

# МЕТГЕМОГЛОБИНРЕДУКТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ МОРСКОГО ЕРША (*SCORPAENA PORCUS*, LINNAEUS, 1758) В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ НАГРУЗОК (ЭКСПЕРИМЕНТЫ *IN VITRO*)

© 2025 г. А. А. Солдатов\*, \*\*, @, Н. Е. Шалагина\*, В. Н. Рычкова\*, Т. А. Кухарева\*

\*Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»,  
проспект Нахимова, 2, Севастополь, 299011 Россия

\*\*Севастопольский государственный университет, ул. Университетская, 33, Севастополь, 299053 Россия  
@e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.04.2024 г.

После доработки 08.07.2024 г.

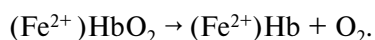
Принята к публикации 09.07.2024 г.

На примере *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) предложена методика оценки метгемоглобинредуктазной активности ядерных эритроцитов костистых рыб. В условиях эксперимента *in vitro* эритроцитарную взвесь данного вида взвешивали в растворах с различной концентрацией  $\text{NaNO}_2$ , после отмывки от данного соединения изучали процесс восстановления метгемоглобина (MetHb) на протяжении 150 мин. О функциональном состоянии гемоглобина судили по результатам спектрального анализа. Изучение кинетики восстановления MetHb показало, что зависимость хорошо описывалась уравнением экспоненциальной функции при коэффициенте детерминации ( $R^2$ ) более 0.9. Характер зависимости сохранялся при различных уровнях окислительной нагрузки. Это позволило рассчитать константу скорости первого порядка  $k$  (25 °C). У данного вида она составила 5.75–6.45 ( $10^{-3}$ )  $\text{мин}^{-1}$ . Установлено, что MetHb-редуктазная активность ядерных эритроцитов морского ерша повышалась при увеличении окислительной нагрузки. При концентрации  $\text{NaNO}_2$  6.0 mM она составляла  $1.73 \pm 0.21 \mu\text{M MetHb мин}^{-1} \text{ г}^{-1} \text{ Нб}$ .

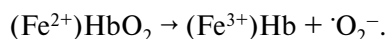
**Ключевые слова:** метгемоглобин, окислительная нагрузка, MetHb-редуктазная активность, ядерные эритроциты, *Scorpaena porcus*

**DOI:** 10.31857/S1026347025010022

Процесс деоксигенации оксигемоглобина в норме сопровождается диссоциацией комплекса  $\text{HbO}_2$  с отрывом кислорода и сохранением железа в геме в двухвалентном состоянии (ферро-состояние) (Schechter, 2008):

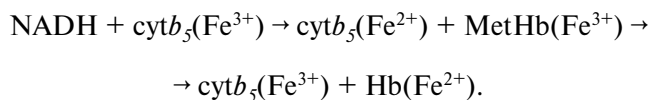


Однако в ряде случаев этот процесс приводит к окислению железа (ферри-состояние) и образованию супероксиданионрадикала ( $\text{O}_2^-$ ) (Schechter, 2008):



Образующееся соединение получило название метгемоглобина (MetHb), оно не способно связывать кислород. Эритроциты высших позвоночных

содержат  $\text{NADH}_2$ -зависимую MetHb-редуктазу (цитохром  $b_5$ -редуктаза, КФ 1.6.2.2), которая препятствует переходу гемоглобина в ферри-состояние. Она сопрягает  $\text{NADH}$  с цитохромом  $b_5$ , что не допускает превышения уровня MetHb в крови более 1% (Schechter, 2008):



Ядерные эритроциты рыб также содержат данный молекулярный комплекс. Сравнительная оценка показала, что у рыб этот процесс протекает более эффективно, чем у высших позвоночных (Jensen, Nielsen, 2018). Вместе с тем считается, что респираторные пигменты рыб отличаются низкой устойчивостью к окислению (Sajiki *et al.*, 1991;

Powell, Perry, 1997; Maestre *et al.*, 2009; Blair *et al.*, 2020). Уровень MetHb в крови ряда видов может достигать 27% (Graham, Fletcher, 1986; Soldatov, 2023) без видимой окислительной нагрузки. Причины этого явления до конца не понятны.

