

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

СОРОКІНА АНАСТАСІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

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

Доценко О. І.
« » 2025

ПРОДУКЦІЯ ГІДРОГЕН ПЕРОКСИДУ В ЕРИТРОЦИТАХ ЛЮДИНИ ЗА
РІЗНИХ УМОВ ЇХ ФУНКЦІОНУВАННЯ

Спеціальність 091 Біологія

Магістерська робота

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

Оцінка: / /
(бал/за шкалою ЄКТС/за національною шкалою)

Голова Е.К.:
(підпис)

Вінниця 2025

Сорокіна А.О. Продукція гідроген пероксиду в еритроцитах людини за різних умов їх функціонування. 091 Біологія. Донецький національний університет імені Василя Стуса. Вінниця. 2025.

Проведено аналіз регуляторних механізмів, індукованих позаклітинним складом середовища, на генерацію гідроген пероксиду у еритроцитах.

Встановлено, що при інкубуванні еритроцитів в середовищі Na-фосфатного буфера, внутрішньоклітинний H_2O_2 є продуктом аутоокиснення гемоглобіну і може певним чином відображувати інтенсивність цього процесу за умов відсутності (чи незначної активації) псевдопероксидазної активності MetHb.

При інкубуванні еритроцитів в середовищі Cu^{2+} -Asc, підвищення вмісту внутрішньоклітинного H_2O_2 обумовлено дифузією позаклітинного H_2O_2 і супероксид аніонів ($\text{O}_2^{\cdot-}$), внаслідок формування високого концентраційного градієнту останніх. Залучення аскорбату до інактивації $\text{O}_2^{\cdot-}$ створює додаткове окисне навантаження на клітини внаслідок утворення H_2O_2 та окислених форм (моно)аскорбілового радикалу та дегідроаскорбінової кислоти.

Sorokina A.O. Hydrogen peroxide production in human erythrocytes under different conditions of their functioning. 091 Biology. Vasyl Stus Donetsk National University. Vinnytsia. 2025.

The analysis of regulatory mechanisms induced by the extracellular composition of the medium on the generation of hydrogen peroxide in erythrocytes was carried out.

It was established that when erythrocytes are incubated in a Na-phosphate buffer medium, intracellular H_2O_2 is a product of hemoglobin autoxidation and can to some extent reflect the intensity of this process in the absence (or slight activation) of the pseudoperoxidase activity of MetHb.

When erythrocytes are incubated in a Cu^{2+} -Asc medium, the increase in the intracellular H_2O_2 content is due to the diffusion of extracellular H_2O_2 and superoxide anions ($\text{O}_2^{\cdot-}$), due to the formation of a high concentration gradient of the latter. The

involvement of ascorbate in the inactivation of $O_2^{\cdot-}$ creates an additional oxidative load on the cells due to the formation of H_2O_2 and oxidized forms of the (mono)ascorbyl radical and dehydroascorbic acid.



ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Структура гемоглобіну і його схильність до аутоокиснення	7
1.2. Роль пероксиду водню у окисній модифікації гемоглобіну	10
1.3. Антиоксидантні системи	15
1.4. Метаболізм аскорбату в еритроцитах	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	
2.1. Експериментальні методи дослідження	24
2.2. Статистичні методи дослідження	27
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	
3.1. Дослідження продукування гідроген пероксиду в еритроцитах під впливом буферного розчину і радикалгенеруючої системи	28
3.2. Дослідження вмісту відновленої форми аскорбінової кислоти в позаклітинному і внутрішньоклітинному середовищі	30
3.3. Дослідження кореляційних зв'язків між компонентами метаболічної системи гідроген пероксиду в еритроцитах під впливом буферного сольового розчину	31
3.4. Дослідження кореляційних зв'язків між компонентами метаболічної системи гідроген пероксиду в еритроцитах під впливом радикал-генеруючої системи Cu^{2+} -Ascorbate.	34
ВИСНОВКИ	42
ЛІТЕРАТУРА	43

ВСТУП

Метаболізм H_2O_2 в еритроцитах людини був предметом пильного вивчення протягом багатьох десятиліть, яке нещодавно знову активізувалося [1 -7]. Як наслідок, еритроцити стали найбільш ретельно вивченою моделлю метаболізму H_2O_2 серед клітин людини. Тим не менш, важливі аспекти цієї системи та те, як її конструкція пов'язана з функціонуванням, залишаються незрозумілими.

Згідно з сучасними уявленнями, гідроген пероксид є основною молекулою групи активних форм кисню, що бере участь в регуляторних процесах. Сигнали, що передаються гідроген пероксидом, характеризуються своїм концентраційним порогом активації та тривалістю. Дія таких сигналів оборотна завдяки присутності у клітині особливого набору ферментативних систем, таких як каталаза, глутатіонпероксидаза, пероксиредоксин та ін. Помірне підвищення концентрації пероксиду водню активує механізми, пов'язані із захистом та адаптацією. Завдяки цим механізмам підтримується баланс утворення та утилізації гідроген пероксиду, а порушення цього балансу призводить до розвитку різних захворювань.

Особливістю еритроцитів є їх унікальна деформуємось. В кровотоці навіть за фізіологічних умов має місце деформаційний стрес [9, 10]. Деформація еритроцитів індукує вивільнення вазоактивних сигнальних молекул, таких як оксид азоту (NO), АТФ, супероксид-аніон радикал ($O_2^- \cdot$), перекис водню (H_2O_2) для регуляції судинного тонуусу [11-14].

На відміну від інших типів клітин, основними джерелами $O_2^- \cdot$ і H_2O_2 в еритроцитах є реакція аутоокислення гемоглобіну (HbO_2) до metHb і процеси його подальшої деградації [15 - 19]. Аутоокислення HbO_2 відбувається спонтанно з низькою швидкістю з утворенням $O_2^- \cdot$, який далі перетворюється на перекис водню і кисень.

В умовах гіпоксії шлях аутоокиснення гемоглобіну набуває особливого значення і може ставати джерелом негативних наслідків для організму [11]. Накопичення H_2O_2 може спричинити незворотне окислювальне пошкодження

молекул гемоглобіну. H_2O_2 вважається значущим медіатором у реакціях між окисленим гемоглобіном і мембранними ліпідами в умовах окисного стресу. Окислений гемоглобін і, зокрема, геміхроми, утворені денатурацією гемоглобіну, мають набагато вищу спорідненість до мембрани еритроцитів, утворюючи незворотні перехресні зв'язки, залучаючи як смугу 3 і спектрин [20, 21]. Мембраннозв'язаний гемоглобін (MBHb) впливає на функціональність мембрани та всієї клітини, включаючи заряд клітинної поверхні, проникність мембрани та механічні властивості.

Таким чином, регуляція окисного метаболізму гемоглобіну може лежати в основі ефекту гормезису при дії окислювачів на еритроцити.

Мета роботи полягала в дослідженні молекулярних механізмів, які лежать в основі продукування і утилізації гідроген пероксиду в еритроцитах за різних умов їх функціонування.

Задачі дослідження:

1. Експериментально дослідити зміни кількісного вмісту гідроген пероксиду в еритроцитах за умов їх інкубування в середовищах різного складу.
2. Дослідити зміни аскорбату в клітинах і позаклітинному середовищі при інкубуванні еритроцитів в середовищі Cu^{2+} - Asc.
3. Провести статистичний аналіз з залученням біохімічних показників, отриманих раніше, з метою встановлення молекулярних механізмів продукування і утилізації гідроген пероксиду в клітинах.

Об'єкт дослідження - еритроцити людини.

Предмет дослідження - зміни продукції H_2O_2 під впливом різних фізіологічних або експериментальних умов.

Практична значимість - зміни функціонального стану організму, в тому числі пов'язані з порушенням редокс-гомеостазу, будуть відображатися на стані еритроцитів, що робить необхідним дослідження захисних механізмів клітин і пошук способів регуляції їх функціонування при окислювальному стресі.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. Структура гемоглобіну і його схильність до аутоокиснення

Гемоглобін людини є тетрамером, що складається з однієї пари α -подібних ланцюгів глобіну та пари не- α - або β -подібних ланцюгів. α -подібні ланцюги кодуються кластером генів на короткому плечі 16-ї хромосоми, тоді як β -подібні ланцюги кодуються кластером генів, розташованих на короткому плечі 11-ї хромосоми. Найпоширенішими гемоглобінами людини є гемоглобіни А (97%) та А2 (2,5%) у дорослих та фетальний гемоглобін F (80% у новонароджених) [22].

Кожен ланцюг глобіну містить гідрофобну кишеню, зв'язану з протетичною гемовою групою. Остання складається з атома заліза, розташованого в центрі порфіринового кільця. Через шість координаційних позицій атом заліза утворює чотири зв'язки з атомами азоту порфірину, один ковалентний зв'язок із залишком гістидину поліпептидного ланцюга та шостий зв'язок з екзогенними лігандами, такими як кисень та монооксид вуглецю [22]. За відсутності лігандів у шостій координаційній позиції гемове залізо знаходиться у високоспіновому стані заліза [23]. Зв'язування лігандів включає зміни конформації в низькоспінову гексакоординацію. Гідрофобне середовище гемової кишені запобігає аутоокисненню гемового заліза. Тому мутації в цій області можуть серйозно погіршити здатність зв'язувати кисень [22].

Зв'язування кисню супроводжується значними конформаційними змінами молекули Hb. Дезоксигемоглобін (Т-стан) має низьку спорідненість до кисню та високу спорідненість до гетеротропних ефекторів, включаючи протони, хлорид, вуглекислий газ та органічні фосфати, наприклад, 2,3-дифосфогліцерат. Оксигемоглобін (R-стан) має вищу спорідненість до кисню та нижчу спорідненість до ефекторів. Конформаційні зміни ґрунтуються на здатності гетеротропних ефекторів переважно зв'язуватися з дезоксигенованим Hb та сприяти вивільненню кисню [22].

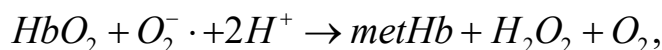
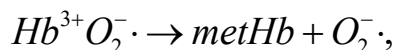
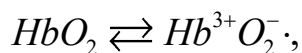
Оксигенований Нб (оxуНб) часто позначається в літературі як $\text{HbFe}^{2+}\text{O}_2$ або HbFe(II)O_2 . Однак зв'язування кисню з Нб супроводжується міграцією заряду від гемового заліза до кисню, так що структура оxуНб має вигляд $\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^-$. ОхуНб є досить стабільною молекулою, але повільно самоокислюється до metНб зі швидкістю $\sim 0,5\text{--}3\%$ на день [22].

Аутоокиснення гемоглобіну відбувається за участю зв'язаного з гемоглобіном молекулярного кисню та спрямовано виключно на йон Fe^{2+} протетичної групи гему, що призводить до утворення супероксид-радикалу і метгемоглобіну. Ця реакція протікає з низькою швидкістю.

Особлива четвертинна структура необхідна не тільки для забезпечення ефективного зв'язування кисню, але й забезпечує її молекулярну стабільність. Відомо, що існують великі відмінності у швидкості аутоокиснення α і β ланцюгів, тому аутоокиснення гемоглобіну відбувається з утворенням двох проміжних форм, які є валентними гібридами гемоглобіну $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ і $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$. Анормальні молекули гемоглобіну з незвичайними властивостями зв'язування кисню самі по собі більш схильні до окислення, ніж оксигемоглобін А. Зазначимо, що геміхроми походять з нестабільного гемоглобіну, які мають більшу тенденцію до спонтанного окиснення до метгемоглобіну і геміхрому. Утворення нестабільних форм гемоглобіну також може бути поясненням росту к аутоокиснення.

Перетворення HbO_2 у геміхром завжди супроводжується утворенням високоспінової форми феригемоглобіну. Стадія утворення високоспінової форми феригемоглобіну є швидкість лімітуючою. Для оксигемоглобіну А ця стадія відбувається дуже повільно.

Механізм аутоокиснення HbO_2 можна представити наступною послідовністю реакцій [24]:



то сумарна реакція може бути представлена як:



Тобто, на 1 моль гему, що аутоокислюється до мет-форми, виділяється 3 моль O_2 . Можливо аутоокиснення обмежено певним захисним механізмом, що забезпечує оксигенацію цитоплазматичного гемоглобіну за нестачі кисню. $O_2^{\cdot-}$, що утворюється в результаті дисоціації $Hb^{3+}O_2^{\cdot-}$ не інактивується повністю ферментами.

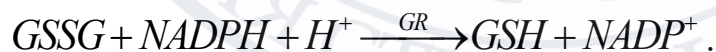
Утворений супероксиданіон радикал інактивується ферментом супероксиддисмутазою (SOD):



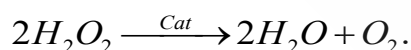
Вилучення гідроген пероксиду відбувається також за участю відновленого глутатіону (GSH) та глутатіонпероксидази (GPx):



Окислений глутатіон (GSSG) відновлюється ферментом глутатіон редуктазою (GR):



До вилучення гідроген пероксиду залучається фермент каталаза:



За даними [24] аутоокиснення гемоглобіну тільки на 31% інгібується SOD і на 53% каталазою. Тому, існує висока імовірність взаємодії $O_2^{\cdot-}$ з HbO_2 з утворенням MetHb і H_2O_2 . H_2O_2 знову може окислювати HbO_2 . Таким чином, внутрішньоклітинний H_2O_2 є продуктом аутоокиснення гемоглобіну і може певним чином відображувати інтенсивність цього процесу за умов відсутності (чи

незначної активації) псевдопероксидазної активності MetHb. За нашими даними, утворення ендogenousного кисню сприяє нормалізації вмісту HbO₂, подолання стану гіпоксії і уповільненню аутоокиснення.

