

**МЕТГЕМОГЛОБИН, АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ
И СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТАХ
Scorpaena porcus (Linnaeus, 1758) В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ГИПОКСИИ (*in vitro*)**

© 2020 г. А.А. Солдатов*, **, А.Ю. Андреева*, ***, Т.А. Кухарева*, Т.И. Андреевко*, **

*Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН,
299011, Севастополь, просп. Нахимова, 2

E-mail: alekssoldatov@yandex.ru

**Севастопольский государственный университет, 299053, Севастополь, Университетская ул., 33

***Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44

Поступила в редакцию 15.07.2019 г.

После доработки 15.07.2019 г.

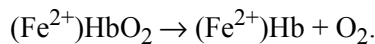
Принята к публикации 22.03.2020 г.

Изучено влияние гипоксии на ядерные эритроциты морского ерша (*Scorpaena porcus*) в условиях *in vitro*. Глубокая гипоксия (концентрация кислорода менее 1 мг O₂ л⁻¹, норма – 7–8 мг O₂ л⁻¹) приводит к переходу части гемоглобина в ферри-форму (метгемоглобин). Максимальное увеличение концентрации метгемоглобина составляет 32%. Накопление метгемоглобина в эритроцитах сопровождается повышением активности каталазы, супероксиддисмутазы и снижением содержания активных форм кислорода в цитоплазме клеток. Показано, что образование метгемоглобина не вызывает повреждений цитоплазматических мембран эритроцитов. Процент лизиса клеток красной крови в дезоксигенированных суспензиях (менее 1,0 мг O₂ л⁻¹) количественно совпадает с контрольными величинами.

Ключевые слова: гипоксия, эксперименты *in vitro*, ядерные эритроциты, метгемоглобин, каталаза, супероксиддисмутаза.

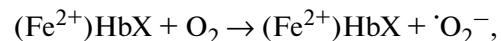
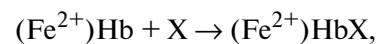
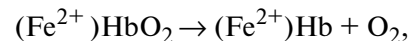
DOI: 10.31857/S0006302920030138

Эритроциты – узкоспециализированные клетки, адаптированные к транспорту газов, прежде всего кислорода. Основу их сухого остатка составляет гемоглобин (Hb). В норме процесс деоксигенации оксигемоглобина (HbO₂) сопровождается отрывом кислорода с сохранением железа в геме в двухвалентном состоянии (ферро-форма) [1]:



Однако в ряде случаев это сопровождается образованием супероксиданиона (O₂⁻) и приводит к окислению железа – гем переходит в ферри-состояние [1]. Это соединение именуется метгемоглобином (MtHb) и кислород не связывает. Чаше всего это связано с процессом автоокисления ге-

моглобина или следствием токсической нагрузки (нитрит, анилин, нитробензол и др.) [1]. Процесс автоокисления протекает медленно и в основном затрагивает дезокси-форму гемоглобина, что приводит к образованию супероксиданиона. В нем можно выделить следующие этапы [2]:

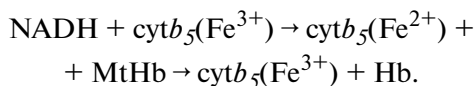


где X – нуклеофил (соединение, образующее связь с Hb по донорно-акцепторному механизму).

Окислению гемоглобина препятствует антиоксидантный молекулярный комплекс эритроцита – глутатион, аскорбиновая кислота, токоферол [3]. Однако скорость реакции MtHb с этими соединениями незначительна. Существует специфический ферментативный механизм восстановления MtHb. Ключевая роль в нем принадлежит NADH-диафореазе, которая переносит элек-

Сокращения: Hb – гемоглобин, HbO₂ – оксигемоглобин, MtHb – метгемоглобин, NADH – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный), CAT – каталаза, SOD – супероксиддисмутаза, АФК – активные формы кислорода.

трон с NADH на цитохром b_5 , а затем на MtHb [4]:



Это приводит практически к 100%-му восстановлению окисленного пигмента. В норме концентрация его в крови человека не превышает 1%.

Ядерные эритроциты рыб имеют тот же, что и эритроциты высших позвоночных, антиоксидантный комплекс [5, 6]. В них выявлена NADH-диафороза [7, 8]. Активность некоторых ферментов (пероксидазы, супероксиддисмутазы) и концентрация восстановителей (глутатиона) превышает таковую у человека [9, 10]. Вместе с тем устойчивость респираторных пигментов рыб к окислению существенно ниже. Уровень MtHb в крови в норме может превышать 10% [11, 12].

Особый интерес представляют случаи спонтанного роста MtHb без видимых случаев токсической метгемоглобинемии. К ним можно отнести процессы адаптации рыб к условиям гипертермии (30–40°C) [2, 13] и гипоксии [14, 15]. В случае с гипоксией эта реакция достаточно парадоксальна, так как она наблюдается при более низком уровне окислительной нагрузки на клетки красной крови. Она отмечена не только у рыб: *Colossoma macropomum* [14], *Megalobrama amblycephala* [15], но и у высших позвоночных [16], включая человека [17]. Показано, что частично деоксигенированный гемоглобин легче подвергается окислению и переходит в мет-форму [18].

