

ПЕРЕХОД ГЕМОГЛОБИНА В ФЕРРИ-ФОРМУ: ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ПОДДЕРЖАНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В ТКАНЯХ ГИДРОБИОНТОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ И АНОКСИИ

А. А. Солдатов

Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, РФ,
alekssoldatov@yandex.ru

Настоящая публикация посвящена морским организмам (рыбы, моллюски), толерантным к условиям гипоксии и аноксии и образующим устойчивые скопления в OMZ (oxygen-minimum zones) Мирового океана. Отмечено, что у этой группы гидробионтов наблюдается принципиальная реорганизация метаболических процессов, направленная на оптимизацию энергетических трат. Она обеспечивает сбалансированное угнетение мембранных и метаболических функций клеточных систем, исключает накопление токсических метаболитов и позволяет анаэробно получать дополнительный ресурс макроэргических соединений. При этом выявлен и ряд парадоксальных реакций: рост активности каталазы и супероксиддисмутазы в тканях и повышение содержания метгемоглобина в крови (гемолимфе). Для экспериментальной проверки впервые предлагается гипотеза: переход гемоглобина в ферри-форму индуцирует реакции дисмутации супероксида в тканях, приводящие к образованию молекулярного кислорода. Последний способствует поддержанию окислительного метаболизма в тканях в условиях анаэробной среды. Эти аспекты проблемы представляют интерес не только для современной гидробиологии, но для биоэнергетики в целом, позволяя по-новому взглянуть на процессы тканевого дыхания в условиях внешнего дефицита кислорода.

Ключевые слова: зоны гипоксии (OMZ), метгемоглобин, супероксиддисмутаза, каталаза, морские рыбы, моллюски

Гипоксия водной среды и организмы. Гипоксические акватории широко представлены в шельфовой зоне Мирового океана (oxygen-minimum zones или OMZ) [Levin, 2002; Middelburg, Levin, 2009; Gewin, 2010]. Основными причинами их формирования являются низкая скорость диффузии кислорода в воде и ограничение процессов водообмена [Duncombe-Rae, 2000; Joyce, 2000]. Особый интерес для изучения представляют организмы, образующие устойчивые скопления, которые проявляют явную толерантность к экстремальным формам гипоксии (концентрация кислорода менее 0.5 мг л^{-1} ; норма – $7-8 \text{ мг л}^{-1}$) и аноксии [Fenchel, Finlay, 1995; Levin, 2002; 2010; Stoeck et al., 2003; El Albani et al., 2010; Danovaro et al., 2010].

При изучении толерантных к гипоксии форм жизни основное внимание исследователей сосредоточено на биоэнергетических процессах. Установлено, что у гидробионтов, обитающих в зонах кислородного экстремума, наблюдается принципиальная реорганизация метаболических процессов, направленная на оптимизацию энергетических трат [Hochachka, Somero, 1984; Gewin, 2010]. В тканях повышается содержание аланина и сукцината, как конечных продуктов, что несвойственно аэробному обмену [Waarde, 1988], усиливается продукция NH_4^+ [Shulman, Love, 1999; Chew, Gan, 2005], растет активность аланин- и аспартатаминотрансфераз [Owen, Hochachka, 1974], активизируются процессы переаминирования аминокислот (глутамата, аланина) [Mommson et al., 1980]. Показано также, что ферментативные системы цикла Кребса могут быть задействованы в анаэробных процессах генерации энергии [Waarde, 1988], а дыхательная цепь митохондрий клеток приобретает нескомпенсированный тип организации [Савина 1992; Солдатов, Савина, 2008].

Определенные закономерности выявлены и на уровне клеточных систем. Эритроциты толерантных к гипоксии рыб в условиях дефицита кислорода способны к сбалансированному угнетению мембранных и метаболических функций [Солдатов и др., 2010; 2014; 2015], при этом наблюдаются характерные морфологические изменения клеток и повышается их деформируемость [Gilles, Motais, 1989]. В большинстве работ констатируется факт роста клеточного объема (swelling) [Cossins, Gibson, 1997; Jensen, 2004; Wells, 2009]. Процесс контролируется катехоламинами [Tetens et al., 1988; Perry et al., 1999], взаимодействующими с поверхностными β -адренорецепторами эритроцитов [Reid, Perry, 1995; Jahns et al., 1996] и активирующими Na^+/H^+ и $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ – антипорты клеток [Wood, Simmons, 1994; Jensen, 2004]. Действие катехоламинов опосредуется через cAMP [Gilles, Motais, 1989].