Різні чинники можуть збільшити швидкість аутоокиснення Hb, включаючи старіння клітин, гіпоксію та патології еритроцитів, такі як серповидноклітинна анемія, таласемія, дефіцит глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та метгемоглобінемія [22]. Одним із способів оцінки пошкодження клітин, індукованого Hb, є дослідження мембрани, яка вважається основною мішенню для денатурованих продуктів Hb та атаки активних форм кисню.

1.2. Роль пероксиду водню у окисній модифікації гемоглобіну

H₂O₂ має унікальні характеристики, які відрізняють його від інших активних форм кисню (ROS). На відміну від супероксиду, який негативно заряджений і тому потребує аніонних каналів для перетину мембран, H₂O₂ є нейтральним і може легко проходити через них. Він має довший період напіврозпаду, ніж інші ROS, і може брати участь у клітинних шляхах передачі сигналу через свої реакції з тіоловими групами білків [22]. Більша частина внутрішньоклітинного H₂O₂ еритроцитів утворюється шляхом дисмутації O₂^{-•}, який є продуктом аутоокиснення Hb [24]. Зазвичай відновлений глутатіон та каталаза елімінують H₂O₂, щоб підтримувати його внутрішньоклітинну концентрацію на стаціонарному рівні ~0,2 нмоль·л⁻¹ [26].

H₂O₂ вважається значущим посередником у реакціях між окисленим Hb та мембранними ліпідами за умов окисного стресу. Модельні дослідження ліпосом, що містять очищений Hb, показують, що додавання каталази пригнічувало окиснення Hb та перекисне окислення ліпідів, тоді як додавання SOD не впливало на окисне пошкодження. Було зроблено висновок, що H₂O₂, але не O₂^{-•}, залучається до окисного [22].

Перекис водню може реагувати з oxyHb або metHb , утворюючи ферилгемоглобін [ферилHb , HbFe(IV)=O] та оксоферилгемоглобін [оксоферилHb, HbFe(IV)=O] відповідно. Обидва продукти є сильними окисниками [25], а саме:

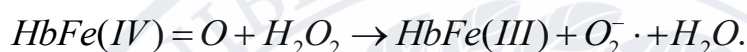
- окиснення oxyHb гідроген пероксидом:



- окиснення metHb гідроген пероксидом:



- окиснення гідроген пероксиду ферилгемоглобіном:

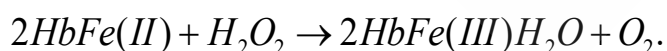
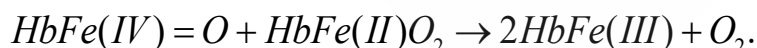


Вважається, що ця реакція сприяє деградації гему шляхом утворення супероксиду в гідрофобній гемовій кишені. SOD не може проникнути в кишеню гема та дисмутувати супероксид, який, у свою чергу, окислює тетрапірольні кільця. Більше того, передбачуване протонування супероксиду в гемовій кишені дає пергідроксильний радикал ($\cdot\text{OOH}$), який, як відомо, ініціює перекисне окислення ліпідів [25]. Утворення супероксиду частково перешкоджається конкурентними реакціями між оксоферилHb та перекисом водню, які генерують кисень замість супероксиду [25].



Підсумок реакцій, зображених у рівняннях, вказує на те, що Hb циклічно переходить між Fe(III) та ферильним Fe(IV) станами, споживаючи пероксид водню [11].

Кілька реакцій можуть сприяти накопиченню внутрішньоклітинного metHb , включаючи реакцію між ferrylHb та oxyHb , яка дає дві молекули metHb [22], та пряму реакцію між перексидом водню та deoxyHb [6]:



MetHb може реагувати з перекисом водню, утворюючи два окислювальні сполуки: HbFe(IV)=O та білковий радикал $\cdot\text{HbFe(IV)=O}$, центрований на

глобіновому ланцюзі [20]. Цей короткоживучий фериловий радикал швидко реагує з киснем, утворюючи пероксильні радикали, які можуть розкладатися на незворотно зелені похідні Hb, включаючи холеглобін та сульфгемоглобін [26]. Обидва похідні схожі тим, що мають ковалентно модифіковані порфіринові кільця та гідрофобну спорідненість, що дозволяє їм зв'язуватися з ліпідами. Ця особливість пов'язана з пошкодженням мембрани шляхом екстракції мембранних компонентів, таких як фосфатидилсерин, що призводить до зміни форми та перерозподілу фосфоліпідів [22].

MetHb може бути перетворений на низькоспінові сполуки Hb заліза, які називаються геміхромами [28]. Цей процес полегшується, коли структура глобіну дестабілізується або з'являється відповідний ліганд. Під час перетворення молекула води в шостому координаційному положенні заліза metHb заміщується екзогенним або ендогенним лігандом.

«Оборотні геміхроми» зазвичай утворюються ендогенними лігандами, такими як залишки гістидину глобіну, і можуть бути відновлені назад до дезоксиHb. Значні спотворення третинної структури Hb можуть призвести до утворення другого типу геміхрому, який називається «необоротні геміхроми». Останні не можуть бути перетворені назад на нормальний Hb [28] і схильні до подальшого окислювального пошкодження, що може призвести до дисоціації поліпептидних ланцюгів та вивільнення гемового фрагмента [28].

Показано, що вивільнення гемового фрагмента денатурованими геміхромами ініціює окислювальне пошкодження сусідніх компонентів мембрани [22]. Гідрофобна природа гемового фрагмента полегшує його взаємодію з ліпідним доменом мембрани. Швидкість перенесення гему в мембрану залежить від кількох факторів, включаючи швидкість окислення, природу мембранних ліпідів та реакційне середовище. Було показано, що вільний гем інгібує низку цитозольних ферментів, а також неспецифічно реагує з мембранними білками, що призводить до аномального окислення тіолів та зшивання.

Вільний гем розкладається *in vivo* через систему гемоксигенази з утворенням монооксиду вуглецю, білівердину та вільного заліза. *In vitro* було

показано, що вивільнення гемового заліза каталізується внутрішньоклітинним глутатіоном або перекисом водню. Вільне залізо є потенційно токсичним, здатним діяти як реагент Фентона у циклі Габера-Вайсса, що призводить до утворення шкідливих гідроксильних радикалів ($\cdot\text{OH}$) [22].

Генерація гідроксильних радикалів вільним від гему залізом та перекисом водню відбувається за реакцією:



Короткий опис деяких основних шляхів, що пов'язують окислення Нб та пошкодження мембран, показано на рис. 1.1.

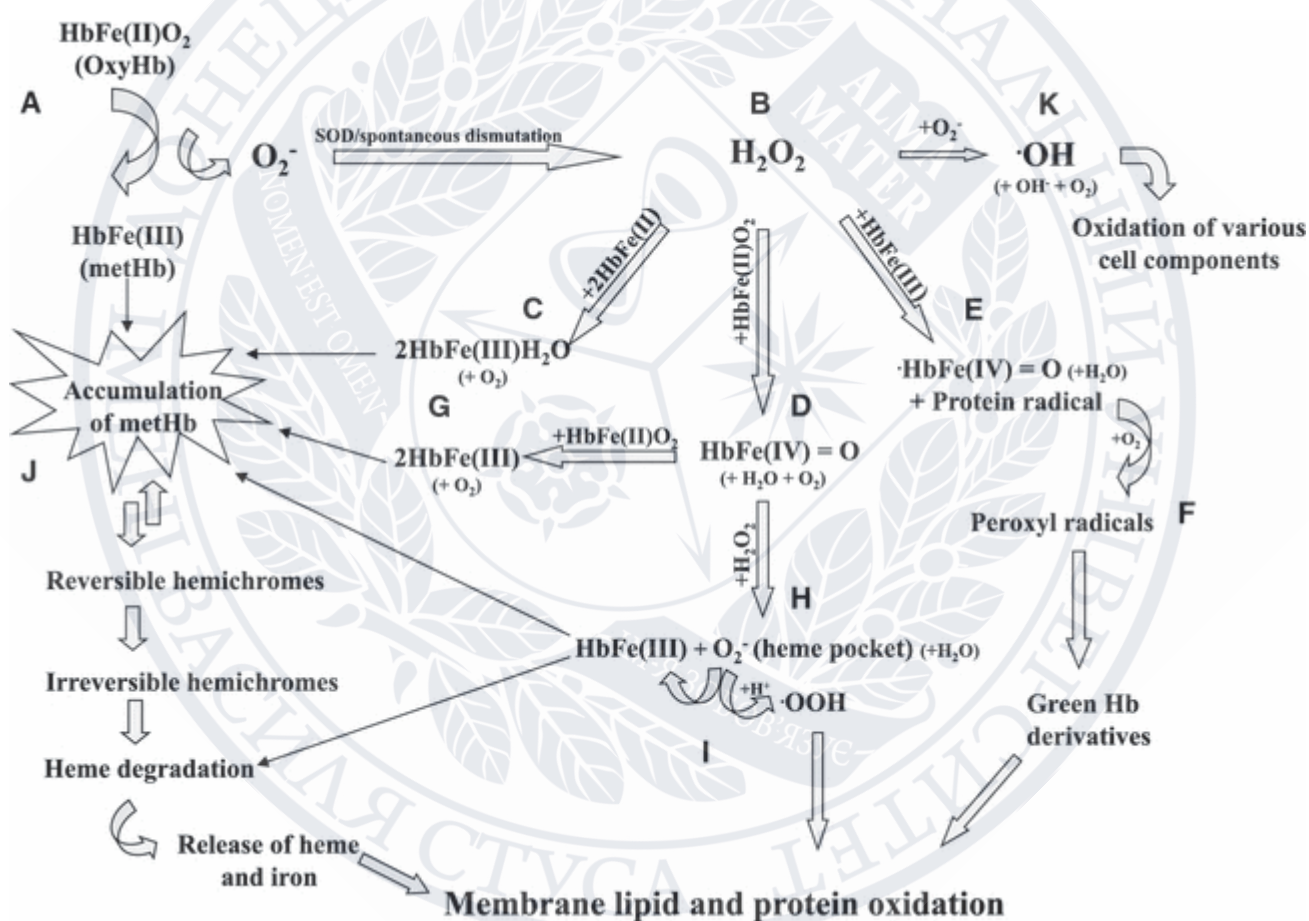


Рис. 1.1. Огляд основних шляхів утворення і витрачання гідроген пероксиду та залученість до пошкодження гемоглобіну і мембран.

Таким чином, аутоокислення оксигенованого Нб [oxyHb , HbFe(II)O_2] генерує метгемоглобін [metHb , HbFe(III)] та супероксидні аніони $\text{O}_2^{\cdot-}$ [27]. Спонтанна або ферментативна дисмутація $\text{O}_2^{\cdot-}$ генерує пероксид водню (H_2O_2)

[22]. (B) Накопичення H_2O_2 , спричинене втратою життєво важливих антиоксидантів (каталази, глутатіону), може спричинити незворотне окислювальне пошкодження молекул Hb. H_2O_2 може реагувати з деоксигенованим Hb [HbFe(II)], охуHb та metHb, утворюючи metHb (C), ferrylHb [HbFe(IV)=O] (D) та оксоферрилHb [$\cdot$ HbFe(IV)=O] (E) відповідно. Реакція між H_2O_2 та metHb (E) також генерує білковий радикал, який може далі реагувати з киснем, утворюючи пероксильні радикали (F) та, зрештою, розкладатися на ліпофільні зелені похідні Hb, які зв'язуються з мембранними ліпідами та викликають окислювальне пошкодження. FerrylHb (D) може реагувати з охуHb, утворюючи дві молекули metHb (G), або з H_2O_2 (H) з утворенням metHb та $O_2^{\cdot-}$ [26]. Було показано, що утворення $O_2^{\cdot-}$ в гемовій кишені Hb призводить до деградації гему. Альтернативно, протонування $O_2^{\cdot-}$ генерує пергідроксильні радикали ($\cdot$ OOH) (I), які, як відомо, ініціюють перекисне окислення мембранних ліпідів [26]. Накопичення внутрішньоклітинного metHb (J) може призвести до утворення геміхромів. Незворотні геміхроми зазнають подальшої денатурації, що призводить до деградації гему та вивільнення гемової частини та атомів заліза [22]. Показано, що обидва продукти деградації ініціюють окисне пошкодження мембран. Присутність $O_2^{\cdot-}$ та H_2O_2 може призвести до утворення гідроксильних радикалів ($\cdot$ OH)(K) через реакцію Габера-Вайса. Деградація гему вивільняє атоми заліза, які можуть каталізувати цю реакцію. $\cdot$ OH є високореактивним і може спричиняти окисне пошкодження різних компонентів клітини. Всі три основні кисневі радикали ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 та $\cdot$ OH) можуть брати участь в окисній денатурації Hb та пошкодженні мембрани.