Гипоксия вызывает у рыб также еще ряд неоднозначных реакций: рост активности каталазы (CAT) и супероксиддисмутазы (SOD), что допускает дисмутацию $\cdot\text{O}_2^-$. Это отмечается на уровне различных соматических тканей, включая эритроциты крови [19–21]. Поскольку большинство гидробионтов лишь перманентно сталкиваются с условиями внешней гипоксии, предложено рассматривать факт роста активности CAT и SOD, как подготовку к последующей реоксигенации [20]. Можно также допустить наличие связи между ростом содержания MtHb в крови и увеличением активности CAT и SOD, так как повышение содержания ферри-формы в крови может сопровождаться освобождением $\cdot\text{O}_2^-$.

Представленная выше информация получена в основном в условиях *in situ* или экспериментов *in vivo*. Это допускает изучение не только влияния гипоксии, но и ряда других факторов, комбинацию которых иногда трудно учесть. В настоящей работе мы исследуем влияние экспериментальной гипоксии в условиях *in vitro* — на клеточных взвесах. При этом акцент делается на количественном учете уровня MtHb в крови, активности CAT и SOD в эритроцитах, а также ряде функци-

ональных характеристик клеток красной крови (проточная цитометрия).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал. В работе использовали взрослых особей морского ерша (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758) в состоянии относительного физиологического покоя (III–IV стадия зрелости гонад): длина тела — 14–17 см, масса тела — 85–115 г. Рыбу отлавливали при помощи ставного невода и доставляли в лабораторию в пластиковых баках объемом 60 л с принудительной аэрацией. Транспортировка длилась не более трех часов. Концентрация кислорода в воде в момент отлова рыбы составляла 7–8 мг л⁻¹.

После отлова особей рассаживали в аквариумы с естественным протоком. В данных условиях рыбу выдерживали в течение одной недели для снятия состояния стресса, вызванного отловом и транспортировкой. Особей кормили фаршем из малоценных видов рыб. Суточный пищевой рацион составлял 6–7% от массы тела. В работе использовали только подвижные активно питающиеся экземпляры. Перед отбором проб крови рыб анестезировали, применяя уретан, который растворяли в воде аквариума [22]. Данное соединение оказывает мягкое действие на организм рыб, не вызывая заметных изменений дыхательной и сердечной ритмики.

Эксперименты *in vitro*. Кровь для проведения экспериментов *in vitro* получали у особей скорпены из хвостовой артерии путем отсечения хвостового стебля. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (Richter, Венгрия). Концентрация гемоглобина в полученных образцах находилась в пределах 54–61 г · л⁻¹, а величина гематокрита изменялась в диапазоне 24–28%. Концентрацию гемоглобина определяли при помощи гемиглобинцианидного метода, используя стандартный набор реактивов (ООО «Агат-мед», Россия). Величину гематокрита определяли центрифугированием образцов крови (800 g, 15 мин) в специальном гематокритном роторе (центрифуга MPW-310, Польша). Применяли специальные капилляры, стенки которых предварительно были обработаны гепарином.

Клетки осаждали центрифугированием (800 g, 15 мин, центрифуга СМ-50, Elmi, Латвия). Плазму и поверхностный слой клеток (фракция лейкоцитов) удаляли. Эритроциты отмывали трижды от плазмы в среде следующего состава: 128 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 1,5 мМ CaCl₂, 1,5 мМ MgCl₂, 15 мМ трис, 2,2 мМ D-глюкозы (рН 7.8) [23].

Полученную эритроцитарную массу ресуспендировали в среде аналогичного состава, но с разной концентрацией кислорода. Исследовали диа-

пазон 0–5 мг $O_2 \times л^{-1}$. Кислород из инкубационной среды удаляли при барботаже газообразным азотом. Контроль за концентрацией кислорода осуществляли при помощи оксиметра ELWRO N 5123 (Польша). Продолжительность инкубации клеток составила 4 ч. В работе применяли вакуумные пробирки VacuetteTM объемом 6.0 мл.

После проведения экспериментов эритроциты осаждали центрифугированием (800 g, 15 мин, центрифуга СМ-50). Часть клеток использовали для проточной цитометрии. Остальные лизировали охлажденным бидистиллятом с соответствующей концентрацией кислорода. Соотношение объемов воды и эритроцитарной массы подбирали исходя из значений гематокрита. Концентрация гемоглобина в гемолизатах составляла 45–52 г · л⁻¹. Гемолизаты использовали при спектральном анализе и определении активности СОД и КАТ.

Спектральный анализ растворов гемоглобина. Гемолизаты взвешивали в 0.35 М фосфатном буфере, рН 7.3. Спектры полученных растворов гемоглобина снимали при помощи двухлучевого спектрофотометра Lambda 35 (PerkinElmer, США). Расчет относительного содержания окси-(HbO₂), дезокси- (Hb) и мет-форм (MtHb) гемоглобина проводили по следующим уравнениям [24]:

$$[HbO_2] = (1.013 A_{576} - 0.3269 A_{630} - 0.7353 A_{560}) \cdot 10^{-4},$$

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

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

Активности супероксиддисмутазы и каталазы. Активность SOD (КФ 1.15.1.1) определяли по степени ингибирования восстановления нитросинего тетразолия в присутствии НАДН₂ и феназинметасульфата. Активность САТ (КФ 1.11.1.6) измеряли по реакции H₂O₂ с молибдатом аммония и образованию желтоокрашенного комплекса. Состав инкубационных сред и особенности лабораторного регламента показаны ранее в работе [25].

