

DOI 10.31718/2077-1096.19.1.115  
УДК 616.155.1. 12-008.315: 577.121.7

Рамазанов В.В., Воловельская Е.Л., Руденко С.В., Семенченко А.Ю., Бондаренко В.А.

## МЕТАБОЛИЗМ ГОМОЦИСТЕИНА И ГЛУТАТИОНА В ЭРИТРОЦИТАХ ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*При гипотермическом хранении эритроцитов отмечается снижение уровня глутатиона и повышение концентрации гомоцистеина, вместе с тем, при включении в среду субстратных аминокислот синтеза глутатиона происходит активация утилизации данного цитотоксина. Кроме того, стимуляция синтеза глутатиона снижает потерю мембранных белков и уменьшает степень окисления гемоглобина, что обеспечивает сохранение осмотической устойчивости эритроцитов. Представленные данные в обзоре указывают на то, что стимуляция антиоксидантного потенциала эритроцитов при хранении может предупредить развитие окислительного стресса и воспаления при последующей трансфузии. Кроме того, сохранение показателей жизнеспособности различных клеток при криоконсервировании в среде с субстратными аминокислотами указывает на то, что стимуляция антиоксидантного потенциала способствует повышению устойчивости клеток к повреждающим факторам замораживания-оттаивания.*

Ключевые слова: гомоцистеин, глутатион, окислительный стресс, эритроциты, гипотермическое хранение.

*Данная работа является фрагментом темы «Исследование механизмов криоповреждения эритроцитов млекопитающих на модели постгипертонического шока и после размораживания», № гос. регистрации 121.*

При гипотермическом хранении (ГТХ) эритроцитов отмечается накопление биологически активных продуктов и мембранных микрочастиц с сопутствующим нарушением морфологии и реологии клеток [8]. Кроме того, при ГТХ эритроцитов было выявлено снижение уровня глутатиона и повышение концентрации гомоцистеина [15]. Данные нарушения вызывают повышение уровня окислительного стресса и изменение физиологии эритроцитов, что является причиной посттрансфузионного воспаления [2, 14]. Это воспаление может инициироваться не только ионами железа, высвобождающимися при разрушении поврежденных эритроцитов [18], но и гомоцистеином, который накапливается в образцах эритроцитов при хранении [15].

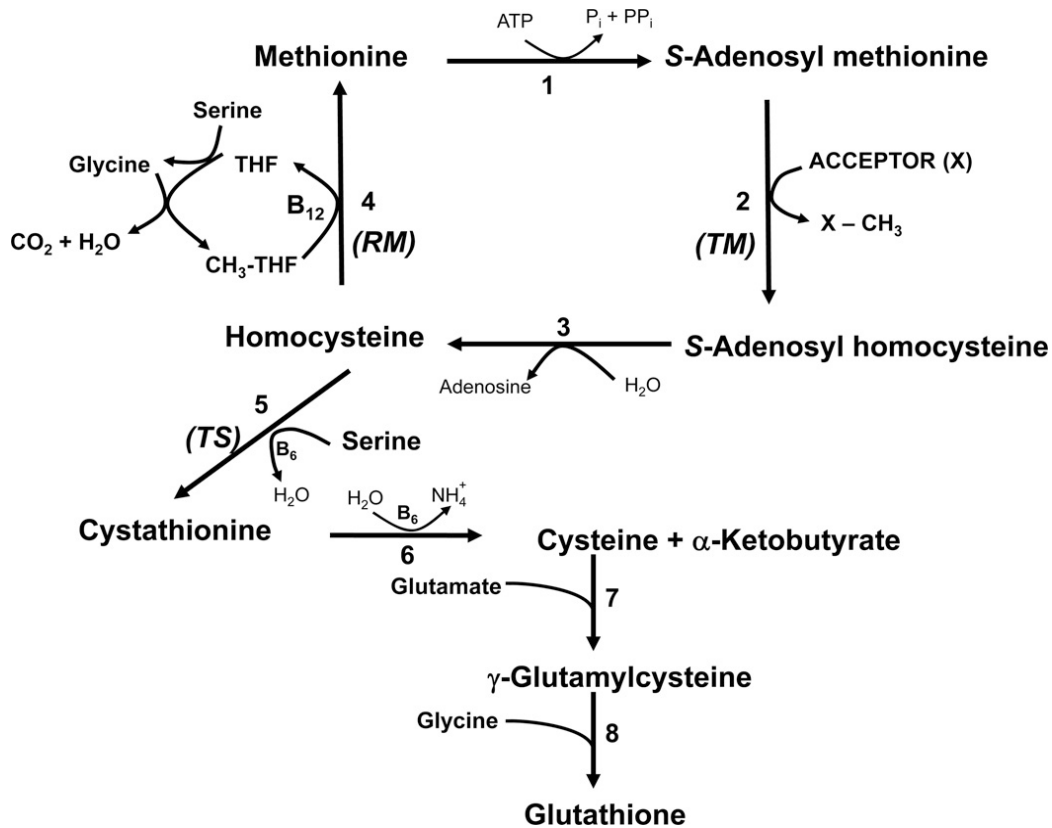
Гомоцистеин – серосодержащая аминокислота, которая образуется при метаболизме метионина, присутствует в крови и тканях, но не входит в состав белка. Печень метаболизирует ~50% потребленного метионина у людей, поэтому данный орган является основным регулятором уровня общего гомоцистеина [6]. На рисунке представлена схема метаболизма метионина с превращением его в S-аденозилметионин (SAM) (реакция 1), который является донором метильной группы в реакциях трансметилирования с образованием S-аденозилгомоцистеина (SAH) (реакция 2). SAH подвергается гидролизу с образованием гомоцистеина (реакция 3) и, наконец, гомоцистеин реметилируется обратно в метионин с завершением цикла метионина (реакция 4). Кроме того, гомоцистеин также вступает в реакции транссульфирования с образованием цистеина (реакции 5,6). Образовавшийся цистеин может взаимодействовать с глутаматом и глицином в реакциях, катализируемых  $\gamma$ -глутамилцистеинлигазой (реакция 7) и глутатион-синтетазой (реакция 8), с образованием глутатиона – основно-