Наряду с отмеченными выше изменениями метаболизма и реакциями клеточных систем, функциональная целесообразность которых очевидна и не вызывает серьезных возражений, выявлен и ряд достаточно парадоксальных реакций. В условиях гипоксии (аноксии), когда окислительная нагрузка минимальна, установлен значительный рост активности каталазы (КАТ) и супероксиддисмутазы (СОД) в тканях [Hermes-Lima, Storey, 1996; Willmore, Storey, 1997; Lushchak et al., 2001; Lushchak, Vagnyukova, 2006; 2007; Stara et al., 2012] и повышение содержания метгемоглобина в циркуляционных системах (кровь, гемолимфа) [Williams et al., 1992; Солдатов и др., 1994]. Поскольку большинство гидробионтов лишь перманентно сталкиваются с условиями внешней гипоксии, предложено рассматривать факт роста активности КАТ и СОД, как подготовку к последующему окислительному стрессу. Второй факт пока не находит внятного объяснения. С нашей точки зрения, эти процессы связаны и позволяют поддерживать окислительный метаболизм в тканях определенный промежуток времени при дефиците или отсутствии кислорода в среде. Эти аспекты изложены ниже (см. Рабочая гипотеза).

Содержание метгемоглобина у гидробионтов. В норме комплекс гемоглобина с кислородом (HbO_2) диссоциирует с сохранением железа гема в ферро-состоянии. Однако в ряде случаев кислород диссоциирует в виде супероксид аниона, переводя железо в трехвалентное состояние (ферри-состояние). В эритроците постоянно присутствует значительное количество восстановительных агентов: GSH, аскорбиновая кислота, токоферол, способных восстанавливать метгемоглобин (MtHb). Однако скорость реакции MtHb с этими соединениями незначительна [Hsieh, Jaffe, 1975]. Существует специфический ферментативный механизм восстановления MtHb. Ключевая роль в нем принадлежит NADH-диафоре, переносящей электрон с NADH на цитохром b_5 , а затем на MtHb [Scott, 1968], что приводит практически к 100% восстановлению окисленного пигмента. В норме его концентрация в крови человека не превышает 1% гемоглобина.

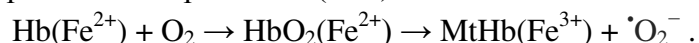
Ядерные эритроциты рыб имеют тот же, что и эритроциты человека, антиоксидантный комплекс [Mather-Mihaich, Di-Giulio, 1991; Zikic et al., 1991]. В них выявлена NADH-диафораза [Солдатов, 1989; Tiisonen, Nikinmaa, 1991; Schoore et al., 1995]. Активность некоторых ферментов (пероксидазы, супероксиддисмутазы) и концентрация восстановителей (GSH) превышает таковую у человека [Wdzieczak et al., 1981; 1982; Dafre, Reischl, 1997]. Вместе с тем, устойчивость респираторных пигментов рыб к окислению существенно ниже. Встречаются виды как с крайне низким содержанием ферри-формы - 0,5-2,0% [Urrutia, Tomasso, 1987; Сухомлинов и др., 1992; Dafre, Reischl, 1997], так и с чрезвычайно высоким – более 15% без видимых признаков токсической метгемоглобинемии [Tomasso et al., 1979; Graham, Fletcher, 1986]. Максимальный уровень – 27% - отмечен у атлантической трески (*Gadus morhua*) [Graham, Fletcher, 1986].

У большинства же видов рыб концентрация МtHb в крови находится в пределах 3-12% [Graham, Fletcher, 1986; Родина, 1992; Hofer, Gatumu, 1994] и проявляет выраженную зависимость от функционального состояния организма.

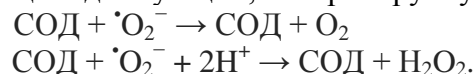
Публикаций о влиянии гипоксии на переход железа гема в ферри-состояние не много, а полученные результаты неоднозначны. Так, у толерантного к гипоксии карпа отмечен рост концентрации МtHb в крови в условиях гипоксии [Williams et al., 1992], тогда как у оксифильных горбуши и форели изменений не наблюдали [Cameron, 1971]. Из этого небольшого сравнения следует, что переход гемоглобина в ферри-форму в условиях внешнего дефицита кислорода имеет определенный функциональный смысл.

Антиоксидантный комплекс тканей гидробионтов. В сравнении с высшими позвоночными антиоксидантный (АО) ферментный комплекс тканей большинства гидробионтов отличается высокой эффективностью, особенно у донных организмов: двустворчатых моллюсков и рыб. Обитая в придонных малоподвижных слоях воды, они практически всегда находятся в условиях дефицита кислорода и испытывают значительную токсическую нагрузку. Уровень ТБК-активных продуктов (ТБК-АП), диеновых конъюгатов в тканях двустворок существенно превышает значения, известные для организмов других систематических групп [Romeo, Gnassia-Barelli, 1997]. Сравнительные исследования показали, что ткани этих организмов имеют высокий уровень каротиноидных пигментов [Анцупова, Руснак, 1990; Bjerken et al., 1993]. Эта группа соединений – одна из самых эффективных «ловушек» синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$), в 35-540 раз превосходящая связывающую способность α -токоферола [Shimidzu et al., 1996]. Данное качество дополняет высокоэффективный АО ферментативный комплекс. Ресурсы GSH и активности сопряженных с ним ферментов: глутатионредуктазы (ГР), глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионтрансферазы (ГТ) многократно превышают значения, определяемые для наземных позвоночных [Viarengo et al., 1995; Cossu et al., 1997; 2000; Солдатов и др., 2003; Гостюхина и др., 2005]. Аналогичные результаты получены и в отношении активностей КАТ и СОД [Viarengo et al., 1995; Niyogi et al., 2001; Солдатов и др., 2003; Гостюхина и др., 2005]. Близкие результаты получены и для донных морских рыб, чьи эритроциты отличаются от высших позвоночных повышенным содержанием восстановленного глутатиона, а также высокими активностями СОД и пероксидазы [Wdzieczak et al., 1981; 1982; Dafre, Reischl, 1997]. Именно у толерантных к дефициту кислорода гидробионтов в условиях гипоксических нагрузок в тканях существенно повышалась активность СОД и каталазы [Hermes-Lima, Storey, 1996; Willmore, Storey, 1997; Lushchak, Bagnyukova, 2006; 2007; Stara et al., 2012], что, как и в случае с ростом содержания МtHb в крови [Williams et al., 1992; Солдатов и др., 1994], оказалось весьма неожиданным и трудно объяснимым.