Утворення геміхрому добре задокументовано при патологіях еритроцитів, пов'язаних з аномальними гемоглобінами (Hb), такими як таласемія та серповидноклітинна анемія. Нормальний людський гемоглобін (HbA1c) вважається відносно стійким до утворення геміхрому. Однак певні умови, включаючи тепловий стрес, зміни pH та старіння, можуть збільшити його схильність до утворення геміхрому.

1.3. Антиоксидантні системи

Через обмежену здатність до синтезу білка, еритроцити потребують надійного захисту від ROS та потужних механізмів відновлення окислювальних пошкоджень [29]. Для підтримки своїх антиоксидантних систем еритроцити покладаються як на ферментативні (ендогенні), так і на неферментативні (додаткові) механізми. Ферментативні механізми включають каталазу (Cat), глутатіонпероксидазу (GPx) та супероксиддисмутазу (SOD), тоді як неферментативні антиоксиданти включають глутатіон та аскорбінову кислоту. Ці антиоксиданти, разом з молекулами, що діють як окисно-відновні пари та/або кофактори ферментів, такі як глутатіон (GSH), та антиоксидантні ферменти, такі як глутатіонпероксидаза, каталаза та супероксиддисмутаза, відповідають за поглинання та видалення активних форм кисню (ROS) з організму.

Ферментативні та неферментативні окисно-відновні антиоксидантні системи, що присутні в еритроцитах, відіграють вирішальну роль у підтримці гемоглобіну у відновленому стані. Це критично важливо для його здатності зв'язуватися з киснем. Ці системи працюють, контролюючи вироблення метгемоглобіну, тим самим зменшуючи утворення активних форм кисню (ROS). Крім того, вони захищають ліпіди, білки, канали та метаболічні ферменти клітинних мембран від пошкодження.

S-глутатіонілювання білка – це оборотна посттрансляційна модифікація, яка відіграє вирішальну роль у регулюванні функції білка та клітинних процесів. Ця модифікація включає зв'язування глутатіону з залишками цистеїну, що може модулювати активність ферментів та білок-білкові взаємодії, а також захищати від незворотного окислення. S-глутатіонілювання стимулюється окисним або нітрозативним стресом і може регулюватися такими ферментами, як глутатіон-S-трансферазою-P та глутаредоксином. Ці процеси впливають на різні клітинні функції, включаючи клітинну сигналізацію, метаболізм та апоптоз. Цикл глутатіонілювання-деглутатіонілювання застосовується поряд з іншими посттрансляційними модифікаціями, такими як фосфорилювання, ацетилювання

та глікозилювання, для точного налаштування функції білка. Розуміння S-глутатіонілювання має вирішальне значення для з'ясування клітинних реакцій на окисно-відновні зміни та стресові умови.

Неферментативна ланка антиоксидантного захисту включає антиоксидантні молекули та окисно-відновні пари, такі як відновлений/окислений глутатіон (GSH), аскорбат/дегідроаскорбат та α -токоферол [30]. GSH, лінійний трипептид, що складається з L-глутаміну, L-цистеїну та L-гліцину, синтезується с-глутамінцистеїнлігазою та глутатіонсинтазою. Глутатіон існує або у відновленій формі (GSH), або в окисненій формі (GSSG, димер двох молекул GSH). У здорових еритроцитах людини більшість глутатіону існує у відновленій формі, GSH, яка життєво важлива для відновлення аскорбату, окислених білків та окислених ліпідів. Ферменти, такі як глутаредоксин (GRx) та GPx, використовують GSH як відновлювач. Співвідношення GSH/GSSG в еритроцитах використовується для вимірювання окисно-відновного стану організму, причому відновлений GSH зазвичай становить 90–95% від загальної кількості GSH. Ферменти, що використовують GSH як відновлювальний еквівалент, включають GRx та GPx [29]. Глутатіонредуктаза – це фермент, відповідальний за рециркуляцію GSH, який перетворює глутатіондисульфід (GSSG) назад у відновлений GSH шляхом споживання NADPH [29].

Аскорбат, широко відомий як вітамін С та ключовий відновлювальний агент в еритроцитах, синтезується або ресинтезується з дегідроаскорбінової кислоти за допомогою глутатіону в процесі, що каталізується різними ферментами, зокрема цитоплазматичними GRx. Ці ферменти не тільки сприяють перетворенню дегідроаскорбінової кислоти, але й відіграють роль у деглутатіонілюванні, відновленні дисульфідів білка та утворенні зв'язку Fe-S. Основним методом транспортування аскорбату в еритроцити є транспортер глюкози GLUT1. Для збереження окисно-відновного гомеостазу окисно-відновна пара аскорбат/дегідроаскорбат зменшує кількість metHb та окисантів, що потрапляють у клітинну мембрану. Окисно-відновна система плазматичної мембрани (PMRS) підтримується аскорбатом, який сприяє різним

антиоксидантним механізмам шляхом відновлення оксидантів та metHb. PMRS переносить електрони з внутрішньоклітинного цитозольного компартменту еритроцитів у позаклітинне середовище шляхом окислення внутрішньоклітинних донорів електронів, таких як аскорбат та NADH, діючи як компенсаторний механізм проти підвищеного рівня ROS/OS, і може сприяти окисно-відновній регуляції в усьому організмі [31].

Точне фізіологічне значення PMRS до кінця не зрозуміле, але дослідження показують, що підвищена активність PMRS у старіючих еритроцитах може бути захисною реакцією для посилення позаклітинного відновлення дегідроаскорбату та рециркуляції аскорбату в умовах підвищеного OS. Отже, PMRS в еритроцитах може функціонувати як компенсаторний механізм проти підвищеного рівня ROS та OS, відіграючи роль в окисно-відновній регуляції в усьому організмі [31].

Метаболізм глюкози є вирішальним для функціонування еритроцитів через три основні механізми. По-перше, еритроцити покладаються виключно на гліколіз для вироблення АТФ. По-друге, близько 25% глюкози в еритроцитах використовується для вироблення специфічного метаболіту 2,3-бісфосфогліцерату для регулювання спорідненості гемоглобіну до кисню. По-третє, еритроцити використовують окислювальну гілку реакцій пентозо-фосфатного шляху (PPP) для генерації відновлювальних еквівалентів (NADPH) з метою підтримки балансу глутатіону та боротьби з окисним стресом.

Через відсутність мітохондрій в еритроцитах, їхній метаболізм глюкози переважно контролюється гліколізом та пентозо-фосфатним шляхом (PPP). Гліколіз виробляє АТФ для підтримки градієнтів іонів через мембрану, NADH для перетворення метгемоглобіну на оксигемоглобін та піруват на лактат. Тим часом PPP виробляє NADPH, життєво важливий біологічний переносник відновлювальних еквівалентів, який зазвичай діє як кофермент. NADPH поширений у різних клітинах, де він відіграє вирішальну роль у збереженні окисно-відновного балансу. В еритроцитах людини концентрація NADPH зазвичай коливається від 16 до 44,9 мкМ.

Окисно-відновні еквіваленти, включаючи NADH та NADPH, складають другу категорію антиоксидантних систем [29]. Ці еквіваленти забезпечують відновлювальні аналоги для ферментів, що каталізують окисно-відновні реакції в еритроцитах. Під час гліколізу та реакцій PPP вони зазнають відновлення. PPP відповідає за перетворення глюкозо-6-фосфату (G6P) на NADPH, який життєво важливий для відновлення окислених білків та захисту від активних форм кисню (ROS) в еритроцитах [32].

Рівень кисню впливає на метаболізм еритроцитів через білок смуги 3 (аніонообмінник 1) (B3p-AE1). Взаємодія між B3p-AE1 та Hb, разом з гліколітичними процесами, є важливою. Як найпоширеніший мембранний білок в еритроцитах, B3p-AE1 життєво важливий для аніонного обміну та підтримки клітинного гомеостазу, а також є основною мішенню для оксидантів. При високих станах кисню B3p пригнічує гліколітичні ферменти, сприяючи PPP та посилюючи утворення відновлювального еквівалента NADPH, який підтримує пов'язані антиоксидантні системи. І навпаки, при низьких станах кисню дезоксигемоглобін зв'язується з B3p, вивільняючи гліколітичні ферменти з мембрани та посилюючи гліколіз (посилює вироблення енергії у формі ATP та NADH). Статус кисню може безпосередньо впливати на функцію B3p, можливо, через окислення транспортера або пов'язаних з ним білків. Підтримка балансу між гліколізом та PPP має вирішальне значення для ефективного задоволення метаболічних потреб еритроцитів, включаючи функцію мембранних насосів, цілісність цитоскелету та ліпідний гомеостаз, які залежать від рівня кисню в легенях або периферичних капілярах [33, 34].

Система антиоксидантного захисту тісно пов'язана з енергетичним статусом еритроцитів. Тривале голодування може знизити рівень відновленого NADPH в еритроцитах через обмежену доступність глюкози для гліколітичного шляху. Крім того, відсутність рибофлавінів, необхідних для коферменту флавінаденіндинуклеотиду (FAD) та вирішальних для функції глутатіонредуктази, може поставити під загрозу антиоксидантний захист під час голодування. NADPH відіграє життєво важливу роль у підтримці окисно-

відновного балансу в еритроцитах. Будь-яке порушення роботи ферментів у PPP може суттєво вплинути на загальну стабільність та проникність мембран.

Третя категорія антиоксидантних систем еритроцитів включає ферментативні антиоксидантні системи, які відіграють життєво важливу роль у підтримці їхньої функціональності. Ферменти, що беруть участь в антиоксидантному захисті зрілих еритроцитів, це супероксиддисмутаза (SOD1), каталаза (Cat), глутатіонпероксидаза (GPx) та пероксиредоксин (Prx2). Родина ферментів SOD складається з трьох ізоформ з різною структурою простетичних груп (манган або купрум та цинк), компартменталізацією та функціональним значенням. Особливо важливою в зрілих еритроцитах є ізоформа SOD1, що містить купрум/цинк, яка сприяє дисмутації супероксидних аніонів на перекис водню.

Каталази – це ферменти, що відіграють вирішальну роль у розщепленні перекису водню на воду та кисень. Існує чотири основні типи каталаз, включаючи монофункціональні каталази (типові каталази), біфункціональні каталази-пероксидази, негемові каталази та різноманітні білки з незначною каталітичною активністю. Каталаза еритроцитів людини належить до групи монофункціональних каталаз [35].

GPx є критичним компонентом тіол-залежних антиоксидантних систем, що містяться в еритроцитах [29]. У ссавців існує вісім різних типів глутатіонпероксидаз (GPx1–GPx8), причому GPx1 є переважною ізоформою в еритроцитах. GPx використовує глутатіон (GSH) як відновник, який допомагає каталізувати перетворення H_2O_2 на воду.

Тіолвмісні речовини є важливими для захисту організму від оксидативного пошкодження та регулювання окисно-відновної сигналізації. Тіолзалежна антиоксидантна система складається з глутатіону (GSH), тіоредоксинів (Trxs), глутаредоксинів (Grxs) та пероксиредоксинів (Prxs), які діють як донори електронів для створення потужної антиоксидантної захисної системи від потенційної оксидантної загрози.

Prx-пероксидази (Prx) відносяться до групи сульфгідрилзалежних пероксидаз. Серед шести відомих ізоферментів Prx-пероксидаз (Prx1–6) у ссавців лише три виявлені в еритроцитах: Prx1, Prx2 та Prx6. З цих трьох Prx2 є найпоширенішим. Prx-пероксидази відповідають за відновлення органічних гідропероксидів та H_2O_2 до води та спиртів [36, 37] .

Таким чином, перекис водню перетворюється на кисень і воду ферментами Cat, GPx або Prx2. Як правило, за звичайних обставин GPx є основним ферментом, відповідальним за розщеплення більшої частини H_2O_2 шляхом перетворення відновленого GSH на GSSG. GSSG потім відновлюється GSH-редуктазою за допомогою NADPH. Однак, у ситуаціях високого рівня O_2 та підвищеного рівня H_2O_2 , Cat втручається , щоб перетворити H_2O_2 на воду .

Неферментативні антиоксиданти можуть вироблятися в організмі або отримуватися з природних джерел. Вони класифікуються на дві категорії: водорозчинні антиоксиданти, включаючи вітамін С, ліпоєву кислоту, глутатіон та сечову кислоту, та ліпідорозчинні антиоксиданти, такі як каротин, мелатонін, вітамін Е та коензим Q. Вітамін С ефективно зменшує кількість супероксидних та ліпідопероксильних радикалів, а також працює синергетично з вітаміном Е.