го тиолового антиоксиданта [13, 19, 21]. При поступлении в плазму крови гомоцистеин димеризуется и образует дисульфидные связи, как при самоокислении, так и с другими тиолами с образованием супероксидных радикалов ( $O_2^{\cdot-}$ ) [20]. Супероксид реагирует с оксидом азота (NO) с образованием аниона пероксинитрита ( $ONOO^-$ ), сильного окислителя различных соединений. При дисфункции эндотелия пероксинитрит продуцируется не только в стенках сосудов, но и во внутрисосудистой области, где поглощается эритроцитами и нейтрализуется антиоксидантной системой [16]. Детоксикация пероксинитрита эритроцитами является важным фактором контроля сосудистой функции при различных патологиях, включая атеросклероз, гипертензию и диабет. Однако при прогрессировании заболеваний сверхпродукция оксидантов и поступление их в эритроциты вызывает окислительный стресс и клеточную дисфункцию, связанную с нарушением метаболизма и клеточной деформируемости, что приводит к изменению гемореологии и системной гемодинамики с ускорением развития патологии сосудов [11, 16, 17].

При ГТХ эритроцитов рост уровня гомоцистеина происходит вследствие нарушения его реметилирования до метионина, что приводит к повышению уровня SAH и предотвращению регенерации SAM, который необходим для реакций метилирования [15, 19]. Высокий уровень SAH и нарушение реакций эритроцитов, зависящих от метилирования, возможно являются причиной ингибирования синтеза глутатиона, однако это нарушение не влияет на реакции транссульфирования, поскольку уровень цистеина повышается во время хранения [15]. С другой стороны, исследование метаболизма гомоцистеина в клетках цельной крови показало, что реакции транссульфирования отмечаются в лейкоцитах, тогда как в эритроцитах только син-

тезируется данная аминокислота и высвобождается в плазму крови [12]. Очевидно, что данное противоречие определяется разными условиями эксперимента и указывает на существование определенных метаболических механиз-

мов. Вместе с тем, представленные ниже данные подчеркивают взаимосвязь метаболизма гомоцистеина, глутатиона и редокс-потенциала эритроцитов.



**Рис.** Связь метаболизма гомоцистеина с синтезом глутатиона. Основные ферменты: 1 – метионин-аденозилтрансфераза; 2 – X-метильтрансфераза; 3 – S-аденозилгомоцистеингидролаза; 4 – метионинсинтетаза; 5 – цистатионин β-синтетаза; 6 – цистатионин-γ-лиаза; 7 – γ-глутамилцистеин-лиаза; 8 – глутатионсинтетаза. Сокращения: TM – трансметилирование; RM – реметилирование; TS – транссульфирование; THF – тетрагидрофолат; CH<sub>3</sub>-THF – метил-тетрагидрофолат. Рисунок составлен на основе схем из интернет-ресурса и статьи [10].

