Antioxidants and Redox Signaling* 26, 14: 763–776.
5. Dotsenko O.I., Taradina G. V., Voronych M. V. 2018. Enzyme protection systems of erythrocytes in conditions of ascorbate recirculation and oxidative loading. *Regulatory Mechanisms in Biosystems* 9, 4: 584–590.
6. Cooper C.E., Schaer D.J., Buehler P.W., Wilson M.T., Reeder B.J., Silkstone G., Svistunenko D.A., Bulow L., Alayash A.I. 2013. Haptoglobin Binding Stabilizes Hemoglobin Ferryl Iron and the Globin Radical on Tyrosine β 145. *Antioxidants & Redox Signaling* 18, 17: 2264–2273.
7. Huo S., Lei X., He D., Zhang H., Yang Z., Mu W., Fang K., Xue D., Li H., Li X., Jia N., Zhu H., Chen C., Yan K. 2021. Ferrous hemoglobin and hemoglobin-based oxygen carriers acting as a peroxidase can inhibit oxidative damage to endothelial cells caused by hydrogen peroxide. *Artificial Organs*.

8. Пількевич Н.Б., Раздайбедін В.М., Боярчук О.Д. Гемоглобін: структура, біохімія та патологія: Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. – Луганськ: Альма-матер, 2007. – 90 с.
9. Іонов І. А., Комісова Т. Є. Фізіологія крові та внутрішнього середовища: методичні рекомендації (видання друге – доповнено та перероблено) / І. А. Іонов, Т. Є. Комісова. – Х. : ФОП Петров В.В., 2018. – 48 с.
10. Сибірна, Н, Люта, М & Климишин, Н. Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах. *Biol. Stud.* 2010; 4(1); 143–160.
11. Ahmed MH, Ghatge MS, Safo MK. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Subcell Biochem.* 2020;94:345-382.
12. Shaanan B. Structure of human oxyhaemoglobin at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol.* 1983 Nov 25;171(1):31-59.
13. Perutz MF. Stereochemical mechanism of oxygen transport by haemoglobin. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1980 Jun 24;208(1171):135-62.
14. Faivre B, Menu P, Labrude P, Vigneron C. Hemoglobin autooxidation/oxidation mechanisms and methemoglobin prevention or reduction processes in the bloodstream. Literature review and outline of autooxidation reaction. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1998 Jan;26(1):17-26.
15. Дудок К.П., Білий Р.О., Федорович А.М. Дослідження лігандних форм гемоглобіну методом електронної оптичної спектроскопії. *Вісник Львів. ун.-ту. Сер. біол.*, 2002; 29: 32-36.
16. Christine C. Winterbourn. Free-Radical Production and Oxidative Reactions of Hemoglobin. *Environmental Health Perspective.* Vol. 64, pp. 321-330, 1985.
17. Колісник, М. І., Колісник, Г. В., Нідзюлка, Є., & Влізло, В. В. (2009). Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітин. *Біологія тварин*, 11(1-2), 58-69.
18. Béatrice Faivre, Patrick Menu, Pierre Labrude & Claude Vigneron (1998).

19. Hemoglobin Autooxidation/Oxidation Mechanisms and Methemoglobin Prevention or Reduction Processes in the Bloodstream Literature review and outline of autooxidation reaction, Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 26:1, 17-26.

20. Boumba VA, Vougiouklakis T. Evaluation of the methods used for carboxyhemoglobin analysis in postmortem blood. *Int J Toxicol.* 2005 Jul-Aug;24(4):275-81.

21. Attia AM, Ibrahim FA, Abd El-Latif NA, Aziz SW, Abdelmottaleb Moussa SA, Elalfy MS. Determination of Human Hemoglobin Derivatives. *Hemoglobin.* 201.

22. К. Дудок, О. Канюка, А. Федорович, В. Бурда, Н. Сибірна. NO-залежна зміна співвідношення лігандних форм гемоглобіну у периферичній крові людей. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* 2016. Випуск 73. С. 130–136.

23. E. A. Rachmilewitz, J. Peisach, W. E. Blumberg. Studies on the Stability of Oxyhemoglobin A and Its Constituent Chains and Their Derivatives. *The Journal of Biological Chemistry?* Vol. 246, NO. 10, Issue of May 25, pp. 3356-3365.