Следует обратить внимание на тот факт, что NADH-MetHb-редуктаза в ядерных эритроцитах локализуется в цитоплазматической мембране, в отличие от высших позвоночных, у которых она находится в цитозоле (Saleh, McConkey, 2012). Недавно в экспериментах *in vitro* показана также способность MetHb связывать H<sub>2</sub>S (Jensen, Fago, 2020). Это особенно актуально для донных видов, сталкивающихся с присутствием H<sub>2</sub>S в придонных слоях воды, то есть наличие в крови рыб повышенных концентраций MetHb может быть функционально обусловлено, а не является следствием низкой стойкости к процессу окисления. Известно, что окисленные формы гемоглобина легко встраивают в мембранные структуры эритроцита (Sztiller *et al.*, 2006; Welbourn *et al.*, 2017). Считается, что в незначительных количествах они способствуют стабилизации клеточного цитоскелета (Welbourn *et al.*, 2017).

В настоящей работе в условиях *in vitro* исследуется метгемоглобинредуктазная активность в ядерных эритроцитах морского ерша (*Scorpaena porcus*, Linnaeus, 1758), обитающего в придонных слоях воды, в крови которого отмечаются повышенные концентрации MetHb.

## 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 (Soldatov, 2005).

**Отбор проб и пробоподготовка.** Кровь получали пункцией хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (“Рихтер”, Венгрия). Предварительно определяли концентрацию

гемоглобина в крови при помощи гемиглобинцианидного метода и гематокритную величину. Для этих целей использовали набор реактивов (“Агат”, Россия) и микроцентрифугу МЦГ-8 (Россия). 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 CaCl<sub>2</sub>, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM трис, 2.2 mM D-глюкозы (pH 7.8) (Tiisonen, Nikinmaa, 1991), при 845 g в течение 5 мин. Ее использовали при проведении экспериментов *in vitro*.

**Экспериментальные схемы.** Отмытую эритроцитарную массу взвешивали в среде (Tiisonen, Nikinmaa, 1991). При смешивании соблюдали соотношение, совпадающее с гематокритной величиной. 40 мкл взвеси вносили в 2.4 мл фосфатного буфера (0.02 mM, pH 7.3), что приводило к лизису клеток. Строму осаждали при 9400 g в течение 2 минут. Для надосадочной жидкости прописывали спектры.

Оставшуюся клеточную массу предварительно инкубировали в течение 30 мин в среде (Tiisonen, Nikinmaa, 1991), содержащей NaNO<sub>2</sub>: 1.5 mM, 3.0 mM и 6.0 mM. Затем готовили гемолизаты, как описано выше, и прописывали спектры.

После инкубации с NaNO<sub>2</sub> клетки дважды отмывали в среде (Tiisonen, Nikinmaa, 1991) и наблюдали на протяжении 150 мин за процессом восстановления концентрации MetHb. Спектры прописывали каждые 30 мин.

Все процедуры выполнялись при температуре 25°C. В работе применяли термошейкер МТС-100 (MIULAB, China).

**Спектральный анализ гемолизатов.** Спектры с полученных гемолизатов снимали при помощи двухлучевого спектрофотометра СПЕКС ССП-715 (ЗАО “Спектроскопические системы”, Россия). Расчет содержания OxyHb, DeoxyHb и MetHb проводили по уравнениям (Benesch *et al.*, 1973), рассчитанным для pH 7.3:

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

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

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

Результаты выражали в μM.

**Статистический анализ.** Статистические сравнения выполнены 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  $p < 0.05$ . В работе использовано 15 особей морского ерша. Обработано 58 образцов гемолизатов.