Установлено, что окислительное повреждение эритроцитов при ГТХ было меньше, если до сдачи крови доноры принимали в течение 10 дней смесь антиоксидантов [7]. Эти данные указывают на то, что эритроциты в норме при циркуляции подвергаются окислительному стрессу с последующим понижением их максимально возможного антиоксидантного потенциала. При сравнении ГТХ эритроцитов в стандартной среде ADSOL с ГТХ в среде ADSOL с добавлением субстратов синтеза глутатиона (глутамин, глицин и N-ацетил-цистеин), установлено, что данные субстраты способствуют: 1) значительному увеличению активности γ-глутамилцистеинлигазы; 2) увеличению глутатиона и уменьшению концентрации гомоцистеина в супернатанте ГТХ-образцов; 3) уменьшению степени окисления гемоглобина до метгемоглобина; 4) снижению потерь мембранных белков (полоса 4.1, 4.2, 3). Авторы работы сделали заключение о том, что при активации синтеза глутатиона субстратными аминокислотами повышается антиоксидантный потенциал эритроцитов и осуществляется контроль уровня гомоцистеина, что имеет

важное значение при трансфузии ГТХ-эритроцитов, а также при диабете и серповидноклеточной анемии, при которых эритроциты подвержены хроническому или острому окислительному стрессу [4]. Белок полосы 3 является стабилизатором липидного бислоя, связывает цитоскелет, анкирин и белок полосы 4.2. Белок полосы 4.1 выполняет двойную функцию в цитоскелете эритроцитов: способствует ассоциации между спектрином и F-актином и связывает цитоскелет с мембраной в силу его ассоциации с гликофоринном и белком полосы 3. Белок полосы 4.2 связан с внутренней поверхностью мембраны через взаимодействие с белком полосы 3 и необходим для нормальной функции эритроцитов [3]. Дефицит или дисфункция белков полос 3, 4.1 и 4.2 приводит к сфероцитозу и повышению осмотической хрупкости эритроцитов [5]. Поэтому снижение потерь данных белков при включении субстратных аминокислот синтеза глутатиона в ГТХ-среду может предупреждать повышение осмотической хрупкости эритроцитов при хранении [4].

При криоконсервировании спермы кролика

установлено, що включення глутаміна в среду замороживання значительно улучшало подвижность сперматозоидов, целостность мембран и митохондриальную активність, приводило к ингибированию перекисного окисления липидов в замороженно-отогретых сперматозоидах. Кроме того, отмечалось увеличение содержания глутатиона и активности  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазы и глутатионпероксидазы с сопутствующим снижением уровня активных форм кислорода (АФК) до замороживания и после оттаивания [22]. Показано, что при криоконсервировании ядросо-державших клеток кордовой крови добавление N-ацетил-цистеина в среду с ДМСО приводило к уменьшению количества клеток с избыточным содержанием АФК и увеличению показателей их сохранности и жизнеспособности на этапе эквilibрации с криопротектором, а также после замороживания-оттаивания клеточных образцов [1]. Для улучшения качества и метаболической функции гепатоцитов при криоконсервировании клетки преобразовывают средой, содержащей N-ацетил-цистеин [9]. Эти данные указывают на то, что предшественники субстратов синтеза глутатиона стимулируют повышение антиоксидантного потенциала клеток и жизнеспособность как на этапе прединкубации перед замороживанием, так и после криоконсервирования.

Следовательно, суммирование представленных данных литературы позволяет сделать следующее заключение. Эритроциты как составляющая системы редокс-гомеостаза организма осуществляет поглощение и нейтрализацию активных форм кислорода и азота, что в норме детерминирует определенный антиоксидантный потенциал, которого недостаточно для поддержания структурно-функционального состояния эритроцитов после выделения из донорской крови и хранения. При гипотермическом хранении эритроцитов отмечается снижение уровня глутатиона, повышение уровня гомоцистеина, окисление гемоглобина и потеря основных мембранных белков, что приводит к повышению осмотической хрупкости эритроцитов. Вместе с тем, включение в среду для гипотермического хранения субстратных аминокислот синтеза глутатиона происходит активация утилизации гомоцистеина. Кроме того, стимуляция синтеза глутатиона снижает потерю мембранных белков и уменьшает степень окисления гемоглобина, что может предупреждать повышение осмотической хрупкости эритроцитов при хранении. Окислительный стресс в клетках, включая эритроциты, при различных патологиях вызывает снижение уровня глутатиона и нарушение его синтеза, что приводит к повышению продукции гомоцистеина и поступлению его в плазму крови. Гомоцистеин – цитотоксическая аминокислота, усиливает продукцию супероксида, ограничивает биодоступность оксида азота и вызывает развитие патологии сосудов.