24. К. П. Дудок, В. А. Бурда, М. Я. Люта, А. М. Федорович, О. І. Білий, Н. В. Єфіменко, О. П. Канюка, Н. О. Сибірна. Фізико-хімічні властивості лігандних форм гемоглобіну за експериментального стрептозоцинового цукрового діабету й алкогольної інтоксикації. *Журнал “Біологічні студії”*, 2017.

25. Dotsenko O. I., Mykutska I. V., Taradina G. V., Boiarska Z. O. Potential role of cytoplasmic protein binding to erythrocyte membrane in counteracting oxidative and metabolic stress. *Regulatory Mechanisms in Biosystems.* 2020. 11(3). С. 455–462.

26. O. I. Dotsenko, G. V. Taradina, A. M. Mischenko. Peroxidase activity of erythrocytes hemoglobin under action of low-frequency vibration. *Biologichni Studii / Studia Biologica*, 2021, 4, P. 3-16.

27. Widmer CC, Pereira CP, Gehrig P, Vallelian F, Schoedon G, Buehler PW, Schaer DJ. Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase. *Antioxid Redox Signal*. 2010.
28. Christine C. Winterbourn. Free-Radical Production and Oxidative Reactions of Hemoglobin. *Environmental Health Perspective*. Vol. 64, pp. 321-330, 1985.
29. Ratanasopa, K., Strader, M. B., Alayash, A. I., & Bulow, L. (2015). Dissection of the radical reactions linked to fetal hemoglobin reveals enhanced pseudoperoxidase activity. *Frontiers in physiology*, 6, 39. doi.org/10.3389/fphys.2015.00039
30. Rachmilewitz EA, Peisach J, Blumberg WE. Studies on the stability of oxyhemoglobin A and its constituent chains and their derivatives. *J Biol Chem*. 1971; 246(10), P. 3356-3366.
31. Attia, A. M. M., Aboulthana, W. M., Hassan, G. M., & Aboelezz, E. (2020). Assessment of absorbed dose of gamma rays using the simultaneous determination of inactive hemoglobin derivatives as a biological dosimeter. *Radiation and Environmental Biophysics*, 59(1), 131–144.
32. Benesch, R. E., Benesch, R., & Yung, S. (1973). Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Analytical Biochemistry*, 55(1), 245–248.
33. Vlasova, I.I. "Peroxidase Activity of Human Hemoproteins: Keeping the Fire under Control." *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 23,10 2561. 8 Oct. 2018.
34. Kapralov A, Vlasova II, Feng W, et al. Peroxidase activity of hemoglobin-haptoglobin complexes: covalent aggregation and oxidative stress in plasma and macrophages. *J Biol Chem*. 2009.
35. Boutaud, O., Moore, K. P., Reeder, B. J., Harry, D., Howie, A. J., Wang, S., Carney, C. K., Masterson, T. S., Amin, T., Wright, D. W., Wilson, M. T., Oates, J. A., & Roberts, L. J., 2nd (2010). Acetaminophen inhibits hemoprotein-catalyzed lipid peroxidation and attenuates rhabdomyolysis-induced

renal failure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(6).

36. Silverman TA, Weiskopf RB; Planning Committee and the Speakers. Hemoglobin-based oxygen carriers: current status and future directions. *Anesthesiology*. 2009;111(5):946-963.

37. Simoni J, Simoni G, Moeller JF. Intrinsic toxicity of hemoglobin: how to counteract it. *Artif Organs*. 2009;33(2):100-109.

38. Bulow L, Alayash AI. Redox Chemistry of Hemoglobin-Associated Disorders. *Antioxid Redox Signal*. 2017;26(14):745-747.

39. González-Sánchez, M. I., García-Carmona, F., Macià, H., & Valero, E. (2011). Catalase-like activity of human methemoglobin: a kinetic and mechanistic study. *Archives of biochemistry and biophysics*, 516(1), 10–20.

40. Tsuneshige A, Imai K, Tyuma I. The binding of hemoglobin to red cell membrane lowers its oxygen affinity. *J Biochem*. 1987 Mar;101.

41. Гонський Я.І., Максимчук Т.П. Біохімія людини: Підручник. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – 736 с.

42. Nagababu, E., Mohanty, J. G., Bhamidipaty, S., Osters, G. R., & Rifkind, J. M. (2010). Role of the membrane in the formation of heme degradation products in red blood cells. *Life sciences*, 86(3-4), 133–138.

43. Jarolim, P., Lahav, M., Liu, S. C., & Palek, J. (1990). Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of heme. *Blood*, 76(10), 2125–2131.