

УДК [576.314:591.111.2]:612.111–597.556.31

МЕМБРАНОСВЯЗАННАЯ ФЕРРИ-ФОРМА ГЕМОГЛОБИНА В ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТАХ МОРСКОГО ЕРША (*SCORPAENA PORCUS*, LINNAEUS, 1758)

© 2024 г. А. А. Солдатов^{1,2,*}, Н. Е. Шалагина¹, В. Н. Рычкова¹, Т. А. Кухарева¹

Представлено академиком РАН Н.Н. Немовой

Поступило 15.02.2024 г.

После доработки 10.03.2024 г.

Принято к публикации 14.03.2024 г.

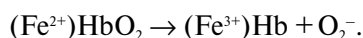
В условиях *in vitro* исследовали содержание мембраносвязанной фракции метгемоглобина (MtHb) в ядерных эритроцитах морского ерша (*Scorpaena porcus*, Linnaeus, 1758). Изучали спектральные характеристики цельного гемолизата, гемолизата после осаждения стромы (очищенный гемолизат) и ресуспензированной стромы. Установлено, что доля MtHb в строме эритроцитов превышала 80% (6.20 ± 0.59 мкМ). Очищенные гемолизаты практически не содержали MtHb (0.5 ± 0.2 мкМ). Присутствие мембраносвязанной ферри-формы не влияло на устойчивость эритроцитов к осмотическому шоку. Пределы осмотической стойкости ($102\text{--}136$ мОсм кг^{-1}), определенные при помощи лазерного анализатора микрочастиц LaSca-TM (BioMedSystems, Россия), совпадали с отмеченными для других видов костистых рыб. Нитритная нагрузка (10 мг л^{-1}) вызывала значительный рост содержания MtHb в крови. Однако уровень мембраносвязанной ферри-формы при этом существенно не изменялся и составлял 6.34 ± 1.09 мкМ (около 95%). Это свидетельствует о функциональной целесообразности ее присутствия в данной структуре. Наличие MtHb в цитоплазматической мембране ядерных эритроцитов, по-видимому, позволяет клеткам нейтрализовать внешнюю окислительную нагрузку и токсическое действие сероводорода в придонных слоях воды, в которых обитает морской ерш.

Ключевые слова: клеточная мембрана, эритроциты, метгемоглобин, осмотический шок, нитриты, морской ерш

DOI: 10.31857/S2686738924030065, EDN: VUBDLE

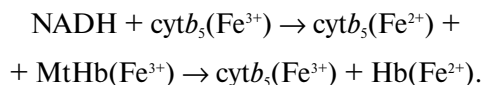
ВВЕДЕНИЕ

В сравнении с высшими позвоночными гемоглобины рыб отличаются низкой устойчивостью к окислению [1]. В процессе деоксигенации часть пигмента может переходить в ферри-состояние, сопровождающееся окислением железа гема:



Данное соединение неспособно связывать кислород и получило название метгемоглобина (MtHb). Ядерные эритроциты рыб располагают весьма эффективным молекулярным комплексом, действие которого направлено на поддержание гемоглобина в восстановленном состоянии. К нему следует от-

нести NADH₂-зависимую MtHb-редуктазу, которая переносит электрон с NADH на цитохром *b*₅, а затем на MtHb:



Сравнительная оценка показала, что у рыб этот процесс протекает более эффективно, чем у высших позвоночных [2]. В подавлении процессов самоокисления гемоглобина принимает участие и антиоксидантный ферментный комплекс. Активность ряда ферментов (пероксидазы, супероксиддисмутазы) и концентрация восстановителей (GSH) у рыб превышает таковую у человека [3]. Вместе с тем, устойчивость гемоглобинов рыб к окислению оказывается существенно ниже. Уровень MtHb в крови в норме может превышать 10% [4]. Причина этого до конца не понятна.

Окисленные формы гемоглобина легко встраиваются в мембранные структуры эритроцита [5, 6].