1.4. Метаболізм аскорбату в еритроцитах

Аскорбінова кислота, або аскорбат, є антиоксидантом завдяки високому відновному потенціалу свого С-С подвійного зв'язку (рис. 1.2), який легко віддає один або два атоми водню та електрони різноманітним окислювачам, включаючи вільні кисневі радикали, пероксидази та супероксид [38]. Кожен етап окислення аскорбату є оборотним, і це дозволяє повернення до аскорбату. Частково окислена форма аскорбату, яка називається (моно)аскорбіловим вільним радикалом або MDA (рис. 1.2), може служити акцептором або донором електронів. MDA напрочуд стабільний і може бути легко виявлений за допомогою ЕПР при концентраціях до 10 нМ у біологічних рідинах. Втрата другого електрона призводить до утворення дегідроаскорбінової кислоти (DHA), яка не є кислотою.

Це контрастує з аскорбатом, який несе негативний заряд при фізіологічному рН (рКа 3'-гідроксилу становить 4,2).

DHA досить нестабільна за фізіологічного рН та температури, з періодом напіврозпаду близько 6 хвилин. При гідролізі лактонового кільця DHA перетворюється на 2,3-дикето-1-гулонову кислоту (рис.1.2). Цей останній крок, ймовірно, незворотний у клітинах, хоча його можна зняти обробленням меркаптоетанолом *in vitro*. Втрата аскорбату шляхом розкладання DHA, очевидно, є марнотратною, і такі клітини, як еритроцити, мають надлишкові механізми для переробки DHA назад в аскорбат.

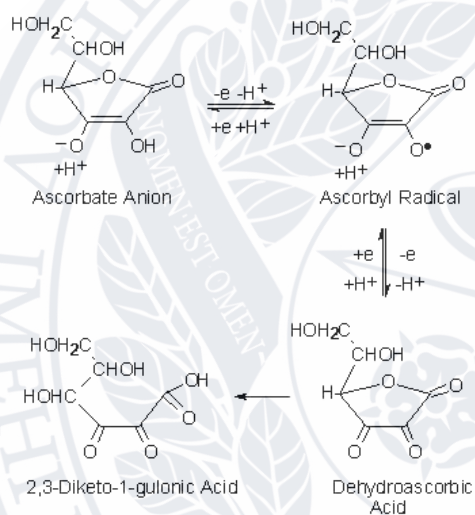


Рис. 1.2. Окисно-відновні перетворення аскорбінової кислоти.

Еритроцити є найважливішими структурами, що запобігають незворотній деструкції дегідроаскорбату (DHA). Концентрація аскорбату в еритроцитах в нормі приблизно дорівнює його концентрації в плазмі [39], тобто еритроцити не накопичують аскорбат на відміну від білих клітин крові, де його вміст на два порядки вище. Здатність еритроцитів бути проникними для дегідроаскорбату і швидко відновлювати останній є найважливішою умовою тривалого збереження пулу аскорбату в організмі [40, 41]. У клінічних зразках плазми крові вітамін С зберігається значно довше, якщо останній не відділяється від еритроцитів до часу обробки зразків. Плазма, за відсутності червоних кров'яних тілець, втрачає вітамін С досить швидко, якщо не вживаються спеціальні запобіжні заходи. У

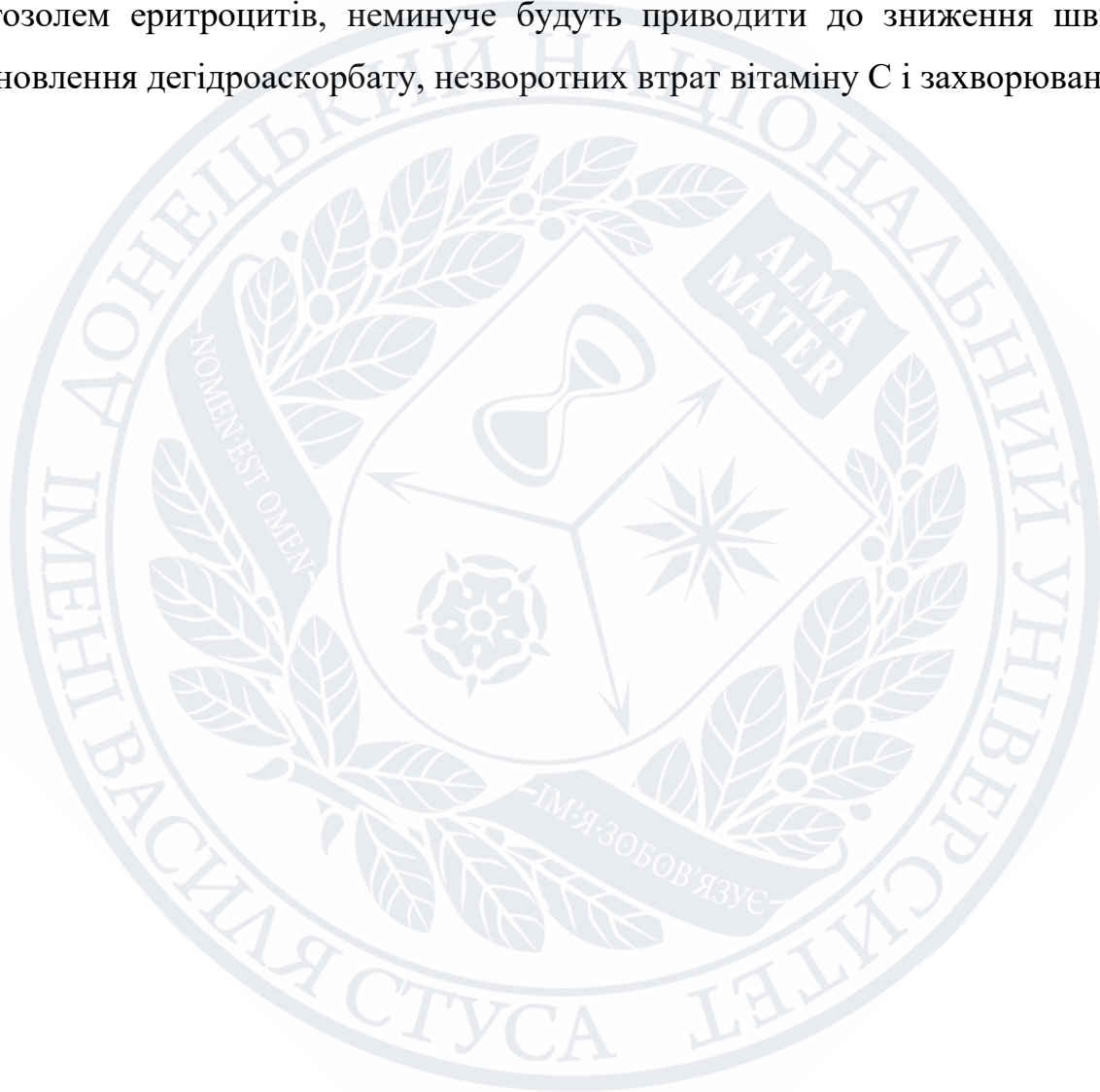
клітинах ссавців аскорбат є основним донором електронів, що залучаються до процесів відновлення як внутрішньо-клітинних, так і позаклітинних метаболітів (трансмембранне перенесення електронів). Стабілізація рівня вітаміну С плазми може бути пов'язана з перенесенням електронів з аскорбінової кислоти або NADH еритроцитів за участю трансмембранних білків [40]. Ці білки знайдені в еритроцитах організмів, у яких не може утворюватися вітамін С, таких як людина, але відсутні у видів, які синтезують вітамін С. Цілковито можливо, що транспортування електронів через мембрану еритроцитів має важливе значення при захворюваннях або в умовах, коли вміст вітаміну С у плазмі знижується, наприклад, цукровий діабет [42, 43]. Недавні дослідження свідчать про відновлення інтересу до використання фармакологічних доз вітаміну С для збереження еритроцитів. Показано, що вітамін С частково захищає еритроцити від окислювальних змін під час зберігання, значно знижуючи механічну крихкість і гемоліз.

Екзогенний DHA, потрапляючи в еритроцит, залучається до низки окисно-відновних процесів за участю гемоглобіну і кисню, або його активних форм, в регулюванні рівня яких значну роль відіграє система глутатіону клітини. Вміст відновленого глутатіону (GSH) та його співвідношення до окисленого глутатіону (GSH/GSSG) є показником окислювального стресу. Відновлений глутатіон (GSH) служить донором протону в реакціях, що відбуваються за участю глутатіонпероксидази (GP), глутатіонтрансфераз (GST) та аскорбатредуктази.

Наявність трансмембранних електронних транспортних систем у плазматичній мембрані еритроцитів забезпечує клітину додатковим рівнем захисту від позаклітинних окислювачів. Еритроцити, як відомо, зменшують кількість позаклітинних окислювачів, таких як фериціанід, метгемоглобін, ферицитохром с, монодегідроаскорбил-радикали, за рахунок трансмембранного переносу електронів. Експорт електронів через клітинну мембрану було пов'язано з активністю трансмембранної NADH: (акцепторної) оксидоредуктази (Е.С. 1.6.99.3) [38], що транспортує електрони від цитоплазматичного NADH до позаклітинних акцепторів. Загальною рисою всіх мембраноасоційованих

оксидоредуктаз є використання внутрішньоклітинних відновлювачів, і, зрозуміло, активність цих систем тісно пов'язана з метаболічним станом еритроцитів [44].

Таким чином, якість відновлення дегідроаскорбату буде суттєво залежати від можливостей окисно-відновної ферментативної системи і стану гемоглобіну еритроцитів. Процеси, пов'язані з накопиченням дегідроаскорбату всередині клітин і зниженням градієнту концентрації останнього між плазмою крові та цитозолем еритроцитів, неминуче будуть приводити до зниження швидкості відновлення дегідроаскорбату, незворотних втрат вітаміну С і захворювань.



РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Експериментальні методи дослідження

Буферні розчини:

1. Na-фосфатний буфер (0.01 моль, pH 7.4), що містить 0.15 моль NaCl. Використовується в якості середовища для відокремлених від плазми еритроцитів;

2. 0.01 М Na-K-фосфатний буфер (pH 7.4). Використовується для лізису еритроцитів;

В експериментах використовували свіжу кров донорів, приблизно однієї вікової групи і однієї статі. Еритроцити відділяли від плазми шляхом центрифугування і тричі відмивали з Na-фосфатним буфером (0.015 М, pH 7.4) (буферний розчин 1), що містив 0.15 М NaCl. Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли методом аспірації.

Отримана паста еритроцитів вносилася в середовище того ж буферного розчину без вмісту глюкози. Вміст гемоглобіну в досліджуваних суспензіях знаходилося на рівні 3 ± 0.18 мг/мл. Подовж експерименту досліджувана система контактувала з повітрям навколишнього середовища.

Дослідження впливу середовища інкубування (Na-фосфатний буфер (0.015 М, pH 7.4), 0.15 М NaCl) на продукування гідроген пероксиду в клітинах

Еритроцити інкубували в середовищі Na-фосфатного буферу (0.015 М, pH 7.4), що містив 0.15 М NaCl, продовж 3-х годин.

Через певні проміжки часу відбирали частину суспензії. Клітини осаджували. Гемолізат еритроцитів отримували шляхом лізису клітин у 0,01 М Na-фосфатному буфері (pH 7,4) в умовах холоду протягом 10 хв. В гемолізаті клітин визначали вміст внутрішньоклітинного гідроген пероксиду.

Дослідження впливу радикалгенеруючих систем на продукування гідроген пероксиду в клітинах

Еритроцити інкубували в розчині, що містив аскорбінову кислоту (AscH) - $1,0 \cdot 10^{-4}$ М, Cu^{2+} - $5 \cdot 10^{-6}$ М, Na-фосфатний буфер (0,015 М, pH 7,4), що

містив 0,15 М NaCl (буферний розчин 1) продовж 5-ти годин. Через певні проміжки часу відбирали частину суспензії, з якої еритроцити осаджували центрифугуванням. Гідроген пероксид визначали в супернатанті і в гемолізаті клітин.

Визначення вмісту цитоплазматичного і позаклітинного H_2O_2

Робочі розчини:

1. FOX-реактив: в 1 л 25 мМ H_2SO_4 розчиняли 100 мкМ ксиленолового помаранчевого, 250 мкМ солі Мора и 100 мМ сорбіту [46].

2. Розчин H_2O_2 , 0,1878 мМ. Концентрацію вихідного розчину H_2O_2 встановлювали шляхом титрування перманганатом калію у кислому середовищі.

Вміст H_2O_2 визначали за допомогою FOX-реактиву [45]. При внесенні H_2O_2 , або середовища, що містить H_2O_2 в розчин FOX-реактиву, відбувається окислення Fe^{2+} до Fe^{3+} , комплекс якого із ксиленоловим помаранчевим має максимум поглинання при 560 нм.

Вміст H_2O_2 у клітинах визначали після лізису осаджених клітин у 0,5 мл холодної води і наступного осадження білків ТХУ [46]. Вміст H_2O_2 визначали за допомогою FOX-реактиву, що складався з 100 μ М ксиленолового помаранчевого, 250 μ М сульфат заліза-амонію (III), 100 мМ сорбітолу in 25 мМ H_2SO_4 . Метод визначення заснований на здатності H_2O_2 утворювати з FOX-реактивом забарвлений комплекс, що має максимум поглинання при 560 нм. Вміст H_2O_2 визначали з використанням калібрувальної залежності, побудованої для розчинів H_2O_2 точної концентрації. Вміст H_2O_2 у клітинах виражали в мкМ і відносили до вмісту гемоглобіну в пробі, тобто. в мкМ/г Нб.