Проточная цитометрия. Эритроциты после эксперимента ресуспендировали в инкубационной среде следующего состава: 128 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 1.5 мМ CaCl₂, 1.5 мМ MgCl₂, 15 мМ трис, 2.2 мМ D-глюкозы (рН 7.8) [23]. Плотность клеток составляла 10⁶ кл. · мл⁻¹. Для оценки суммарного содержания в эритроцитах активных форм кислорода (перекисей) использовали флуорохром дихлорофлуоресцеин. Краситель растворяли в диметилсульфоксиде и хранили при –20°С. Финальная концентрация красителя в про-

бе составляла 1 мг · мл⁻¹. Окрашивание суспензии клеток проводили в течение 30 мин в темноте.

Для анализа смертности клеток суспензию эритроцитов плотностью 10⁶ кл. × мл⁻¹ окрашивали двумя красителями: SYBR Green I (максимум флуоресценции 533 нм) и йодид пропидия (максимум флуоресценции 617 нм). SYBR Green I является прижизненным ДНК-красителем, окрашивающим и живые и мертвые клетки; йодид пропидия – маркер повреждений мембран клеток. Финальная концентрация красителей в пробе составляла 10 мкг · мл⁻¹ для SYBR Green I и 2 мкг · мл⁻¹ для йодида пропидия. Окрашивание проводили в течение 40 мин в темноте при комнатной температуре.

Анализ флуоресценции проводили на проточном цитометре FC500 (Beckman Coulter, США). Флуоресценцию дихлорофлуоресцеина и SYBR Green I регистрировали в канале FL1 (зеленая область спектра), йодида пропидия – в канале FL3 (красная область спектра). Анализ получаемых данных вели в программе Flowing software 5.1.

Статистическая обработка. Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов проведены с применением стандартного пакета Grapher (версия 7). Результаты представлены в виде $M \pm SE$. Достоверность различий оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента. О нормальности распределения судили по критерию Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гемоглобин. Анализ спектров поглощения гемолизатов скорпены позволил оценить функциональное состояние гемоглобина данного вида при различных кислородных режимах инкубационной среды. Понижение концентрации кислорода с 7–8 до 2–3 мг · л⁻¹ не вызывало заметных изменений положения максимумов и величин экстинкций относительно контрольных значений (рис. 1а). При более низких концентрациях кислорода (0.2–2.0 мг · л⁻¹) отмечали заметное увеличение значений экстинкции при 560 и 630 нм, что отражало рост содержания в растворе дезокси- и ферри-формы гемоглобина соответственно (рис. 1б).

На основании представленных выше спектров поглощения были рассчитаны величины содержания MtHb в гемолизатах (рис. 2а). Как видно, при понижении концентрации кислорода уровень данного соединения относительно контрольных значений равномерно повышался. Максимальные значения были зарегистрированы при концентрации O₂ менее 1 мг · л⁻¹. У отдельных особей уровень ферри-формы повышался до

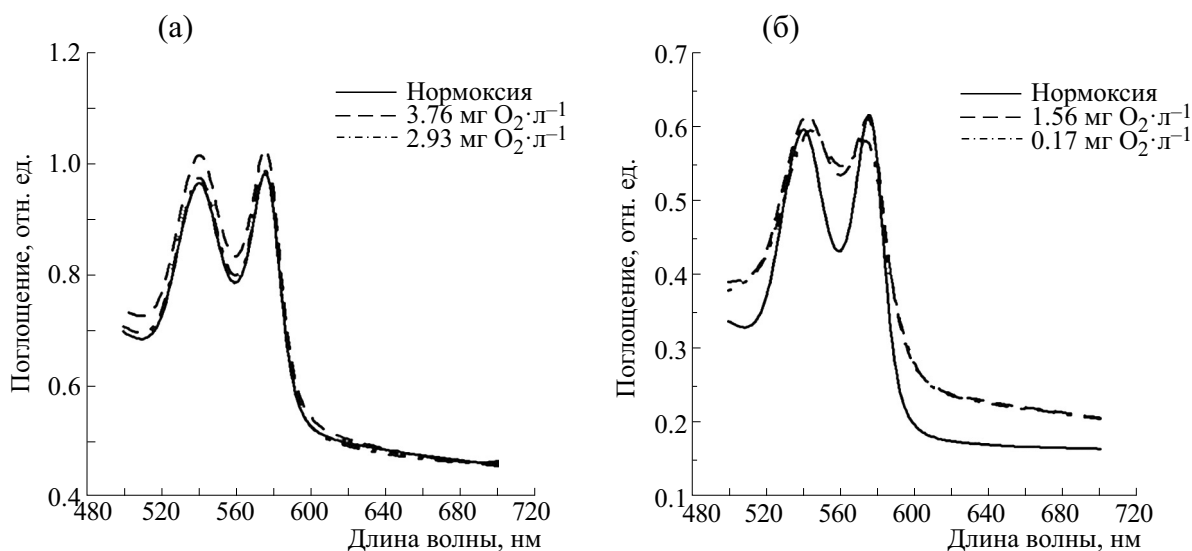


Рис. 1. Спектры поглощения гемолизатов в зависимости от содержания кислорода: (а) – нормоксия и гипоксия до $2.5 \text{ мг O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$; (б) – нормоксия и гипоксия после $2.5 \text{ мг O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$.

32%. Ранжирование полученных значений на три группы: более $2 \text{ мг O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$, $1\text{--}2 \text{ мг O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ и менее $1 \text{ мг O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$, позволило рассчитать средние величины и провести статистическое сравнение между ними (рис. 2б). Различия достигали 4–16 раз ($p < 0.01$).