¹ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского Российской академии наук», Севастополь, Россия

²Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Считается, что в незначительных количествах они способствуют стабилизации клеточного цитоскелета [5]. Осмотические характеристики и процессы перекисного окисления липидов мембранных структур клетки при этом сохраняются в пределах функциональной нормы [6]. Связанный гемоглобин находится в комплексе, содержащем спектрин, анкирин и полосу 4.2, которые являются общими для одного из узлов цитоскелета. При этом он проявляет окислительно-восстановительную активность и способен связываться с лигандами [5]. Доля мембраносвязанного гемоглобина может находиться в пределах 0.5–12%, что сопоставимо с относительным содержанием MtHb в крови большинства костистых рыб. Это позволяет предположить наличие ассоциации MtHb с мембранными структурами эритроцита у рыб. Проверке данного предположения и посвящена настоящая работа.

Цель исследования — определить долю мембраносвязанного метгемоглобина в эритроцитах морского ерша в норме и условиях окислительных нагрузок (эксперименты *in vitro*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали взрослых особей морского ерша (*Scorpaena porcus*, Linnaeus, 1758) обоих полов (длина тела 12–14 см, вес 90–114 г) в состоянии относительного функционального покоя (стадия зрелости гонад II–III). Рыбу перевозили в аквариальную в пластиковых баках емкостью 60 л с воздушной аэрацией. После транспортировки животных рассаживали в аквариумы, имеющие естественный проток и освещение, и выдерживали в данных условиях в течение 5–7 суток. В работе использовали подвижных, активно питающихся особей. Контроль за температурой и концентрацией кислорода в воде осуществляли при помощи кислородомера ST300D RU (“Ohaus”, США). Перед отбором проб крови, чтобы исключить развитие состояния манипуляционного стресса, в воде аквариума в качестве анестетика растворяли уретан. Эффективные концентрации его для морского ерша были определены ранее [7].

Отбор проб и пробоподготовка

Кровь получали пункцией хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (Рихтер, Венгрия). Плазму отделяли путем центрифугирования: рефрижераторная центрифуга Eppendorf Centrifuge 5424 R при 845 g. Эритроцитарную массу трижды отмывали от плазмы в среде: 128 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 15 mM трис, 2.2 mM D-глюкозы (pH 7.8) [8] при 845 g в течение 5 мин. Ее использовали при проведении экспериментов *in vitro*.

Экспериментальные схемы

Работа была выполнена в 2 этапа. В начале (опыт 1) часть отмытой эритроцитарной массы (1/2 объема) лизировали при помощи фосфатного буфера (0.02 mM, pH 7.3), прописывали спектры для цельного гемолизата. Стромой осаждали при 9400 g в течение 2 минут (очищенный гемолизат). Для надосадочной жидкости повторно прописывали спектры. Стромой трижды отмывали в фосфатном буфере, ресуспендировали и прописывали спектры.

Часть (1/2 объема) полученной ранее эритроцитарной массы преинкубировали в среде [8], содержащей 10 мг л⁻¹ нитрита натрия, в течение 30 минут (опыт 2). Затем клетки осаждали и лизировали при помощи фосфатного буфера (0.02 mM, pH 7.3). Прописывали спектры для цельного и очищенного гемолизата, а также для ресуспендированной стромы, как описано выше.

Спектральный анализ растворов и взвесей

Спектры с полученных гемолизатов и взвесей стромы снимали при помощи двухлучевого спектрофотометра СПЕКС ССП-715 (ЗАО “Спектроскопические системы”, Россия). Расчет относительного содержания охуHb (HbO₂), деохуHb (Hb) и MtHb проводили по уравнениям [9], рассчитанным для pH 7.3:

$$[\text{HbO}_2] = (1.013 A_{576} - 0.3269 A_{630} - 0.7353 A_{560}) \times 10^{-4}$$

$$[\text{Hb}] = (1.373 A_{560} - 0.747 A_{576} - 0.737 A_{630}) \times 10^{-4}$$

$$[\text{MtHb}] = (2.985 A_{630} + 0.194 A_{576} - 0.4023 A_{560}) \times 10^{-4}$$

Осмотическая стойкость эритроцитов

Осмотическую резистентность клеток красной крови оценивали при помощи метода лазерной дифракции. Для количественного описания осмотической хрупкости эритроцитов морского ерша использовались точки 10% (H₁₀), 50% (H₅₀) и 90% гемолиза (H₉₀), отражающие осмолярность среды, при которой наблюдается лизис 10%, 50% и 90% клеток в образце. В работе использовали лазерный анализатор микрочастиц LaSca-TM (BioMedSystems, Россия). В обработке полученной информации было задействовано оригинальное программное обеспечение LaSca_32 v.1498. Величина осмолярности растворов контролировалась при помощи криоосмометра OsmoSpecial 1 (Италия).