Вміст гемоглобіну в еритроцитах визначали геміглобінціанідним уніфікованим методом за стандартним набором.

Дослідження позаклітинного і внутрішньоклітинного вмісту аскорбінової кислоти

Робочі розчини

1. 2,5% розчин $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$: розчиняли 6,66 г $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ в 250 мл дистильованої води;
2. 2,5 М розчин H_2SO_4 : розбавлення 65,78 мл H_2SO_4 в 250 мл дистильованої води;
3. Робочий розчин молібдату: розбавлення 15 мл 2,5% розчину $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ и 10 мл 2,5 М розчину H_2SO_4 ;
4. 0,25 mM розчин аскорбінової кислоти: розчинення 0,0044 г аскорбінової кислоти на 100 мл дистильованої води;
5. стандартний розчин NaH_2PO_4 (0.25 mM): розчинення 0,0075 г NaH_2PO_4 в 250 мл дистильованої води.

Кожна точка серії складалась з 0,35 мл суспензії еритроцитів (вміст гемоглобіну 23,6 мг/мл) додавали 0,25 мл CuSO_4 ($5.27 \cdot 10^{-5} \text{M}$), 0.07 мл Asc (0.0036 M), 1.83 мл буфера. Vзаг 2.5 мл. Через певні проміжки часу еритроцити відділяли центрифугуванням.

Для визначення вмісту аскорбату в надосадовій рідині до 0.7 мл рідини додавали 0.3 мл води, 1.2 мл робочого розчину молібдату амонію та 0.3 мл 0.25 mM NaH_2PO_4 . З'являється синє забарвлення розчинів внаслідок відновлення аскорбіновою кислотою фосформолібдату в молібденову синь. Оптичну густину забарвленого розчину визначали при довжині хвилі 590 нм в кюветі товщиною 1 см проти контролю. Обчислення кількості аскорбату проводили за калібрувальною кривою.

Визначення вмісту аскорбату в клітинах проводили з використанням гемолізату. Осаджені клітини відмивали буферним розчином і лізували у 0.5 мл води. Білки осаджували додаванням 0.2 мл ТХУ (45%) з наступним центрифугуванням. На аналіз відбирали 0.2 мл надосадової рідини і додавали 0,8 мл води. Кількість аскорбату у клітинах виражали у мкМ/г Нб.

2.2. Статистичні методи дослідження

Усі експерименти поведені у трьох повторностях, їх результати були проаналізовані у програмі Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Експериментальні дані представлені як $x \pm m$ (x – середнє, m – стандартна похибка). На рисунках експериментальні точки з'єднані регресійною залежністю отриманою з використанням Distance Weighted Least Squares function, $p=0.25$.

Отримані в роботі експериментальні дані, та дані, отримані раніше при дослідженні впливу середовищ того ж складу на еритроцити аналізували методами математичного статистики.

Статистичний зв'язок між парами досліджених показників оцінювали з використанням коефіцієнту рангової кореляції Спірмена (r). Коефіцієнти кореляції вважали значущими на рівні $p < 0.05$. Число точок $n=80$.

Коефіцієнт рангової кореляції r -Спірмена – це непараметричний метод, який застосовується для дослідження кореляційного взаємозв'язку між двома ранговими змінними. Коефіцієнт рангової кореляції Спірмена r_s розраховується за формулою $r_s = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{N(N^2 - 1)}$, де d_i — різниця між рангами парних значень, а N — кількість пар даних. Щоб знайти коефіцієнт, спочатку надаються ранги кожному набору даних, потім обчислюється різницю між рангами для кожної пари і підставляють у наведену формулу. Перевірку значущості коефіцієнта рангової кореляції здійснюють за допомогою t -критерія Стюдента, як і для коефіцієнта парної кореляції Пірсона.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження продукування гідроген пероксиду в еритроцитах під впливом буферного розчину і радикалгенеруючої системи

На рис. 3.1 показана зміна вмісту H_2O_2 в еритроцитах, що інкубували в середовищі Na-фосфатного буфера протягом 3-х годин. Видно, що протягом 15 хв інкубування вміст H_2O_2 падає на 20% щодо початкового рівня, а потім зростає до початкового рівня. Після 60 хв впливу внутрішньоклітинний вміст H_2O_2 поступово знижується і після 3-х годинного впливу зниження становить 60-70%.

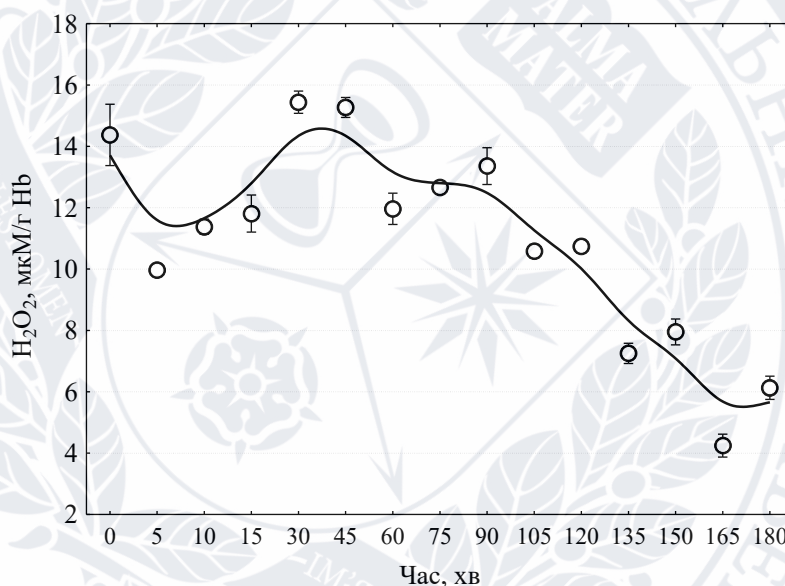


Рис. 3.1. Зміни вмісту H_2O_2 в еритроцитах при їх інкубуванні в середовищі Na-фосфатного буфера продовж 3-х годин.

Система Cu^{2+} – AscH достатньо ефективно генерує активні форми кисню (H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$) продовж тривалого проміжку часу. AscH відновлює Cu^{2+} до Cu^+ у водному середовищі з константою швидкості $3,5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ [47]. Іони одновалентного купруму можуть долучатися до реакції Габера-Вейса і Фентона [48], у якій утворюються гідроксильні радикали ($\cdot\text{OH}$). Причому необхідно відзначити, що константа швидкості продукції АФК при взаємодії іонів Cu^{2+} з H_2O_2 в реакції Фентона дуже висока $4,7\cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (для аналогічної системи з Fe^{2+}

$-76 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Далі Cu^+ окислюються до іонів Cu^{2+} , які потім знову можуть відновлюватися аскорбат іонами до Cu^+ . Монодегідроаскорбіл-радикал (МДА) та дегідроаскорбат, що утворюються, здатні окислювати Cu^+ до Cu^{2+} . Теоретично подібний цикл може продовжуватися безкінечно, однак частина дегідроаскорбінової кислоти може незворотно трансформуватися до 2,3-дикетогулонової кислоти.

У позаклітинному та внутрішньоклітинному середовищі за присутності $\text{AscH} - \text{Cu}^{2+}$, ми реєстрували наявність H_2O_2 продовж усього часу експерименту. Залежності змінення вмісту H_2O_2 у позаклітинному середовищі і всередині клітин показано на рис. 3.2, а, б.

Отримана залежність динаміки генерації внутрішньоклітинної H_2O_2 (рис. 3.2а) свідчить про те, що внутрішньоклітинний окисний стрес розвивається через 15–20 хв, після внесення еритроцитів в окисне середовище. Цей процес може бути зумовлений потоком в клітину перекису водню, що утворюється в середовищі інкубування, так як у цей час вміст H_2O_2 в позаклітинному середовищі знижується (рис. 3.2б).

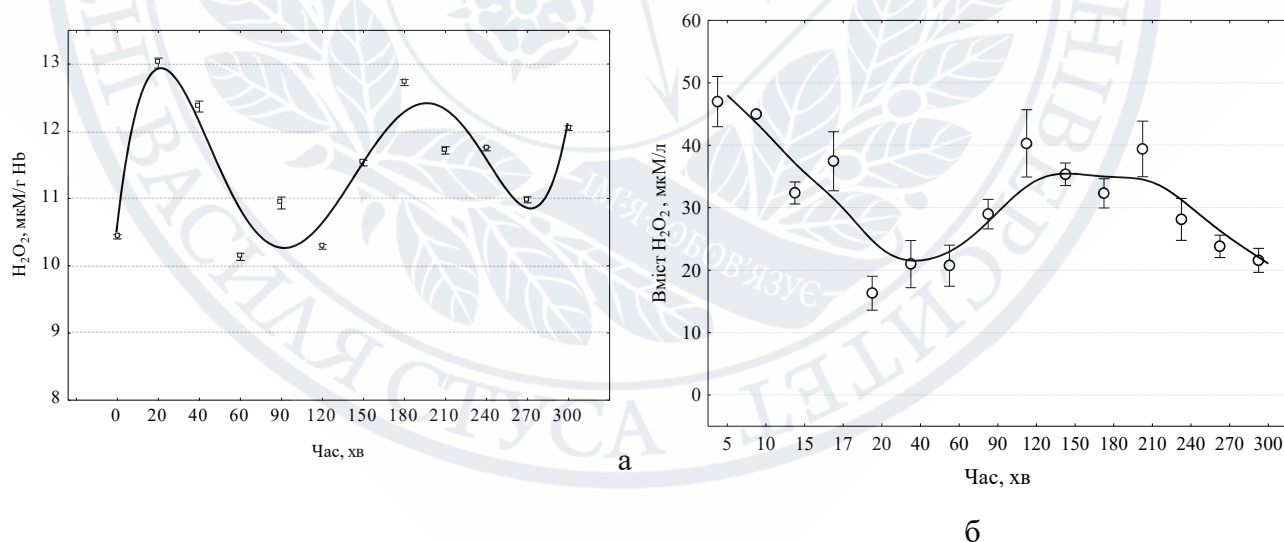


Рис. 3.2. Динаміка утворення цитоплазматичного H_2O_2 в мкМоль/л (А) і позаклітинного H_2O_2 в мкМоль/л (Б) при інкубуванні еритроцитів протягом 5-ти годин в середовищах складу $\text{Cu}^{2+} - \text{AscH}$.

Слід зазначити, що у процесах утворення H_2O_2 і її інактивації як у

позаклітинному середовищі, так і у клітині задіяно багато процесів, що ускладнює інтерпретацію утриманих залежностей.

Через 40 хв інкубування клітин вміст внутрішньоклітинного перекису водню стрімко знижується до рівня контролю (рис. 3.2а). Через 150 хв від початку експерименту в еритроцитах знову реєструється збільшення вмісту внутрішньоклітинної H_2O_2 . Вміст внутрішньоклітинного H_2O_2 , що перевищує рівень контролю в 1.15– 1.2 рази утримується в клітинах до кінця експерименту. У позаклітинному середовищі вміст перекису водню дуже високий уже на початку експерименту так як відбувається швидке накопичення H_2O_2 у реакціях за участю аскорбату і іонів Cu^{2+} . Проте, мембрана еритроцита дуже активна відносно позаклітинного перекису водню. Існують чисельні дані, що свідчать про здатність мембранозв'язаних ферментів, мембранозв'язаного гемоглобіну захищати клітини від окисного стресу [13]. Тому через 20 хв експерименту, вміст H_2O_2 знижується більше ніж у два рази. Але через дві години від початку експерименту вміст позаклітинного перекису водню знову зростає, що свідчить про виснаження захисних властивостей клітин.

3.2. Дослідження вмісту відновленої форми аскорбінової кислоти в позаклітинному і внутрішньоклітинному середовищі

На рис.3.3 показані зміни відновленої форми аскорбату в клітинах (а) і у позаклітинному середовищі (б).

У клітинах (рис.3.3а) вміст аскорбату знижується продовж 90 хв інкубування $35.1 \pm 12.2\%$. Через 2 години вміст аскорбату в клітинах відновлюється до початкового рівня і через 4 години інкубування знижується. В кінці експерименту вміст аскорбату знижується на $55.7 \pm 24.6\%$.

У позаклітинному середовищі вміст аскорбату знижується на $18.75 \pm 5.33\%$ через 30 хв інкубування і утримується на цьому рівні до кінця експерименту (рис. 3.3б).