Антиоксидантный ферментный комплекс. Рост содержания MtHb в условиях экстремально низких концентраций кислорода был сопряжен с увеличением активности CAT и SOD (рис. 3). Коэффициент детерминации (R^2) между активностью данных ферментов превышал 0.8 (рис. 4). Это означает, что они работали в связке, т.е. в

эритроцитах усиливалась реакция дисмутации, направленная на нейтрализацию $\cdot\text{O}_2^-$.

Достаточно высокий уровень корреляции обнаружен и между уровнем MtHb, с одной стороны, и активностью SOD и CAT – с другой (рис. 4). В первом случае значения R^2 составили 0.738, а во втором – 0.967. Это свидетельствует о том, что рост активности указанных ферментов в значительной степени был связан с продукцией $\cdot\text{O}_2^-$, который образуется при переходе гемоглобина в ферри-форму. Эффективность этого процесса можно оценить по содержанию активных форм кислорода в эритроцитах и, прежде всего, уровню

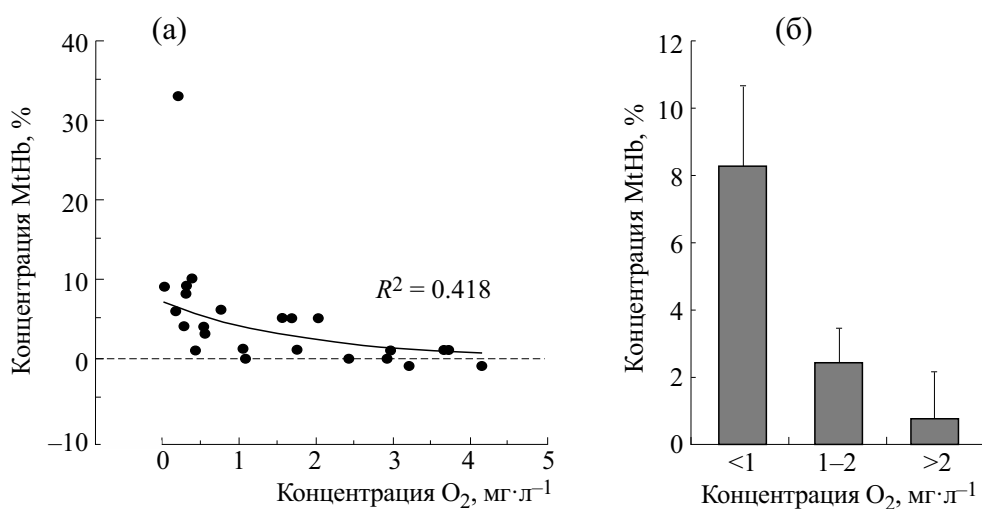


Рис. 2. Влияние гипоксии на концентрацию MtHb в гемолизатах: (а) – полигон распределения, (б) – после ранжирования.

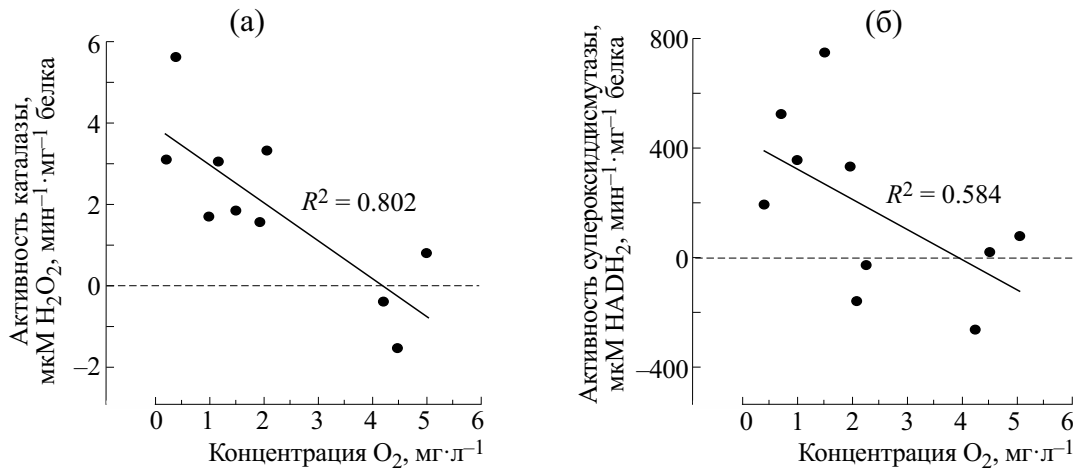


Рис. 3. Активность каталазы (а) и супероксиддисмутазы (б) в ядерных эритроцитах в условиях гипоксии.

гидроперекиси в клетках. Для этих целей мы применяли дихлорофлуоресцеин. Из рис. 5 следует, что снижение концентрации кислорода в инкубационной среде не сопровождалось ростом H_2O_2 , напротив, уровень данного соединения существенно понижался.