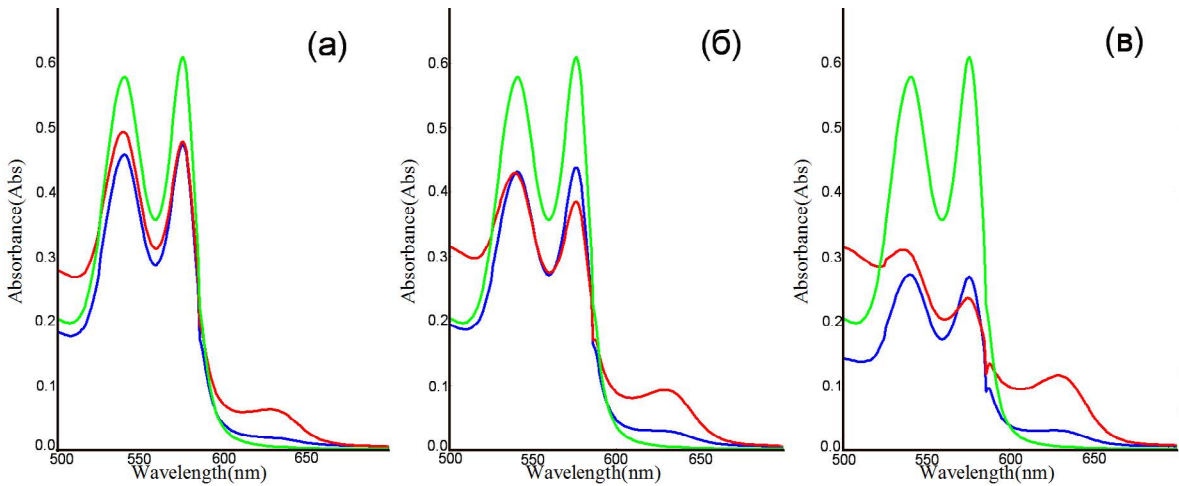
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 представлены образцы спектров гемоглобина до внесения  $\text{NaNO}_2$ , сразу после внесения данного соединения и спустя 150 мин после отмывки клеточной массы от  $\text{NaNO}_2$ . Следует обратить внимание на величину экстинкции при 630 нм (максимум поглощения MetHb). У исходных образцов она практически не была выражена. Сразу после внесения  $\text{NaNO}_2$  она существенно возросла и была пропорциональна величине нагрузки. Максимум отмечали при 6.0 mM  $\text{NaNO}_2$  – 0.11–0.12 единиц. Спустя 150 мин после отмывки эритроцитарной массы от  $\text{NaNO}_2$  величина экстинкции существенно понижалась.

Расчеты показали, что у эритроцитарных взвесей, не подверженных окислительной нагрузке,

концентрация MetHb находилась на низком уровне  $0.40 \pm 0.18 \mu\text{M}$  ( $1.38 \pm 0.68\%$ ) (табл. 1). Преинкубация в среде, содержащей нитрит, сопровождалась пропорциональным ростом уровня MetHb на фоне понижения концентрации фракций ОхуНб и ДеохуНб. После отмывки от  $\text{NaNO}_2$  и наблюдения за состоянием эритроцитарной взвеси на протяжении 150 минут процессы происходили в обратном порядке: концентрация MetHb снижалась, а ОхуНб и ДеохуНб росла.

Характер понижения уровня MetHb показан на рис. 2. Кинетика процесса хорошо описывалась уравнением экспоненциальной функции при коэффициенте детерминации ( $R^2$ ) более 0.9, что характерно для реакций ферментативного катализа (рис. 2). На рис. 3 обобщены результаты изучения влияния дозированной окислительной