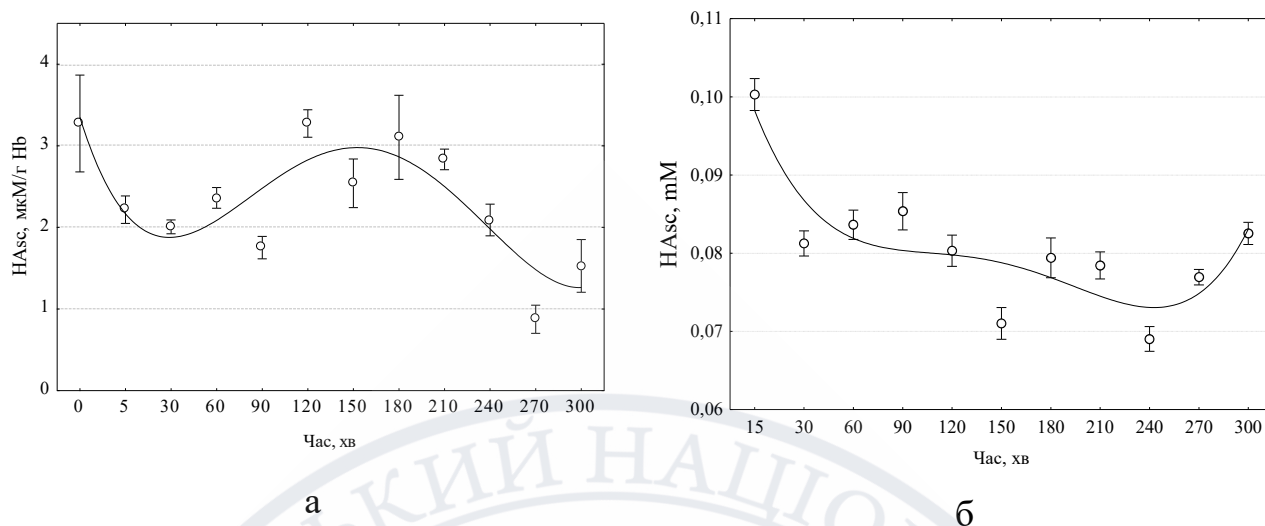


Рис. 3.3. Зміна вмісту внутрішньоклітинного аскорбату (а) і позаклітинного аскорбату (б).

3.3. Дослідження кореляційних зв'язків між компонентами метаболічної системи гідроген пероксиду в еритроцитах під впливом буферного сольового розчину

Раніше були досліджені зміни активностей ферментів супероксиддисмутази (SOD), глутатіонпероксидази (GPx), що каталізують реакції утворення і інактивації гідроген пероксиду в еритроцитах. Також було досліджено вміст лігандних форм гемоглобіну у цитоплазматичній і мембранозв'язаній фракціях гемоглобіну, зміни вмісту глутатіону і SH-груп.

Результати дослідження вмісту гідроген пероксиду в процесі інкубування клітин та показники, вказані вище, були використані для пошуку кореляційних зв'язків між отриманими експериментальними даними. Результати дослідження наведені на рис. 3.4.

кишені достатньо довго, щоб прореагувати з гемом, що зрештою призводить до деградації гему [51]. Кореляційний зв'язок між FerrylHb та H_2O_2 – $r=-0.75$, $p=0.05$.

Крім того, metHb має пероксидазні властивості, в наслідок чого реакція metHb з H_2O_2 призводить до утворення реакційноздатних радикалів ферилHb глобіну ($Hb^{*+}(Fe^{4+} = O^{2-})$), в якому формальний заряд гемового заліза дорівнює +4, а неспарений електрон розташований на ланцюзі глобіну.

H_2O_2 може реагувати з деоксигенованим гемоглобіном (Hb), оксигемоглобіном (oxyHb) і метгемоглобіном (metHb) з утворенням metHb, феррилгемоглобіну (ферилHb [HbFe(IV)=O]) і оксоферилгемоглобіну (радикаліу ферилHb глобіну [$\cdot$ HbFe(IV)=O]) відповідно [20]. Взаємодія ферилгемоглобіну з перекисом сприяє деградації гему через утворення супероксиду в гідрофобній гемовій кишені. Ця реакція формує патологічний цикл, у якому Hb циклічно змінюється між станами ферилу [Fe(III)] і ферилу [Fe(IV)], споживаючи перекис водню.

Найважливішим антиоксидантним ферментом в еритроцитах є глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (G6PD). Роль цього ферменту в метаболізмі еритроцитів надзвичайно велика, оскільки в ході реакції відбувається утворення NADPH, необхідного для підтримки функціональної активності і цілісності еритроцита. Величезна роль NADPH в еритроцитах полягає в регенерації окисленого глутатіону за участю GR. Зниження активності G6PD призводить до дефіциту NADPH і відновленого глутатіону. Показана достовірна кореляція між активністю G6PD і вмістом глутатіону ($r=0.53$, $p=0.05$).

Таким чином, внутрішньоклітинний H_2O_2 за досліджених умов є продуктом аутоокиснення гемоглобіну і може певним чином відображувати інтенсивність цього процесу за умов відсутності (чи незначної активації) псевдопероксидазної активності MetHb.

3.4. Дослідження кореляційних зв'язків між компонентами метаболічної системи гідроген пероксиду в еритроцитах під впливом радикал-генеруючої системи Cu^{2+} -Ascorbate

В цій частині роботи ми досліджуємо вплив аскорбату на стан метаболічних процесів, спрямованих на підтримку життєздатності еритроцитів. У роботах [40, 41, 44] досліджувався вплив аскорбату на стан еритроцитів, продовж значного проміжку часу, що доцільно для вирішення задач їх зберігання. Ми скорочуємо час дослідження шляхом введення незначної кількості іонів Cu^{2+} , які швидко запускають не лише процеси утворення аскорбіл-радикалів, дегідроаскорбату та його рециркуляцію, але й утворення перекису водню і активних форм кисню. Утворення H_2O_2 у позаклітинному середовищі і клітинах показано на рис. 3.2.

Для розуміння зв'язків між отриманими експериментальними даними, ми провели кореляційний аналіз між вмістом позаклітинного і внутрішньоклітинного H_2O_2 , вмістом позаклітинної і внутрішньоклітинної відновленої форми аскорбінової кислоти та показниками, дослідженими раніше. У якості цих показників використовували активності цитоплазматичних і мембранозв'язаних ферментів (SOD, каталази (Cat), мембранозв'язаної NADH: фериціанідредуктази), вмістом лігандних формам мембранозв'язаного і цитоплазматичного гемоглобіну, вмісту відновленого глутатіону і SH-груп.

Результати кореляційного аналізу наведені на рисунку 3.5.

Дані, отримані у роботі, свідчать, що окисне навантаження створює умови для зв'язування цитоплазматичних ферментів з мембраною еритроцитів.

Каталаза (CAT), глутатіонпероксидаза (GPx) та пероксиредоксин (Prx2) беруть участь у запобіганні накопичення H_2O_2 в RBC шляхом перетворення H_2O_2 у воду та O_2 . При високих концентраціях пероксиду водню головним учасником утилізації є каталаза, оскільки константа швидкості реакції вище, ніж в інших ферментів і при цьому вона не вимагає додаткових субстратів.

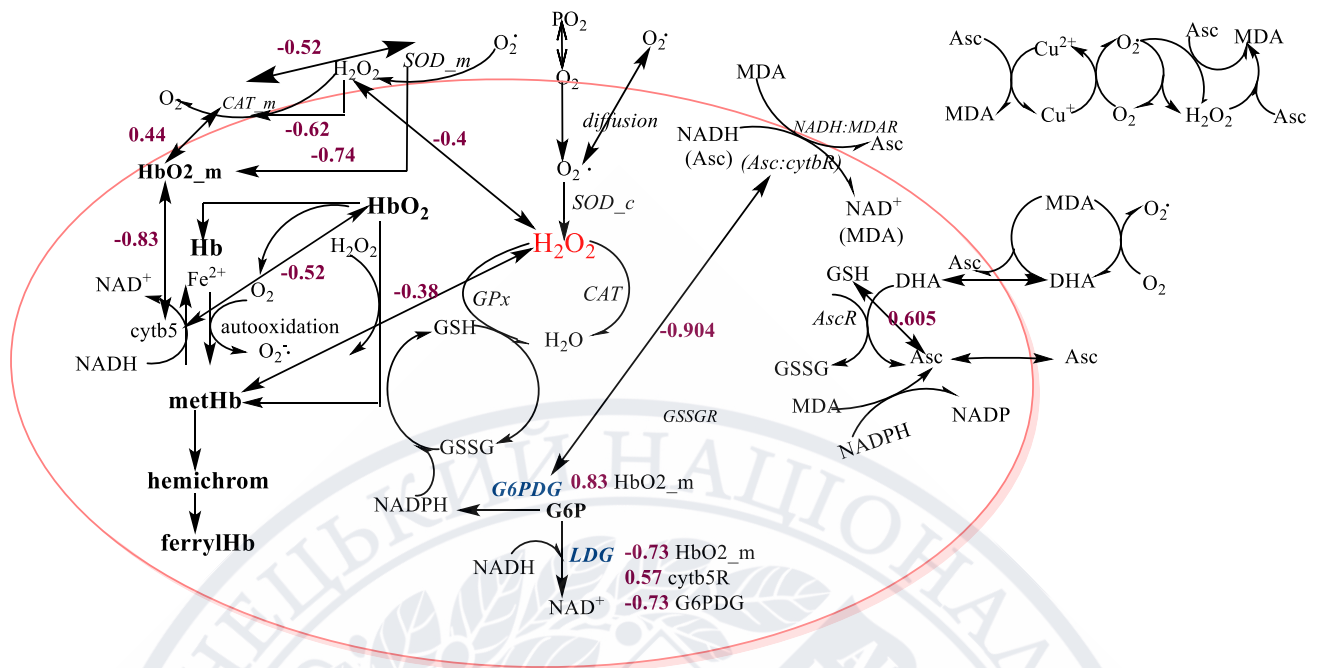


Рис. 3.5. Метаболічні реакції, залучені у процеси продукування гідроген пероксиду в еритроцитах під впливом системи Cu^{2+} -Asc. Достовірні кореляційні зв'язки ($p=0.05$) між аналізованими показниками.

Додатковим учасником утилізації є GPx, яка каталізує відновлення пероксиду водню внутрішньоклітинним глутатіоном (GSH), який також використовується для відновлення аскорбінової кислоти (Asc).

CAT, GPx і Prx2 по суті є цитозольними ферментами; однак про асоціацію цих ферментів з мембраною еритроцитів повідомлялося в різних дослідженнях *in vivo* та *in vitro* [52, 53].

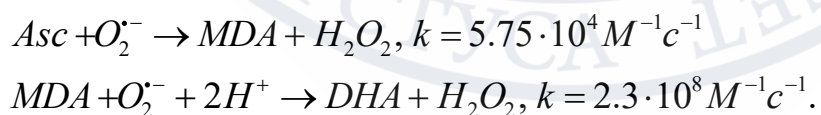
Супероксиддисмутаза (CuZnSOD, SOD1) - ще один фундаментальний антиоксидантний фермент, що є єдиною формою SOD у зрілих еритроцитах ссавців. Показано, що за умов нормоксії на долю мембранозв'язаної SOD1 припадає 0,1% від загальної маси білків мембрани. За умов гіпоксії її вміст збільшується у 1,5 рази [13].

В роботі встановлено, що активність мембранозв'язаної каталази (CAT_m) корелює з кількістю зовнішнього перекису водню (коефіцієнт кореляції -0,62, $p=0.05$) і активності CAT_m і SOD_m корелюють між собою ($r= -0,52$, $p=0.05$). Зворотна кореляція між цими ферментами характерна для стану гострого окисного

стресу. Таким чином, перехід ферментів в зв'язаний стан ініціюється окисним стресом і продукуванням H_2O_2 зовні. За фізіологічних умов мембранозв'язана каталаза здатна повністю інактивувати позаклітинний H_2O_2 , до цих процесів також залучаються глутатіонпероксидаза (GPx) та пероксиредоксин (Prx2), які також знаходяться у мембранозв'язаному стані [52, 53]. Однак ми не виключаємо надходження H_2O_2 ззовні в клітину із-за високого концентраційного градієнту, що створюється окисною системою зовні.

За умов експерименту H_2O_2 продукується зовні і вміст H_2O_2 в клітині залишається на рівні 11-12 мкМ/г Нб продовж 5-ти годин дослідження. Встановлено слабкий зворотний коефіцієнт кореляції між вмістом позаклітинного і внутрішньоклітинного H_2O_2 ($r = -0,4$). Дифузія окислювача в клітину та його утилізація обумовлює зменшення позаклітинної концентрації H_2O_2 , яка прямо пропорційна кількості клітин у суспензії, та змінненні концентрації пероксиду водню у внутрішньоклітинному середовищі. H_2O_2 , що надходить у клітини зовні, є двохелектронним окиснювачем: у реакції з ферро-гемоглобіном використовує один електрон для окиснення заліза-гему у ферил-гем ($-Fe^{IV}=O$), а інший – на окислення білка, генеруючи глобіновий тирозиловий радикал. Продукти окислення гемоглобіну мають високу реакційну спорідненість до мембранних ліпідів, наслідком чого є їх окислення.

Другий шлях збільшення внутрішньоклітинного вмісту H_2O_2 є надходження супероксид аніонів ($O_2^{\cdot-}$) в еритроцити, також внаслідок формування високого концентраційного градієнту. До його інактивації може залучатися аскорбат:



На це вказує зниження вмісту внутрішньоклітинного аскорбату продовж 60 хв інкубування клітин на фоні зростання вмісту внутрішньоклітинного H_2O_2 . Накопичення окиснених форм аскорбату вказує на додаткове окисне навантаження на клітини, так як їх відновлення витрачаються глутатіон, NADPH, NADH.