Эритроциты. Оценка состояния эритроцитов во взвесах проводили путем подсчета соотношения живых и мертвых клеток. Для этих целей применяли двойное окрашивание суспензии флуорохромами SYBR Green I и йодидом пропидия. Первый является прижизненным маркером ДНК окрашивающим и живые и мертвые клетки, а второй только имеющие повреждение мембран. Результаты представлены на рис. 6. Как видно, гипоксия не вызывала заметного снижения числа живых клеток в суспензии. В условиях нормоксии их доля составляла $94.0 \pm 5.7\%$, а при

гипоксии (менее $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) – $88.6 \pm 4.5\%$. Различия не были статистически выражены.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из представленных выше результатов следует обратить внимание на следующие моменты:

- при концентрациях кислорода в инкубационной среде менее $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ значительно повышалась доля MtHb, что коррелировало с ростом активности SOD и CAT и не сопровождалось увеличением уровня активных форм кислорода в эритроцитах;

- при экстремальных формах гипоксии сохранялась целостность цитоплазматических мембран эритроцитов; соотношение живых и мертвых клеток в суспензии оставалось на уровне контрольных значений (нормоксия).

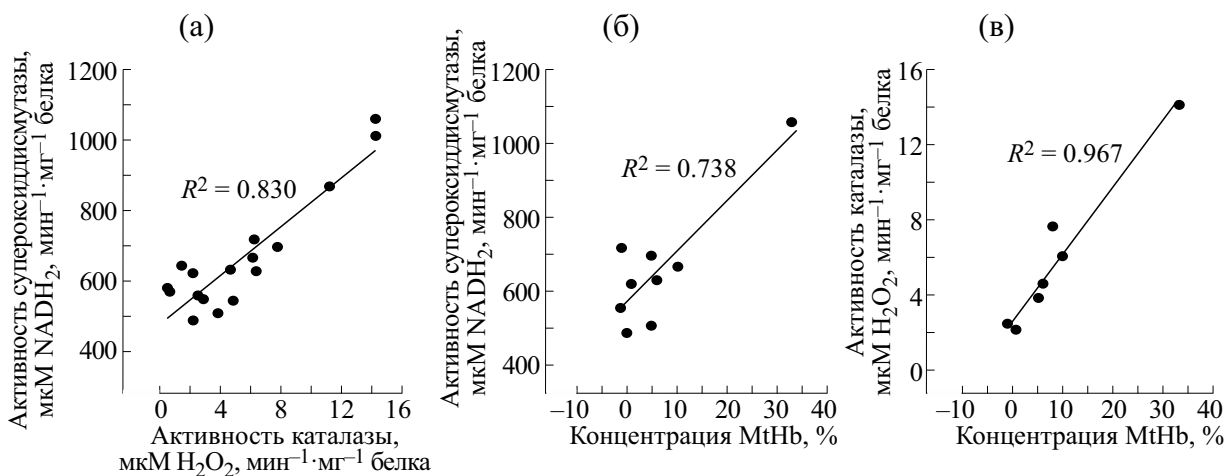


Рис. 4. Корреляционные отношения для систем «SOD+CAT» (а), «SOD+MetHb» (б) и «CAT+MetHb» (в).

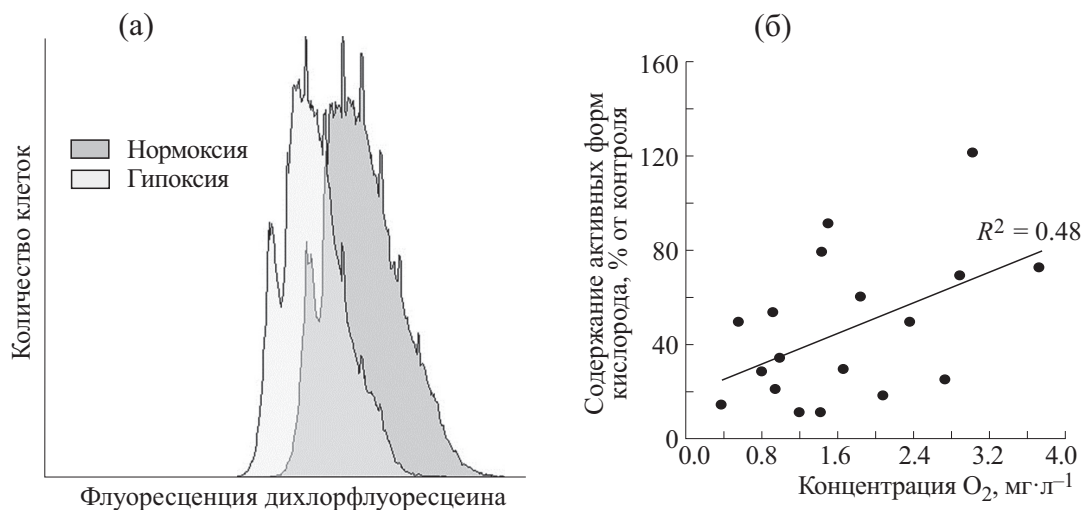


Рис. 5. Содержание активных форм кислорода в эритроцитах в условиях нормоксии и гипоксии по уровню гидроперекисей (дихлорофлуоресцеина) в клетках: (а) – данные проточной цитометрии, (б) – полигон распределения.