Статистический анализ

При проведении сравнительного анализа применен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) PAST Version 4.09 software. Статистические сравнения проводились на основе непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Графически

цифровой материал обработан с использованием стандартного пакета Grapher (версия 11). Результаты представлены как $M \pm m$. Минимальный уровень значимости составлял $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образцы спектров представлены на рис. 1. У цельных и очищенных гемолізатов они были подобны (рис. 1а, 1б). Отличие состояло лишь в том, что значения экстинкции при 630 нм у первых были несколько выше. Расчеты показали, что содержание МтНб у цельных гемолізатов находилось на уровне 8.23 ± 0.65 мкМ (рис. 2). Центрифугирование образцов при 9400 g снижало эту величину почти в 15 раз ($p < 0.001$).

Уровень МтНб в очищенных гемолізатах составлял 0.5 ± 0.2 мкМ. Спектральный анализ ресуспензированной стромы эритроцитов показал, что она более чем на 80% (6.20 ± 0.59 мкМ) была представлена ферри-формой (рис. 1в, 2). Уровень охуНб и деохуНб был невелик: 1.09 ± 0.08 и 0.16 ± 0.04 мкМ соответственно.

Преинкубирование эритроцитарной взвеси в среде [8], содержащей 10 мг л^{-1} нитрита натрия, значительно увеличивало долю ферри-формы. В спектрах явно повышалась величина экстинкции при 630 нм (рис. 1а, 1б). Содержание МтНб в цельных и очищенных гемолізатах находилось на уровне 45.9 ± 5.09 и 35.9 ± 1.5 мкМ соответственно (рис. 3). Разница составляла около 22% ($p < 0.01$). Анализ спектральных характеристик ресуспензированной стромы показал, что она почти на 95% (6.34 ± 1.09 мкМ) была представ-

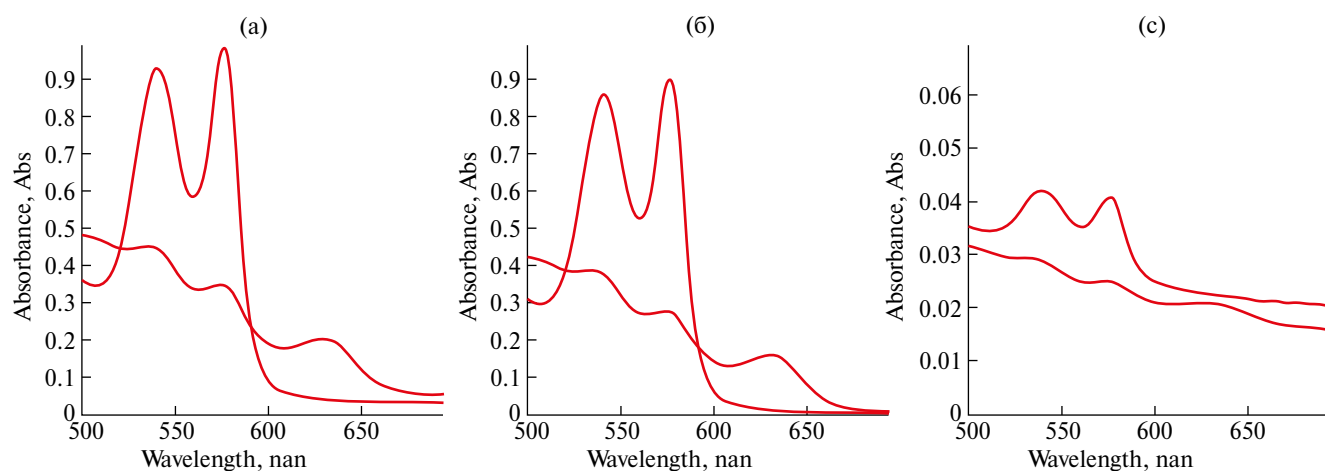


Рис. 1. Образцы спектров цельных гемолізатов (а), гемолізатов без стромы (б) и ресуспензированной стромы (в) (1 – без нитрита, 2 – с нитритом).