Кореляції між з внутрішньоклітинними компонентами, такими як лігандні форми гемоглобіну, тому поки складно сказати, чи є вони джерелом продукування та утилізації H_2O_2 , хоча

Раніше було показано [13], що при інкубуванні еритроцитів в середовищі Cu^{2+} -Asc вміст ОхуНб у цитоплазматичній фракції продовж 120 хв інкубування знижувався до $64,8 \pm 0,78$ %, кількість метгемоглобіну зростала до $34,6 \pm 1,8$ %. Показано [54], що при підвищених концентраціях метгемоглобіну основним шляхом його відновлення є взаємодія з цитохромом b5, який потім відновлюється NADH за участю ферменту цитохром-b5-редуктази (cytb5R). Шлях цитохрому b5–NADH стає домінуючим, коли оксидативний стрес високий, а можливості системи NADPH обмежені. Виконаний кореляційний аналіз показує кореляційний зв'язок між cytb5R і мембранозв'язаною формою оксигемоглобіну (ОхуНб) ($r = -0,82$, $p = 0,05$), з вмістом цитоплазматичного ОхуНб ($r = -0,52$, $p = 0,05$). Відновлення ферилгемоглобіну здійснюється клітинними антиоксидантами без участі ферментів. Константа швидкості реакції відновлення ферилгемоглобіну аскорбатом висока - $400 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [55]. При відновленні аскорбату утворюються радикали, які швидко дисмутують до дегідроаскорбату (DHA) у прямій реакції або за участю ферментів [44].

Основний внесок у регуляцію стану редокс-пари NAD^+/NADH вносять реакції за участю ферментів гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH) та лактатдегідрогенази (LDH). Перша реакція є однією із стадій гліколізу, вона каталізує окислення гліцеральдегід-3-фосфату з утворенням 1,3-дифосфогліцерату та виділенням NADH. Друга каталізує перетворення пірувату на лактат з виділенням NAD^+ . За фізіологічних умов дана реакція проходить у напрямку утворення лактату та NAD^+ , тим самим використовуючи електрони, що вивільняються у першій реакції. Збільшення швидкості відновлення NADH при підвищенні позаклітинної концентрації лактату (що може спостерігатися при м'язових навантаженнях, гіпоксії та низці патологічних процесів) прискорюватиме процес відновлення метгемоглобіну.

За результатами кореляційного аналізу встановлено кореляційний зв'язок між вмістом мембранозв'язаного оксигемоглобіну (OxyHb) ($r = -0,73$, $p = 0,05$), з активністю цитохром-b5-редуктази ($r = 0,57$, $p = 0,05$).

Антиоксидантні шляхи еритроцитів та їх здатність відновлювати позаклітинні антиоксиданти через трансмембранну електронну транспортну систему роблять їх ідеальним компонентом буферної антиоксидантної системи, що може сприяти загальному системному окисно-відновному гомеостазу.

В останніх дослідженнях *in vitro* та *in vivo* було показано, що екзогенний аскорбат ефективно знижує кількість феригемоглобінів, а також глобінових радикалів плазми крові. Окислені ж форми аскорбату ефективно вилучаються за участю еритроцитів. Монодегідроаскорбіл-радикали, що утворюються під час цих реакцій, можуть бути ефективно відновлені за рахунок редуктази, зв'язаної з мембраною еритроцитів [40, 42, 44]. Аскорбат еритроцитів, що є необхідним для структурної цілісності цих клітин, може бути отриманим тільки через транспорт ДНА, в той час як внутрішній аскорбат еритроцитів є необхідним для підтримки концентрації аскорбату в плазмі *in vitro/in vivo*.

Регуляція редокс-пари Asc/DNA здійснюється за участю електронів GSH ферментом дегідроаскорбатредуктазою (DHAR). В результаті цієї реакції утворюється глутатіон-дисульфід (GSSG), який відновлюється ферментом глутатіонредуктазою (GSHR) за участю електронів NADPH. Відновлення NADPH проходить у пентозофосфатному шляху за участю ферментів глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (G6PDH) та фосфоглюконатдегідрогенази (GO6PDH). В роботі встановлений достовірний кореляційний зв'язок між рівнем внутрішньоклітинного аскорбату і GSH ($r = 0,605$, $p = 0,05$), та активністю G6PDH та cytb5R ($r = -0,904$, $p = 0,05$).

Раніше [56] було показано, що еритроцити під впливом окисного середовища зазнають значного окислювального стресу. Продовж першого часу інкубування еритроцитів у середовищі AscH – Cu²⁺ активність глутатіонредуктази (GP) та глутатіон-S-трансферази (GST) досягають максимальних значень, що свідчить про наявність H₂O₂ у клітині та активізацію процесів перекисного окиснення ліпідів.

Відомо, що GST індукується токсичними електрофільними метаболітами, тому зростання активності може свідчити про накопичення останніх у клітині.. У системі $\text{AscH}-\text{Cu}^{2+}$ за участю гемоглобіну, активних форм кисню та перекису водню процеси перекисного окислення активізуються досить швидко (рис. 2, b). GP та GST для захисту еритроцитів від токсичних метаболітів використовують GSH, тому його вміст знижується. Слід зазначити, що вміст GSH може знижуватися і за рахунок процесів аутоокислення, і відновлення дегідроаскорбату, що надходить у клітину, GSH-залежною дегідроаскорбат редуктазою.

Відновлення вмісту GSH відбувається завдяки активності GR та G6PDH. Функція GR полягає у відновленні окисненої форми глутатіону (GSSG) за рахунок NADPH, що постачає G6PDH. У еритроцитах NADPH має важливе значення для захисту від окисного стресу. Основна роль NADPH полягає у підтримці вмісту відновленого глутатіону (GSH) у співвідношенні більше ніж 500:1 над окисненою формою GSSG. За даними [56], активність цих ферментів за наведених умов інкубування знижується. Зниження ж активності GR вірогідно відбувається за двома причинами: у середовищі інкубування відсутня глюкоза, наслідком чого є зниження швидкості гліколізу і потоку через пентозофосфатний шлях, у якому регенерується NADPH, по-друге, каталітична активність GR сильно залежить від стану SH-груп, які легко піддаються окислювальній модифікації. Зниження активності G6PDH очікуване, тому що до клітин не надходить глюкоза, і глюкозо-6-фосфат, що є субстратом реакції, вичерпується. Певний внесок у зниження активності ферменту можуть вносити посттрансляційні модифікації білкової молекули. Однак, зниження активності G6PDH не перевищує 29%, що вказує на включення альтернативних шляхів підтримки пулу вуглеводів. Гліцеральдегід-3-фосфат, що утворюється у пентозофосфатному шляху (PPP), може повертатися у гліколітичний шлях і перетворюватися на глюкозо-6-фосфат у трьох послідовних зворотних реакціях, що каталізуються альдолазою, фосфофруктокіназою та фосфоглюкоїзомеразою. Дослідження підтвердили метаболічне перепрограмування в еритроцитах внаслідок зниження активності гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH) за окислення функціональних залишків ферменту під дією H_2O_2 . У окисних умовах GAPDH

сприяє утворенню гліколітичного вузького місця, наслідком чого є спрямування метаболічного потоку у пентозофосфатний шлях.

Проведені раніше дослідження [56] показало різке підвищення вмісту GSH через 90 хв від початку експерименту, що не може пояснюватися підвищенням активності GR, яка контролює процес відновлення окисленої форми глутатіону за рахунок NADPH. Це відбуватися шляхом деглутатіонілювання протеїнів, тобто виділення GSH із змішаних дисульфідів, утворених з редокс-чутливим залишками Cys білків (PS-SG). Процеси деглутатіонілювання ініціюються змінами внутрішньоклітинного окисно-відновного статусу (зміни співвідношення GSH/GSSG, окиснення гемоглобіну) і реалізуються за участю глутарадоксину (Grx), GR, тіоредоксин/ тіоредоксинуредуктази (Trx/TrxR) та / або сульфїредоксину (Srx). Інший шлях - деглутатіонілювання Hb, опосередковане головним чином конформаційними змінами, індукованими зв'язуванням гемоглобіну з CO (Metere et al., 2014). CO є одним з продуктів деградації гему під дією АФК. Ці продукти деградації можуть ініціювати окислювальні процеси в еритроцитах, але при низьких концентраціях вони мають цитопротективні властивості. Зв'язуючись з мембраною, COHb активізує пентозо-фосфатний шлях, що сприяє додатковому утворенню GSH. Відомо [57], що GAPDH і, ймовірно, інші гліколітичні ферменти (фосфофруктокіназа, альдолаза, піруваткіназа та лактатдегідрогеназа), не вивільняються в їх активованій формі в цитоплазму з білка полоси 3. Запобігання надходження потоку в гліколітичний шлях, і обертання потоку на рівні гліцеральдегід-3-фосфату у пентозофосфатний шлях, дозволяє підтримувати NADPH в еритроцитах за відсутності глюкози. Дослідження [58, 59] підтвердили метаболічне перепрограмування у еритроцитах, але основна роль у цих процесах була відведена GAPDH, яка може знижувати свою активність за рахунок окислення функціональних залишків Cys. Зниження активності GAPDH, можливо, є першим кроком, що сприяє стабілізації рівня NADPH і глутатіону за умов достатньої стійкості клітин до окисного навантаження. Зокрема, окислювальна модифікація сульфгідрильних груп у білках є двобічним процесом, який може привести до погіршення білкової функції або, залежно від окисно-відновного стану цистеїнових

залишків, може активувати специфічні шляхи регулювання основних функцій клітин.

Зміни активності мембранозв'язаної NADH:фериціанідредуктази цілком співпадають зі зробленим нами аналізом перерозподілу метаболічних потоків і точкою зору інших авторів. Зниження активності ферменту узгоджуються з даними по накопиченню АФК в позаклітинному і внутрішньоклітинному середовищі. Ця редуктаза для відновлення позаклітинного акцептора електронів використовує внутрішньоклітинний NADH, який утворюється тільки в реакції, що каталізується гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназою. Падіння активності цього ферменту, що обговорювалося вище, приводить до зниження вмісту NADH і, як наслідок, втрати активності NADH: фериціанідредуктази. Відновлення потоку через гліколітичний шлях буде сприяти підвищенню активності NADH: фериціанідредуктази, що і спостерігаємо в експерименті. Поступове відновлення активності мембранозв'язаної NADH: фериціанідредуктази співпадає з різким підвищенням GSH в еритроцитах. Автори, що досліджували GAPDH [58, 59], відмічали зворотність окислення SH-груп і можливість підвищення активності цього ферменту. Збільшення активності GAPDH дає змогу повернути потік у гліколітичний шлях, наростити вміст NADH, АТР и лактату, але це приведе до зниження вмісту NADPH і глутатіону. Можливо має місце коливальний процес, напрямок якого визначається співвідношенням з одного боку NADPH/NADP, GSH/GSSG, а з іншого - NADH/NAD, АТР/(АДР+АМР). Тригером, що перемикає потік є мембранозв'язаний гемоглобін – карбоксигемоглобін (в умовах гіпоксії та окисного навантаження)/дезоксигемоглобін.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що при інкубуванні еритроцитів в середовищі Na-фосфатного буфера, внутрішньоклітинний H_2O_2 є продуктом аутоокиснення гемоглобіну і може певним чином відображувати інтенсивність цього процесу за умов відсутності (чи незначної активації) псевдопероксидазної активності MetHb.

2. При інкубуванні еритроцитів в середовищі Cu^{2+} -Asc, підвищення вмісту внутрішньоклітинного H_2O_2 обумовлено дифузією позаклітинного H_2O_2 і супероксид аніонів ($\text{O}_2^{\cdot-}$), внаслідок формування високого концентраційного градієнту останніх. Залучення аскорбату до інактивації $\text{O}_2^{\cdot-}$ створює додаткове окисне навантаження на клітини внаслідок утворення H_2O_2 та окислених форм (моно)аскорбілового радикалу та дегідроаскорбінової кислоти.

3. Характер зміни аскорбату в середовищі інкубування і в клітинах свідчить про наявність гострого окисного стресу. В кінці експерименту вміст аскорбату в клітинах знижується на $55.7 \pm 24.6\%$, а у позаклітинному середовищі - на $18.75 \pm 5.33\%$.

4. Виконаний кореляційний аналіз дозволив встановити внесок різних учасників метаболічних процесів еритроцитів в регуляцію вмісту гідроген пероксиду у клітинах. Співвідношення мембранних комплексів різних окислених форм гемоглобіну, мабуть, визначає гормезову залежність відповіді еритроцитів на дію пероксиду водню: регуляторне при низьких концентраціях і пошкоджує при високих.

5. Отримані дані дозволяють розширити уявлення про механізми захисту еритроцитів, побудувати прогнози про захисні властивості клітин при окислювальному стресі.