Метгемоглобин. Случаи перехода гемоглобина в мет-форму в условиях гипоксии отмечены во многих работах, выполненных на низших и высших позвоночных [14–17]. Реакция достаточно парадоксальна, так как наблюдается при низком уровне окислительной нагрузки. При этом отмечается, что дезоксигенированный гемоглобин легче подвергается окислению [2, 18]. Это обусловлено тем, что в дезокс-форме гемоглобина феррион находится в высокоспиновом состоянии (4 неспаренных электрона). Присоединение кислорода переводит железо в низкоспиновое состояние, в котором все электроны спарены. Отсюда

следует, что любые изменения, влекущие за собой снижение низкоспинового состояния Fe^{2+} в HbO_2 -комплексе, могут стать причиной отрыва электрона от железа и привести к его окислению. Роль акцептора электрона при этом может выполнять молекула кислорода, что приводит к образованию $\cdot O_2^-$. В условиях гипоксии доля дезокси-формы повышается, что должно усиливать процессы автоокисления гемоглобина. При этом в венозной крови достаточно свободного кислорода, способного принять электроны от Fe^{2+} , так как диффузия его в ткани ограничивается ввиду

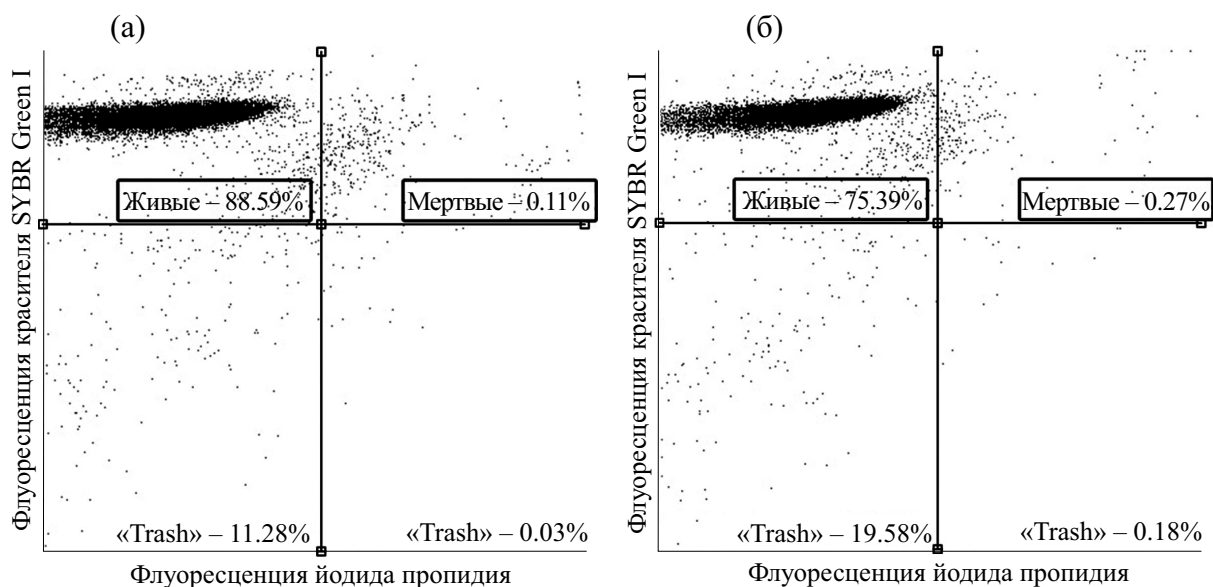


Рис. 6. Пример анализа на соотношение живых и мертвых клеток в суспензиях эритроцитов: (а) – в условиях нормоксии (7.22 мг O₂ · л⁻¹), (б) – в условиях гипоксии (0.43 мг O₂ · л⁻¹).

низких концентрационных градиентов в системе «кровь → ткани».

Не следует исключать из внимания и тот факт, что в условиях нормоксии в ядерных эритроцитах рыб активно протекают аэробные процессы. Об этом свидетельствует наличие в них митохондрий [26, 27]. При дефиците же кислорода в клетках красной крови должна повышаться роль реакций гликолиза, которые могут иметь два следствия: снижение величины внутриклеточной рН и возникновение дефицита NADH. Это должно сопровождаться снижением активности NADH-диафразы, которая выполняет роль специфического переносчика электрона с NADH на цитохром b_5 , а затем на MtHb [4]. Действительно, при гипоксии наблюдается существенное закисление внутриклеточной среды эритроцита [28]. Это должно ограничивать активность NADH-диафразы и способствовать переходу гемоглобина в окисленное состояние. Показано также, что значительное снижение рН ускоряет процесс автоокисления гемоглобина [29, 30].

Следует также рассмотреть вероятность утечки электронов с дыхательных комплексов митохондрий эритроцитов в условиях гипоксии. Это может объясняться относительно невысоким сродством цитохромоксидазы (комплекс IV) к кислороду. При этом на предыдущих звеньях дыхательной цепи электроны замедляют свой бег, и их «утечка» на кислород усиливается, что должно сопровождаться ростом содержания $\cdot\text{O}_2^-$ в клетке. Однако данный процесс не сопровождается переходом гемоглобина в мет-форму.

Переходу гемоглобина в окисленное состояние может способствовать также еще один достаточно масштабный процесс, который развивается в эритроцитах при адаптации рыб к условиям гипоксии – свеллинг клеток красной крови. Он описан во многих работах [2, 31–33]. Считается, что данная реакция направлена на коррекцию внутриклеточного рН и определяется работой Na^+/H^+ -антипорта [34]. Она контролируется адреналином и норадреналином и реализуется через β -адренорецепторы клеток и cAMP [35–37]. Следует отметить, что свеллинг эритроцитов рыб наблюдался и в изолированных взвешках клеток [38]. Допускается, что данная реакция связана со значительным снижением рН цитоплазмы и, как следствие, ростом сродства внутренней стороны мембраны клеток к H^+ , что активирует Na^+/H^+ -антипорт.