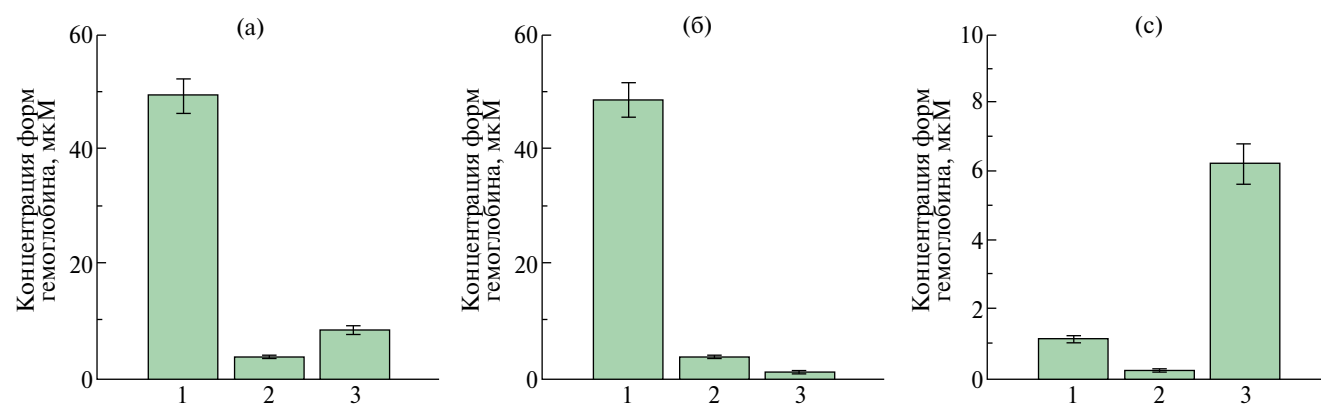


Рис. 2. Концентрация отдельных форм гемоглобина в цельных гемолізатах (а), гемолізатах без стромы (б) и ресуспензированной стромы (в) (1 – охуНб, 2 – деохуНб, 3 – МтНб).

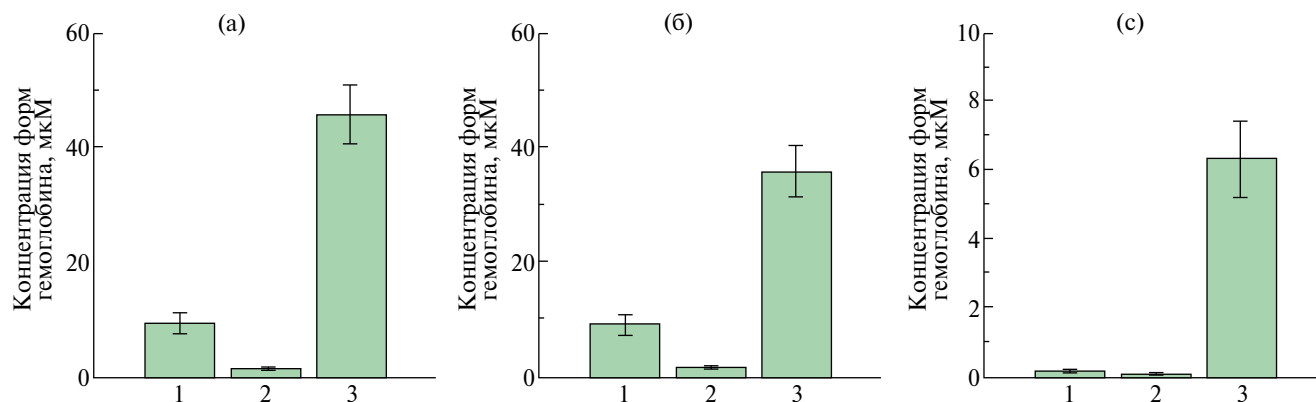


Рис. 3. Концентрация отдельных форм гемоглобина в цельных гемолизатах (а), гемолизатах без стромы (б) и ресуспензированной стромы (в) в условиях нитритной нагрузки (1 – охуНб, 2 – деохуНб, 3 – МтНб).

лена ферри-формой (рис. 1в, 2). Суммарная фракция охуНб и деохуНб не превышала 6% ($0.30 \pm 0.07 \text{ мкМ}$). Как видно, доля мембраносвязанной ферри-формы гемоглобина осталась практически без изменений: $6.20 \pm 0.59 \text{ мкМ}$ (без нитрита) и $6.34 \pm 1.09 \text{ мкМ}$ (с нитритом) ($p > 0.05$).