ЖИТЕПАТҮПА

1. Johnson, R. M., Goyette, G., Jr, Ravindranath, Y., & Ho, Y. S. (2005). Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free radical biology & medicine*, 39(11), 1407–1417.
2. Low, F. M., Hampton, M. B., Peskin, A. V., & Winterbourn, C. C. (2007). Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. *Blood*, 109(6), 2611–2617.
3. Johnson, R. M., Ho, Y. S., Yu, D. Y., Kuypers, F. A., Ravindranath, Y., & Goyette, G. W. (2010). The effects of disruption of genes for peroxiredoxin-2, glutathione peroxidase-1, and catalase on erythrocyte oxidative metabolism. *Free radical biology & medicine*, 48(4), 519–525.
4. Cho, C. S., Lee, S., Lee, G. T., Woo, H. A., Choi, E. J., & Rhee, S. G. (2010). Irreversible inactivation of glutathione peroxidase 1 and reversible inactivation of peroxiredoxin II by H₂O₂ in red blood cells. *Antioxidants & redox signaling*, 12(11), 1235–1246.
5. Han, Y. H., Kim, S. U., Kwon, T. H., Lee, D. S., Ha, H. L., Park, D. S., Woo, E. J., Lee, S. H., Kim, J. M., Chae, H. B., Lee, S. Y., Kim, B. Y., Yoon, D. Y., Rhee, S. G., Fibach, E., & Yu, D. Y. (2012). Peroxiredoxin II is essential for preventing hemolytic anemia from oxidative stress through maintaining hemoglobin stability. *Biochemical and biophysical research communications*, 426(3), 427–432.
6. S.B. Bayer, G. Maghzal, R. Stocker, M.B. Hampton, C.C. Winterbourn. Neutrophil-mediated oxidation of erythrocyte peroxiredoxin 2 as a potential marker of oxidative stress in inflammation *FASEB J.*, 27 (2013), pp. 3315-3322.
7. F. Antunes, A. Salvador, R.E. Pinto PHGPx and phospholipase A2/GPx: comparative importance on the reduction of hydroperoxides in rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, 19 (1995), pp. 669-677
8. Benfeitas R, Selvaggio G, Antunes F, Coelho PM, Salvador A. Hydrogen peroxide metabolism and sensing in human erythrocytes: a validated kinetic model and reappraisal of the role of peroxiredoxin II. *Free Radic Biol Med.* 2014 Sep;74:35-49.

9. Nakamura F. Mechanotransduction in blood cells. *Blood & genomics*, 2017, 1(1): 1-9.
10. Liu, X., & Nakamura, F. (2020). Mechanotransduction, nanotechnology, and nanomedicine. *Journal of biomedical research*, 35(4), 284–293.
11. Alayash, A.I. (2022). Oxidation reactions of cellular and acellular hemoglobins: Implications for human health. *Frontiers in medical technology*, 4, 1068972.
12. Cortese-Krott, M. M. (2023). The reactive species interactome in red blood cells: oxidants, antioxidants, and molecular targets. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(9), 1736.
13. Dotsenko, O. I., Mykutska, I. V., Taradina, G. V., & Boiarska, Z. O. (2020). Potential role of cytoplasmic protein binding to erythrocyte membrane in counteracting oxidative and metabolic stress. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 11(3), 455–462.
14. Anastasiadi, A.T., Arvaniti, V.Z., Hudson, K.E., Kriebardis, A.G., Stathopoulos, C., D'Alessandro, A., Spitalnik, S.L., & Tzounakas, V.L. (2024). Exploring unconventional attributes of red blood cells and their potential applications in biomedicine. *Protein & cell*, 15(5), 315–330.
15. Spolitak, T., Hollenberg, P. F., & Ballou, D. P. (2016). Oxidative hemoglobin reactions: Applications to drug metabolism. *Archives of biochemistry and biophysics*, 600, 33–46.
16. Rifkind, J. M., Mohanty, J. G., Nagababu, E., Salgado, M. T., & Cao, Z. (2018). Potential modulation of vascular function by nitric oxide and reactive oxygen species released from erythrocytes. *Frontiers in physiology*, 9, 690.
17. Orrico, F., Laurance, S., Lopez, A.C., Lefevre, S.D., Thomson, L.; Möller, M.N., & Ostuni, M.A. (2023). Oxidative stress in healthy and pathological red blood cells. *Biomolecules*. 13, 1262.
18. Orrico F., Möller M.N., Cassina A., Denicola A., & Thomson L. Kinetic and stoichiometric constraints determine the pathway of H₂O₂ consumption by red blood cells. (2018). *Free Radic Biol Med*. 121, 231-239.

19. Mahdi, A., Cortese-Krott, M. M., Kelm, M., Li, N., & Pernow, J. (2021). Novel perspectives on redox signaling in red blood cells and platelets in cardiovascular disease. *Free radical biology & medicine*, 168, 95–109.
20. Welbourn, E. M., Wilson, M. T., Yusof, A., Metodiev, M. V., & Cooper, C. E. (2017). The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Free radical biology & medicine*, 103, 95–106.
21. Barshtein, G., Livshits, L., Gural, A., Arbell, D., Barkan, R., Pajic-Lijakovic, I., & Yedgar, S. (2024). Hemoglobin Binding to the Red Blood Cell (RBC) Membrane Is Associated with Decreased Cell Deformability. *International journal of molecular sciences*, 25(11), 5814.
22. Kanas, T., & Acker, J. P. (2010). Biopreservation of red blood cells-the struggle with hemoglobin oxidation. *The FEBS journal*, 277(2), 343–356.
23. Bossi D & Giardina B (1996) Chapter 1: red cell physiology. *Mol Aspects Med* 17, 117–128.
24. Mal, A., & Chatterjee, I.B. (1991). Mechanism of autoxidation of oxyhaemoglobin. *Journal of Biosciences*. 16, 55–70.
25. Nagababu E & Rifkind JM (2000) Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation. *Biochemistry (Mosc)* 39, 12503–12511.
26. Sztiller M, Puchala M, Kowalczyk A & Bartosz G (2006) The influence of ferrylhemoglobin and methemoglobin on the human erythrocyte membrane. *Redox Rep* 11, 263–271.
27. Sugawara Y, Kadono E, Suzuki A, Yukuta Y, Shibasaki Y, Nishimura N, Kameyama Y, Hirota M, Ishida C, Higuchi N et al. (2003) Hemichrome formation observed in human haemoglobin A under various buffer conditions. *Acta Physiol Scand* 179, 49–59.
28. Dotsenko, O., & Taradina, G. (2024). Peroxide-induced oxidative stress in erythrocytes under the action of low-frequency vibration. *Studia Biologica*, 18(4), 3–20.

29. Daraghmeh, D. N., & Karaman, R. (2025). The Redox Process in Red Blood Cells: Balancing Oxidants and Antioxidants. *Antioxidants*, 14(1), 36.
30. Zitka, O.; Skalickova, S.; Gumulec, J.; Masarik, M.; Adam, V.; Hubalek, J.; Trnkova, L.; Kruseova, J.; Eckschlager, T.; Kizek, R. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol. Lett.* 2012, 4, 1247–1253.
31. Su, D.; May, J.M.; Koury, M.J.; Asard, H. Human erythrocyte membranes contain a cytochrome b561 that may be involved in extracellular ascorbate recycling. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 39852–39859.
32. Faut, M.; Paiz, A.; de Viale, L.C.S.M.; Mazzetti, M.B. Alterations of the redox state, pentose pathway and glutathione metabolism in an acute porphyria model. Their impact on heme pathway. *Exp. Biol. Med.* 2013, 238, 133–143.
33. Issaian, A.; Hay, A.; Dzieciatkowska, M.; Roberti, D.; Perrotta, S.; Darula, Z.; Redzic, J.; Busch, M.P.; Page, G.P.; Rogers, S.C.; et al. The interactome of the N-terminus of band 3 regulates red blood cell metabolism and storage quality. *Haematologica* 2021, 106, 2971–2985.
34. Darragh, L.B.; Knitz, M.M.; Hu, J.; Clambey, E.T.; Backus, J.; Dumit, A.; Samedi, V.; Bubak, A.; Greene, C.; Waxweiler, T.; et al. A phase I/Ib trial and biological correlate analysis of neoadjuvant SBRT with single-dose durvalumab in HPV-unrelated locally advanced HNSCC. *Nat. Cancer* 2022, 3, 1300–1317.
35. Karakus, Y.Y. *Typical Catalases: Function and Structure*; IntechOpen: London, UK, 2020.
36. Ulrich, K., & Jakob, U. (2019). The role of thiols in antioxidant systems. *Free radical biology & medicine*, 140, 14–27.
37. Zhu, M., Dagah, O. M. A., Silaa, B. B., & Lu, J. (2023). Thioredoxin/Glutaredoxin Systems and Gut Microbiota in NAFLD: Interplay, Mechanism, and Therapeutical Potential. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(9), 1680.
38. May J. M. (1998). Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 3, d1–d10.

39. Witmer, J. R., Wetherell, B. J., Wagner, B. A., Du, J., Cullen, J. J., & Buettner, G. R. Direct spectrophotometric measurement of supra-physiological levels of ascorbate in plasma. (2016). *Redox Biology*, 8, 298-304.
40. Tu, H., Wang, Y., Li, H., Brinster, L. R., & Levine, M. (2017). Chemical transport knockout for oxidized vitamin C, dehydroascorbic acid, reveals its functions in vivo. *EBioMedicine*, 23, 125-135.
41. Soumya, R., & Vani, R. (2017). Vitamin C as a modulator of oxidative stress in erythrocytes of stored blood *Acta Haematologica Polonica*, 48(4), 350-356.
42. Padayatty, S. J., & Levine, M. (2016). Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Diseases*, 22(6), 463-93.
43. Carelli-Alinovi, C., & Misiti, F. (2017). Erythrocytes as potential link between diabetes and Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 25(9), 276–286.
44. May, J. M., Qu, Z. C., & Cobb, C. E. (2004). Human erythrocyte recycling of ascorbic acid: relative contributions from the ascorbate free radical and dehydroascorbic acid. *The Journal of biological chemistry*, 279(15), 14975–14982.
45. Mendiratta, S., Qu, Z., & May, J. M. (1998). Erythrocyte defenses against hydrogen peroxide: the role of ascorbic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1380(3), 389-95.
46. Ou, P., & Wolff, S. P. (1994). Erythrocyte catalase inactivation (H_2O_2 production) by ascorbic acid and glucose in the presence of aminotriazole: role of transition metals and relevance to diabetes. *The Biochemical journal*, 303 (Pt 3), 935–939.
47. Xu, J., & Jordan, R. B. (1990). Kinetics and mechanism of the reaction of aqueous copper (II) with ascorbic acid. *Inorganic Chemistry*, 29(16), 2933–2936.
48. Scarpa, M. (1996). Ascorbate Oxidation Catalyzed by Bis(histidine) copper (II). *Inorganic Chemistry*, 35 (18), 5201–5206.
49. Meng, F., & Alayash, A. I. (2017). Determination of extinction coefficients of human hemoglobin in various redox states. *Analytical biochemistry*, 521, 11–19.
50. Nyakundi, B. B., Erdei, J., Tóth, A., Balogh, E., Nagy, A., Nagy, B., Jr, Novák, L., Bognár, L., Paragh, G., Kappelmayer, J., & Jeney, V. (2020). Formation and

Detection of Highly Oxidized Hemoglobin Forms in Biological Fluids during Hemolytic Conditions. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 8929020.

51. Rifkind, J. M., & Nagababu, E. (2013). Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxidants & redox signaling*, 18(17), 2274–2283.

52. Rocha, S., Rocha-Pereira, P., Cleto, E., Ferreira, F., Belo, L., & Santos-Silva, A. (2019). Linkage of typically cytosolic peroxidases to erythrocyte membrane – A possible mechanism of protection in Hereditary Spherocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(3), 183172.

53. Melo, D., Rocha, S., Coimbra, S., & Santos Silva, A. (2019). Interplay between Erythrocyte Peroxidases and Membrane. In A. Tombak, (Ed.). *Erythrocyte*. IntechOpen, London, UK.

54. Kinoshita, A., Nakayama, Y., Kitayama, T., & Tomita, M. (2007). Simulation study of methemoglobin reduction in erythrocytes. Differential contributions of two pathways to tolerance to oxidative stress. *The FEBS journal*, 274(6), 1449–1458.

55. Gebicka, L., & Banasiak, E. (2009). Flavonoids as reductants of ferryl hemoglobin. *Acta biochimica Polonica*, 56(3), 509–513.

56. 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.

57. Metere, A., Iorio, E., Scorza, G., Camerini, S., Casella, M., Crescenzi, M., Minetti, M., & Pietraforte, D. (2014). Carbon monoxide signaling in human red blood cells: evidence for pentose phosphate pathway activation and protein deglutathionylation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 403–416.

58. Reisz, J. A., Wither, M. J., Dzieciatkowska, M., Nemkov, T., Issaian, A., Yoshida, T., Dunham, A. J., Hill, R. C., Hansen, K. C., & D'Alessandro, A. (2016). Oxidative modifications of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase regulate metabolic reprogramming of stored red blood cells. *Blood*, 128(12), 32-42.

59. Rinalducci, S., Marrocco, C., & Zolla, L. (2015) Thiol-based regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in blood bank-stored red blood cells: a strategy to counteract oxidative stress. *Transfusion*. 55(3), 499-506.