Работа Na^+/H^+ -антипорта в условиях гипоксии предполагает вход в клетку Na^+ . Это должно обеспечить оводнение цитоплазмы и рост ее диэлектрической проницаемости. Последнее облегчает проникновение воды в гидрофобную полость белков и гемоглобина в частности [39]. Вода

встраивается на уровне имидазольной группы гистидина, вызывая окисление как окси-, так и дезокси-форм пигмента, что должно сопровождаться освобождением $\cdot\text{O}_2^-$. Учитывая масштабность данного процесса, можно допустить, что он является основным в образовании мет-формы и $\cdot\text{O}_2^-$ при экстремальных формах гипоксии.

Вместе с тем необходимо отметить, что не во всех работах отмечается рост содержания метгемоглобина в крови при гипоксии [40, 41]. Это, вероятно, связано с тем, что в них исследуются умеренные формы гипоксии (более $2,5 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$). В нашем случае эти концентрации кислорода также не оказывали заметного влияния на функциональное состояние гемоглобина.

Антиоксидантный ферментный комплекс. В работе исследуются SOD и CAT в эритроцитах. Соотношение их активности зависит от характера окислительной нагрузки. Возможны три варианта:

- увеличение активности CAT без роста активности SOD. Такое состояние отражает существенный рост содержания в клетке гидроперекисей;

- рост активности SOD без увеличения активности CAT. В этом случае можно говорить о прооксидантном эффекте, связанным с продукцией $\cdot\text{O}_2^-$;

- одновременный рост активности CAT и SOD отражает процесс дисмутации $\cdot\text{O}_2^-$.

В нашем случае следует рассматривать третий вариант. Активность обоих ферментов повышалась и достигала максимальных значений при концентрациях кислорода в инкубационной среде менее $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Величина R^2 для системы «SOD ↔ CAT» превышала 0.8. Одновременно обнаружена значимая связь между активностью SOD и CAT, с одной стороны, и содержанием мет-формы гемоглобина, с другой стороны (R^2 более 0.7). Это означает, что в эритроцитах морского ерша в условиях гипоксии реализуется реакция дисмутации супероксида, продукция которого с высокой долей вероятности определяется переходом гемоглобина в ферри-форму.

Об эффективности перехвата супероксида в реакциях дисмутации можно судить по состоянию эритроцитов. В условиях гипоксии уровень активных форм кислорода (гидроперекисей) в клетках красной крови не повышался. Интенсивность флуоресценции дихлорофлуоресцеина, напротив, была ниже контрольных значений. Данные по флуоресценции SYBR Green I и йодида пропидия не позволяют говорить о росте фракции мертвых клеток в суспензии эритроцитов. Это означает, что SOD и CAT полностью нейтра-

лизовали образующийся $\cdot O_2^-$, то есть контролируемая нами реакция находилась в пределах физиологической нормы.