Присутствие в мембране эритроцитов МтНб допускает их низкую стойкость к осмотическому шоку. Использование метода лазерной дифракции позволило определить границы толерантности клеток красной крови морского ерша к данному фактору (рис. 4). Начало лизиса (H_{10}) отмечали при $135.5 \pm .4 \text{ мОсм кг}^{-1}$. Основная масса клеток (H_{50}) разрушалась при $117.7 \pm 3.9 \text{ мОсм кг}^{-1}$. Завершение лизиса (H_{90}) происходило при $102.4 \pm 4.1 \text{ мОсм кг}^{-1}$. Эти результаты соответствуют диапазону толерантности эритроцитов к осмотическому шоку большинства костистых рыб.

Мембраносвязанным формам гемоглобина посвящено сравнительно большое число работ, выполненных в основном на высших позвоночных, – [10–12] и др. Приоритет отдается деохуНб. Отмечается его способность к взаимодействию с анионтранспортным белком полосы 3 (CDB3), а также спектрином и гликофоринном [11]. В основе взаимодействия могут лежать гидрофобные, дисульфидные, электростатические связи [13]. Они могут быть временными и необратимыми [13]. Необратимое взаимодействие характеризуется образованием ковалентных связей, что свойственно в основном окисленным формам гемоглобина (феррил- и оксоферрилгемоглобин, гемихромы, МтНб) [14]. Они индуцируют свободнорадикальное окисление, что сказывается на функциональных характеристиках клеток красной крови: снижение осмотической стойкости [12]. В нашем случае в ресуспензированной строме эритроцитов явно преобладала фракция МтНб. Однако это не вли-

яло на устойчивость эритроцитов к осмотическому шоку. Диапазон лизиса совпадал с нормальными величинами, показанными для других видов костистых рыб [6]. Это позволяет предположить наличие функциональной целесообразности присутствия ферри-формы гемоглобина в цитоплазматических мембранах клеток красной крови.

О функциональной значимости взаимодействия гемоглобина с мембраной эритроцита однозначного мнения нет. Допускается, что оно направлено на стабилизацию липидного бислоя [5]. Определенное значение это может иметь при адаптации к условиям гипоксии. Взаимодействие деохуНб с CDB3 высвобождает ферменты гликолиза с сайта связывания с CDB3 и переводит их в активное состояние. В клетке усиливаются анаэробные процессы [10].

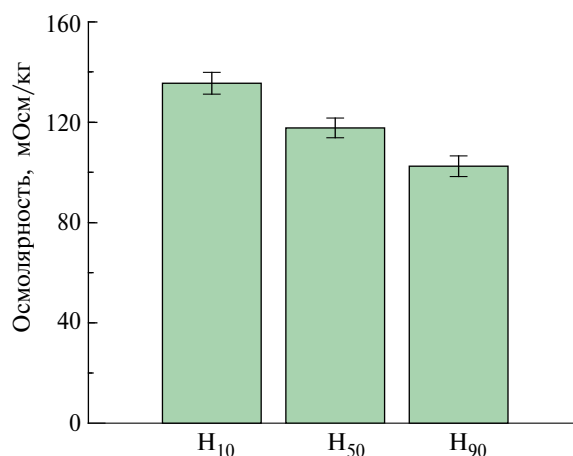


Рис. 4. Осмотическая резистентность циркулирующей эритроцитарной массы у морского ерша (H_{10} – лизис 10% клеток, H_{50} – лизис 50% клеток, H_{90} – лизис 90% клеток).

Показана также способность мембраносвязанного гемоглобина к восстановлению нитрит-ионов и генерации NO, который участвует в регуляции тонуса гладкомышечной стенки сосудов [15]. Эти результаты, однако, не следует экстраполировать на материалы, представленные в настоящей работе, так как речь идет о мембраносвязанном MtHb.