Рабочая гипотеза. Из представленных выше материалов следует, что у морских организмов, толерантных к внешней гипоксии, в условиях экстремально низких концентраций кислорода происходит: увеличение концентрации метгемоглобина в крови и повышение активности СОД и каталазы в тканях. Как уже отмечено, данные реакции весьма парадоксальны, так как выражены в условиях пониженной окислительной нагрузки на организм. Каждая из них выявлена у разных видов гидробионтов. По нашему мнению, эти процессы должны совпадать, так как в этом случае хорошо определяются причинно-следственные связи. Переход гемоглобина в ферри-форму сопровождается образованием супероксиданионрадикала ($^{\bullet}\text{O}_2^-$):



Последний индуцирует реакцию дисмутации, контролируемую СОД и каталазой, которая протекает в два этапа:



Образующаяся H_2O_2 нейтрализуется каталазой: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Как видно, и на первом и на втором этапах продуцируется молекулярный кислород, который может быть задействован в дыхательной цепи митохондрий в качестве акцептора электронов, то есть поддерживать окислительные процессы в тканях в условиях внешнего дефицита O_2 или аноксии. Следует принять во внимание, что виды, толерантные к условиям гипоксии (аноксии), имеют высокую концентрацию гемоглобина в крови [Soldatov, 2005], цитохромоксидазу с повышенным сродством к кислороду [Lubbers, Kessler, 1968; Wilson et al., 1979] и способны существенно подавлять интенсивность энергетического обмена в тканях [Ночачка, 1986]. Такая стратегия адаптации на начальных этапах может поддерживать необходимый энергетический статус тканей без задействования анаэробных процессов, приводящих к накоплению токсичных метаболитов в тканях.

В этой последовательности процессов принципиальное значение имеет переход гемоглобина в окисленное состояние – метгемоглобин. После разрядки оксигемоглобина до уровня венозного насыщения (40-60%), диссоциация комплекса HbO_2 осложняется в виду явления кооперативности. Одновременно понижается активность НАДН₂-диафоразы, обеспечивающей поддержание гемоглобина в восстановленной ферроформе. Все это должно способствовать образованию супероксида, переходу гемоглобина в ферри-состояние и запускать, рассмотренную выше совокупность процессов. Безусловно данная гипотеза требует экспериментальной проверки.

Благодарности. Работа проводится при поддержке гранта РФФИ № 16-04-00135.

TRANSITION OF THE HEMOGLOBIN IN THE FERRI-FORM: A POSSIBLE MECHANISM OF MAINTENANCE OF OXIDATIVE METABOLISM IN THE TISSUES OF HYDROBIONTS UNDER CONDITIONS OF HYPOXIA AND ANOXIA

A. A. Soldatov

Kovalevsky's Institute of Marine Biological Research, RAS, Sevastopol, RF, alekssoldatov@yandex.ru

This publication focuses on marine organisms (fish, shellfish) tolerant to hypoxia and anoxia and forming stable aggregations in the OMZ (oxygen minimum zones) of the World Ocean. Substantial reorganization of metabolic processes aimed at optimizing the energy expenditure has been observed in this group of hydrobionts. It provides balanced inhibition of membrane and metabolic functions of cell systems, prevents from the accumulation of toxic metabolites and allows to obtain anaerobically an additional resource of macroergic compounds. At the same time, a number of paradoxical reactions, i. e. increased activity of catalase and superoxide dismutase in tissues and increased content of methemoglobin in the blood (hemolymph), has been revealed. First for experimental verification the authors suggest the hypothesis: the transition of hemoglobin in the ferri-form induces a reaction of dismutation of superoxide in the tissues leading to the formation of molecular oxygen. The latter contributes to the maintenance of oxidative metabolism in tissues in anaerobic environment. These aspects of the problem are of interest not only for modern hydrobiology, but for the bioenergetics in general, since they allow to create a new view of the processes of tissue respiration under the conditions of external deficit of oxygen.

Key words: hypoxia zones (OMZ), methemoglobin, superoxide dismutase, catalase, marine fish, shellfish