Следует отметить, что рассмотренный выше порядок процессов имеет определенные функциональные следствия. Он позволяет проводить процесс деоксигенации венозной крови, которая содержит 40–60% связанного кислорода. Процесс не требует снижения тканевого P_{O_2} , что особенно актуально в условиях гипоксии. В наших экспериментах рост содержания метгемоглобина наблюдался при концентрации кислорода в инкубационной среде менее $2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Этот процесс становился еще более выраженным в концентрационном диапазоне O_2 0–1 $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$, что соответствовало венозному насыщению кислородом. Отсюда следует, что переход гемоглобина в ферриформу должен способствовать процессу деоксигенации пигмента при низком напряжении кислорода, что позволяет поддерживать окислительные процессы в тканях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при концентрациях кислорода в среде менее $1 \text{ мг} O_2 \cdot \text{л}^{-1}$ часть гемоглобина переходит ферри-форму. Максимальный прирост составляет 32%. Этот процесс не приводит к увеличению активных форм кислорода в клетке и происходит на фоне роста активности SOD и САТ. Увеличение содержания метгемоглобина в эритроцитах не влияет на целостность цитоплазматических мембран клеток. Случаи лизиса клеток красной крови в инкубационной среде при гипоксии (менее $1 \text{ мг} O_2 \cdot \text{л}^{-1}$) количественно совпадают с контрольными величинами (нормоксия – 7–8 $\text{мг} O_2 \cdot \text{л}^{-1}$).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания (№ гос. регистрации АААА-А18-118021490093-4) и при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-00135).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. N. Schechter, *Blood* **112** (10), 3927 (2008).
2. F. B. Jensen, A. Fago, and R. E. Weber, in *Fish Physiology*, ed. by S. F. Perry and B. L. Tufts (Acad. Press, San Diego, 1998), v. 17, pp. 1–40.
3. M. S. Krishna and G. Venkataramana, *Ind. J. Physiol. Pharmacol.* **51** (3), 284 (2007).
4. M. J. Percy and T. R. Lappin, *Br. J. Haematol.* **141**, 298 (2008).
5. E. Mather-Mihaich, R. T. Di-Giulio, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **20** (3), 391 (1991).
6. R. V. Zikic, A. Stajn, and V. M. Petrovic, *Acta Biol. Jugosl. C* **27** (1), 45 (1991).
7. C. S. Tucker and J. R. MacMillan, *J. Appl. Aquacult.* **1** (4), 21 (1992).
8. E. J. Schoore, B. A. Simco, and K. B. Davis, *J. Aquat. Anim. Health.* **7** (4), 304 (1995).
9. J. Wdzieczak, et al., *Comp. Biochem. Physiol. B* **73** (2), 361 (1982).
10. A. L. Dafre and E. Reischl, *Comp. Biochem. Physiol. B* **116** (3), 323 (1997).
11. J. Hardig and L. B. Hoglund, *Comp. Biochem. and Physiol. A* **76** (1), 27 (1983).
12. J. Sajiki and K. Takahashi, *Eisei-Kagaku* **37** (6), 467 (1991).
13. R. R. Wilson Jr. and F. C. Knowles, *Arch. Biochem. Biophys.* **255**, 210 (1987).
14. E. G. Affonso, et al., *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **133** (3), 375 (2002).
15. N. Chen, et al., *Frontiers Physiol.* **8** (1), 1 (2017).
16. C. P. Olander and C. E. Parr, *Experientia* **33** (12), 1656 (1978).
17. J. Arnaud, et al., *Ann. Human Biol.* **6** (6), 585 (1979).
18. A. Mansouri, *Experientia* **37**, 95 (1981).
19. W. G. Willmore and K. B. Storey, *Mol. Cell. Biochem.* **170**, 177 (1997).
20. V. I. Lushchak and T. V. Bagnyukova, *Comp. Biochem. Physiol. B* **144**, 283 (2006).
21. A. Stara, J. Machova, and J. Velisek, *Neuro. Endocrinol. Lett.* **33** (3), 130 (2012).
22. A. A. Soldatov, *Hydrobiol. J.* **41** (1), 113 (2005).
23. K. Tiihonen, M. Nikinmaa, *J. Exp. Biol.* **161**, 509 (1991).
24. R. E. Benesch, R. Benesch, and S. Yung, *Anal. Biochem.* **55** (1), 245 (1973).
25. A. A. Soldatov, O. L. Gostyukhina, and I. V. Golovina, *J. Evol. Biochem. Physiol.* **44**, 175 (2008).
26. R. G. Boutilier and R. A. Ferguson, *Can. J. Zool.* **67** (12), 2986 (1989).
27. M. C. L. Phillips, C. D. Moyes, and B. L. Tufts, *J. Exp. Biol.* **203** (6), 1039 (2000).
28. N. C. Adragna, M. Di Fulvio, and P. K. Lauf, *J. Membrane Biol.* **201** (3), 109. (2004).
29. W. J. Wallace, et al., *J. Biol. Chem.* Vol. **257**, 4966 (1982).
30. M. F. Perutz, *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 1 (1990).
31. A. Soivio, K. Nyholm, and K. Westman, *J. Fish Biol.* **6** (6), 763 (1974).

32. M. Nikinmaa, et al., *J. Exp. Biol.* **47** (1), 53 (1987).
 33. K. Holk, *Fish Physiol. Biochem.* **15** (5), 371 (1996).
 34. B. Tufts, *Can. J. Zool.* **70** (3), 411 (1992).
 35. R. A. Ferguson and R. G. Boutilier, *Respir. Physiol.* **74** (6), 65 (1988).
 36. A. Salama and M. Nikinmaa, *Raporttisar. Mat. — Luonnontieteellinen. Tiedekunnan / Joensuun Gliopisto.* **30**, 13 (1991).
 37. A. L. Val, G. C. De Menezes, and C. M. Wood, *J. Fish Biol.* **52** (1), 83 (1997).
 38. A. Y. Andreyeva, A. A. Soldatov, and V. S. Mukhanov, *In Vitro Cell. Developm. Biology — Animal.* **53** (4), 312 (2017).
 39. A. White, et al., *Principles of biochemistry* (McGRAW-Hill, 1978), v. 3.
 40. J. N. Cameron, *Comp. Biochem. Physiol. A* **40** (3), 743 (1971).
 41. A. A. Soldatov and I. A. Parfenova, *J. Evol. Biochem. Physiol.* **37** (6), 622 (2001).

Methemoglobin, Catalase-Like and Superoxide Dismutase-Like Activity in Erythrocytes of *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) under Experimental Hypoxia Conditions (in vitro)

A.A. Soldatov^{*, **}, A.Y. Andreeva^{*, *}, T.A. Kukhareva^{*}, and T.I. Andreyenko^{*, **}**

**Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, prosp. Nakhimova 2, Sevastopol, 299011 Russia*

***Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia*

****Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Toreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia*

The influence of hypoxia on black scorpionfish (*Scorpaena porcus*) red blood cells has been studied. In deep hypoxia (oxygen concentration less than 1 mg O₂ L⁻¹, oxygen level in normal range is 7–8 mg O₂ L⁻¹) oxygen transport is impaired and the iron moiety of unoxygenated hemoglobin is in the ferric state (methemoglobin). Maximum methemoglobin level is 32%. The accumulation of methemoglobin in red blood cells is accompanied with an increase in catalase-like and superoxide dismutase-like activity and the reduction of reactive oxygen species in the cytoplasm. It has been shown that the formation of methemoglobin within red cells is not associated with damage to the cytoplasmic membrane of red blood cells. The percentage of lysis of red blood cells in deoxygenated suspensions (less than 1.0 mg O₂ L⁻¹) quantitatively coincides with control values.

Keywords: hypoxia, in vitro experiments, red blood cells, methemoglobin, catalase, superoxide dismutase