Известно, что эритроциты рыб вступают в прямое взаимодействие с факторами водной среды на уровне респираторных поверхностей. Придонные слои воды, в которых обитает морской ерш, обладают определенной токсичностью. Здесь активно протекают окислительные процессы, возможно локальное образование сероводорода. В этой связи способность клеток красной крови к нейтрализации подобной нагрузки приобретает особое значение. Присутствие в мембране MtHb позволяет перехватывать электроны и нейтрализовать тем самым действие окислителей. Следует принять во внимание, что в отличие от безъядерных эритроцитов высших позвоночных NADH-MtHb-редуктаза у них локализуется именно в цитоплазматической мембране [16]. Такая локализация делает эту систему восстановления MtHb недоступной для действия высокоэффективного антиоксидантного ферментного комплекса ядерного эритроцита [3], что позволяет поддерживать относительно высокий уровень MtHb в клетке.

Особо следует остановиться на токсическом действии сероводорода (H_2S), который может присутствовать в придонных слоях воды. Данное соединение ингибирует активность цитохром-с-оксидазы дыхательной цепи митохондрий [17], переводит гемосодержащие белки в сульф-форму [18], подавляет экспрессию транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией (hypoxic inducible factor, HIF) [19]. Без нейтрализации H_2S существование организмов в данных условиях оказывается невозможным. Недавно в экспериментах *in vitro* показана способность MtHb связывать H_2S , что не позволяет ему проникать в клетку [20]. Можно предположить, что эта функция для мембраносвязанного MtHb может быть одной из ведущих.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 23-24-00061.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с использованием рыбы были выполнены в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ (2010/63/EU) и одобрены комиссией по биоэтике ФИЦ ИнБЮМ по уходу и использованию животных (протокол № 4/23 от 26.10.2023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Maestre R., Pazos M., Medina I.* Involvement of Methemoglobin (MetHb) Formation and Hemin Loss in the Pro-oxidant Activity of Fish Hemoglobins // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. № 15. P. 7013–7021.
2. *Jensen F.B., Nielsen K.* Methemoglobin Reductase Activity in Intact Fish Red Blood Cells // *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. & Integ. Physiol.* 2018. V. 216. P. 14–19.
3. *Woo S.P.S., Liu W., Au D.W.T., et al.* Antioxidant Responses and Lipid Peroxidation in Gills and Erythrocytes of Fish (*Rhabdosargus Sarba*) upon Exposure to *Chattonella Marina* and Hydrogen Peroxide: Implications on the Cause of Fish Kills // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2006. V. 336. P. 230–241.
4. *Hardig J., Hoglund L. B.* Seasonal and Ontogenetic Effects on Methaemoglobin and Reduced Glutathione Contents in the Blood of Reared Baltic Salmon // *Comp. Biochem. Physiol.* 1983. V. 76A. № 1. P. 27–34.
5. *Welbourn E.M., Wilson M.T., Yusof A., et al.* The Mechanism of Formation, Structure and Physiological Relevance of Covalent Hemoglobin Attachment to the Erythrocyte Membrane // *Free Rad. Biol. Med.* 2017. V. 103. P. 95–106.
6. *Sztiller M., Puchala M., Kowalczyk A., et al.* The Influence of Ferrylhemoglobin and Methemoglobin on the Human Erythrocyte Membrane // *Red. Rep.* 2006. V. 11. № 6. P. 263–271.
7. *Soldatov A.A.* Physiological Aspects of Effects of Urethane Anesthesia on the Organism of Marine Fishes // *Hydrobiol. J.* 2005. V. 41. № 1. P. 113–126.
8. *Tiihonen K., Nikinmaa M.* Short Communication Substrate Utilization by Carp (*Cyprinus Carpio*) Erythrocytes // *J. Exp. Biol.* 1991. V. 161. № 1. P. 509–514.
9. *Benesch R.E., Benesch R., Yung S.* Equations for the Spectrophotometric Analysis of Hemoglobin Mixtures // *Anal. Biochem.* 1973. V. 55. P. 245–248.
10. *Chu H., Breite A., Ciraolo P., et al.* Characterization of the Deoxyhemoglobin Binding Site on Human Erythrocyte Band 3: Implications for O_2 Regulation of Erythrocyte Properties // *Blood.* 2008. V. 111. P. 932–938.
11. *Sega M.F., Chu H., Christian J., et al.* Interaction of Deoxyhemoglobin with the Cytoplasmic Domain of Murine Erythrocyte Band 3 // *Biochem.* 2012. V. 51. P. 3264–3272.
12. *Rifkind J.M., Nagababu E.* Hemoglobin Redox Reactions and Red Blood Cell Aging // *Antioxidants & Redox Signaling.* 2013. V. 18. P. 2274–2283.
13. *Demehin A.A., Abugo O.O., Jayakumar J.R., et al.* Binding of Hemoglobin to Red Cell Membranes with Eosin-5-Maleimide-Labeled Band 3: Analysis of Centrifugation and Fluorescence Data // *Biochem.* 2002. V. 41. P. 8630–8637.
14. *Nagababu E., Mohanty J.G., Bhamidipaty S., et al.* Role of Membrane in the Formation of Heme Degradation Products in Red Blood Cells // *Life Sci.* 2010. V. 86. P. 133–138.
15. *Salhany J.M.* Kinetics of Reaction of Nitrite with Deoxy Hemoglobin after Rapid Deoxygenation or Predeoxygenation by Dithionite Measured in Solution and Bound to the Cytoplasmic Domain of Band 3 (SLC4A1) // *Biochemistry.* 2008. V. 47. P. 6059–6072.
16. *Saleh M.C., McConkey S.* NADH-dependent Cytochrome b5 Reductase and NADPH Methemoglobin Reductase Activity in the Erythrocytes of *Oncorhynchus Mykiss* // *Fish Physiol. Biochem.* 2012. V. 38. P. 1807–1813.