Представленные в обзоре данные указывают

на возможность разработки фармстратегии, направленной на стимуляцию утилизации гомоцистеина, а также редокс-потенциала эритроцитов и других клеток организма. Для сохранения структурной целостности мембран эритроцитов и предупреждения развития окислительного стресса и воспаления при трансфузии в среду для ГТХ необходимо включать субстраты синтеза глутатиона. Можно предположить, что прединкубация различных клеток, включая эритроциты, в криоконсерванте с данными субстратами может повысить их устойчивость к повреждающим факторам замороживания-оттаивания.

### Литература

1. Makashova OE, Babychuk LO, Zubova OL, Zubov PM. Optymizatsiya metodu kriokonservuvannya yadrovnisnykh klityn kordovoyi krovi lyudyny z vykorystannam kombinatsiyi krioprotektora DMSO ta antyoksydantu N-atsetyl-L-tsysteynu [Optimization of the method of cryopreservation of human cell cord blood cells by using a combination of DMSO cryoprotectant and N-acetyl-L-cysteine antioxidant]. Problemy kryobiyologyy y kryomedycyny. 2016; 26(4): 295-307. [Ukrainian]
2. Bogner V, Keil L, Kanz KG, et al. Very early posttraumatic serum alterations are significantly associated to initial massive RBC substitution, injury severity, multiple organ failure and adverse clinical outcome in multiple injured patients. Eur J Med Res. 2009; 14(7): 284–91.
3. Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. Blood. 2003; 101(10): 4180–8.
4. Dumaswala UJ, Zhuo L, Mahajan S, et al. Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. Am J Physiol Cell Physiol. 2001; 280(4): 867–3.
5. Farias MG. Advances in laboratory diagnosis of hereditary spherocytosis. Clin Chem Lab Med. 2017; 55(7): 944–8. doi: 10.1515/ccclm-2016-0738.
6. García-Tevijano ER, Berasain C, Rodríguez JA, et al. Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis. Hypertension. 2001; 38(5): 1217–21.
7. Greenwalt TJ. Recent developments in the long-term preservation of red blood cells. Curr Opin Hematol. 1997; 4(6): 431–5.
8. Hess JR. Red cell storage. J Proteomics. 2010; 73(3): 368–73. doi: 10.1016/j.jprot.2009.11.005.
9. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Current status of hepatocyte transplantation. Transplantation. 2012; 93(4): 342–7. doi: 10.1097/TP.0b013e31823b72d6.
10. Jahoor F. Effects of decreased availability of sulfur amino acids in severe childhood undernutrition. Nutr Rev. 2012; 70(3): 176–87. doi: 10.1111/j.1753-4887.2011.00462.x.
11. Kuhn V, Diederich L, Keller TCS, et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. Antioxid Redox Signal. 2017; 26(13): 718–42. doi: 10.1089/ars.2016.6954.
12. Malinow MR, Axthelm MK, Meredith MJ, et al. Synthesis and transsulfuration of homocysteine in blood. J Lab Clin Med. 1994; 123(3): 421–9.
13. Mosharof E, Cranford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. Biochemistry. 2000; 39(42): 13005–11.
14. Obrador R, Musulin S, Hansen B. Red blood cell storage lesion. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio). 2015; 25(2): 187–99. doi: 10.1111/vec.12252.
15. Roback JD, Josephson CD, Waller EK, et al. Metabolomics of ADSOL (AS-1) red blood cell storage. Transfus Med Rev. 2014; 28(2): 41–55. doi: 10.1016/j.tmr.2014.01.003.
16. Romero N, Denicola A, Radi R. Red blood cells in the metabolism of nitric oxide-derived peroxynitrite. IUBMB Life. 2006; 58(10): 572–80.
17. Santilli F, D'Ardes D, Davi G. Oxidative stress in chronic vascular disease: From prediction to prevention. Vascul Pharmacol. 2015; 74: 23–37. doi: 10.1016/j.vph.2015.09.003.
18. Spitalnik SL. Stored red blood cell transfusions: iron, inflammation, immunity, and infection. Transfusion. 2014; 54(10): 2365–71. doi: 10.1111/trf.12848.
19. Tehlivets O, Malanovic N, Visram M, et al. S-adenosylhomocysteine hydrolase and methylation disorders: yeast as a model system. Biochim Biophys Acta. 2013; 1832(1): 204–15.
20. Weiss N, Heydrick SJ, Postea O, et al. Influence of hyperhomocysteinemia on the cellular redox state—impact on homocysteine-