17. Cooper C.E., Brown G.C. The Inhibition of Mitochondrial Cytochrome Oxidase by the Gases Carbon Monoxide, Nitric Oxide, Hydrogen Cyanide and Hydrogen Sulfide: Chemical Mechanism and Physiological Significance // J. Bioenerg. Biomembr. 2008. V. 40. P. 533–539.
18. Bagarinao T. Sulfide as an Environmental Factor and Toxicant: Tolerance and Adaptations in Aquatic Organisms // Aquat. Toxicol. 1992. V. 24. P. 21–62.
19. Wu B., Teng H., Yang G. Hydrogen Sulfide Inhibits the Translational Expression of Hypoxia-inducible Factor-1 α // Br. J. Pharmacol. 2012. V. 167. P. 1492–1505.
20. Jensen B., Fago A. A Novel Possible Role for Met Hemoglobin as Carrier of Hydrogen Sulfide in the Blood // Antioxidants & Redox Signaling. 2020. V. 32. № 4. P. 258–265.

MEMBRANE-BOUND FERRIFORM HEMOGLOBIN IN NUCLEAR ERYTHROCYTES OF THE SEA RUFF (*SCORPAENA PORCUS*, LINNAEUS, 1758)

A. A. Soldatov^{a,b,#}, N. E. Shalagina^a, V. N. Rychkova^a, T. A. Kukhareva^a

^aA. O. Kovalevsky Institute of Biology of the South Seas of the Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russian Federation

^bSevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

[#]e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Presented by Academician of the RAS N.N. Nemova

The content of the membrane-bound methemoglobin fraction (MtHb) in the nuclear erythrocytes of the sea ruff (*Scorpaena porcus*, Linnaeus, 1758) was studied *in vitro*. The spectral characteristics of whole hemolysate, hemolysate after stroma deposition (purified hemolysate), and resuspended stroma were studied. It was found that the proportion of MtHb in the stroma of erythrocytes exceeded 80% ($6.20 \pm 0.59 \mu\text{M}$). The purified hemolysates practically did not contain MtHb ($0.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$). The presence of a membrane-bound ferriform did not affect the resistance of erythrocytes to osmotic shock. The osmotic resistance limits determined using the LaSca-TM microparticle laser analyzer (BioMedSystems, Russia) ($102\text{--}136 \text{ mOsm kg}^{-1}$) coincided with those noted for other bony fish species. The nitrite load (10 mg l^{-1}) caused a significant increase in the MtHb content in the blood. However, the level of the membrane-bound ferriform did not change significantly and amounted to $6.34 \pm 1.09 \mu\text{M}$ (about 95%). This indicates the functional expediency of its presence in this structure. The presence of MtHb in the cytoplasmic membrane of nuclear erythrocytes, apparently, allows cells to neutralize the external oxidative load and the toxic effect of hydrogen sulfide in the bottom layers of water in which the sea ruff lives.

Keywords: cell membrane, erythrocytes, methemoglobin, osmotic shock, nitrites, sea ruff