- induced endothelial dysfunction. Clin Chem Lab Med. 2003; 41(11): 1455–61.
21. Williams KT, Schalinske KL. Homocysteine metabolism and its relation to health and disease. Biofactors. 2010; 36(1): 19–24. doi: 10.1002/biof.71
22. Zhu Z, Fan X, Lv Y, et al. Glutamine protects rabbit spermatozoa against oxidative stress via glutathione synthesis during cryopreservation. Reprod Fertil Dev. 2017; 29(11): 2183–94. doi: 10.1071/RD17020.

### **Реферат**

#### **МЕТАБОЛІЗМ ГОМОЦИСТЕЇНУ І ГЛУТАТІОНУ В ЕРИТРОЦИТАХ ПРИ ГІПОТЕРМІЧНОМУ ЗБЕРІГАННІ**

Рамазанов В.В., Воловельська Е.Л., Руденко С.В., Семенченко А.Ю., Бондаренко В.А.

Ключові слова: гомоцистеїн, глутатіон, окислювальний стрес, еритроцити, гіпотермічне зберігання.

При гіпотермічному зберіганні еритроцитів відзначається зниження рівня глутатіону та підвищення концентрації гомоцистеїну, разом з тим, при включенні в середовище субстратних амінокислот синтезу глутатіону відбувається активація утилізації даного цитотоксину. Крім того, стимуляція синтезу глутатіону знижує втрату мембранних білків і зменшує ступінь окислення гемоглобіну, що забезпечує збереження осмотичної стійкості еритроцитів. Представлені в огляді дані вказують на те, що стимуляція антиоксидантного потенціалу еритроцитів при зберіганні може попередити розвиток окисного стресу і запалення при подальшій трансфузії. Крім того, збереження показників життєздатності різних клітин при кріоконсервуванні в середовищі з субстратними амінокислотами вказує на те, що стимуляція антиоксидантного потенціалу сприяє підвищенню стійкості клітин до пошкоджень факторами заморожування-відтавання.

### **Summary**

#### **METABOLISM OF HOMOCYSTEINE AND GLUTATHIONE IN ERYTHROCYTES IN HYPOTHERMAL STORAGE**

Ramazanov V.V., Volovelskaya E.L., Rudenko S.V., Semenchenko A.Yu., Bondarenko V.A.

Key words: homocysteine, glutathione, oxidative stress, erythrocytes, hypothermic storage.

When hypothermic storage of red blood cells there is a decrease in the level of glutathione and an increase in the concentration of homocysteine, at the same time, inclusion in the medium of substrate amino-acids of the synthesis of glutathione activates the utilization of this cytotoxin. Moreover, stimulation of the synthesis of glutathione reduces the loss of membrane proteins and lowers the intensity of hemoglobin oxidation that ensures the preservation of the osmotic stability of erythrocytes. Red blood cells as a component of the body redox homeostasis absorb and neutralize reactive oxygen and nitrogen species, which normally determine a certain antioxidant potential and are not enough to maintain the structural and functional state of red blood cells after isolation from donor blood and storage. Oxidative stress in cells, including red blood cells, in various pathologies usually causes a decrease in the level of glutathione and an impairment of its synthesis that leads to an increase in the production of homocysteine and its entry into the blood plasma. Homocysteine is a cytotoxic amino acid that enhances the production of superoxide, limits the bioavailability of nitric oxide and causes the development of vascular pathology. The data presented in the review indicate that stimulation of the antioxidant potential of erythrocytes during the storage may prevent the development of oxidative stress and inflammation during subsequent transfusion. In addition, the preservation of the viability indicators of various cells during cryopreservation in a medium with substrate amino-acids shows that stimulation of the antioxidant potential contributes to an increase in the cell resistance to the damaging factors of freeze-thawing.