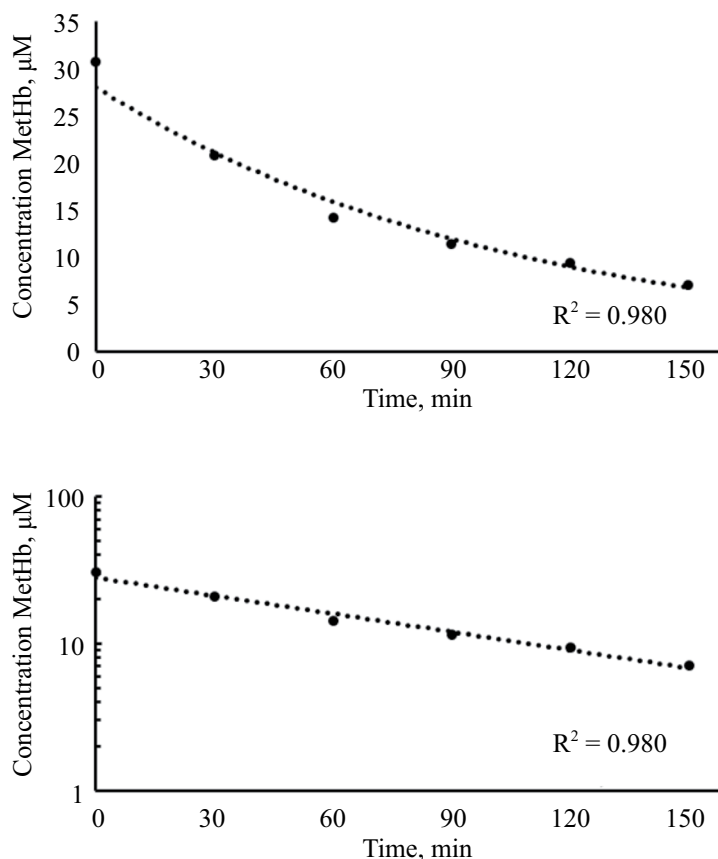


**Рис. 1.** Спектральные характеристики гемолизатов морского ерша в норме и в условиях окислительной нагрузки (а – при 1.5 mM  $\text{NaNO}_2$ ; б – при 3.0 mM  $\text{NaNO}_2$ ; в – при 6.0 mM  $\text{NaNO}_2$ ; зеленый спектр – до внесения  $\text{NaNO}_2$ ; красный спектр – сразу после внесения  $\text{NaNO}_2$ ; синий спектр – спустя 150 мин после отмывки от  $\text{NaNO}_2$ )

**Таблица 1.** Функциональное состояние гемоглобина морского ерша в условиях окислительной нагрузки

NaNO <sub>2</sub> , mM	Фракции гемоглобина					
	ОхуНб		DeoxyHb		MetHb	
	μM	%	μM	%	μM	%
0	35.99 ± 3.72	90.54 ± 0.61	2.94 ± 0.35	7.23 ± 0.30	0.40 ± 0.18	1.38 ± 0.68
Сразу после внесения NaNO <sub>2</sub>						
1.5	28.00 ± 1.71	65.48 ± 1.49	2.40 ± 0.19	5.55 ± 0.25	12.5 ± 1.2	29.0 ± 1.6
3.0	18.24 ± 1.41	49.94 ± 1.99	1.69 ± 0.14	4.49 ± 0.14	17.0 ± 1.5	45.6 ± 1.8
6.0	12.10 ± 1.20	31.90 ± 3.16	1.43 ± 0.20	3.53 ± 0.38	25.5 ± 2.7	64.6 ± 3.0
150 мин после отмывки от NaNO <sub>2</sub>						
1.5	33.28 ± 1.98	80.25 ± 1.65	2.95 ± 0.20	7.15 ± 0.32	5.38 ± 1.03	12.6 ± 1.8
3.0	22.88 ± 1.29	71.98 ± 2.00	1.87 ± 0.21	5.72 ± 0.45	7.00 ± 0.92	22.0 ± 1.8
6.0	21.14 ± 2.68	63.28 ± 2.12	1.90 ± 0.36	5.34 ± 0.52	10.7 ± 1.7	31.4 ± 2.1

Примечание: ОхуНб – оксигемоглобин; ДеохуНб – дезоксигемоглобин; MetHb – метгемоглобин



**Рис. 2.** Пример кинетической кривой восстановления MetHb после устранения окислительной нагрузки ( $\text{NaNO}_2$ ) (а – обычная шкала, б – логарифмическая шкала)

нагрузки на эритроцитарные взвеси. Как видно, характер зависимости сохранялся. Это позволило рассчитать константу скорости первого порядка  $k$  ( $25^\circ\text{C}$ ) для трех представленных выше зависимостей (рис. 3). Результаты представлены на рис. 4. Полученные значения оказались близкими, имеющиеся различия не были статистически значимыми ( $p > 0.05$ ).

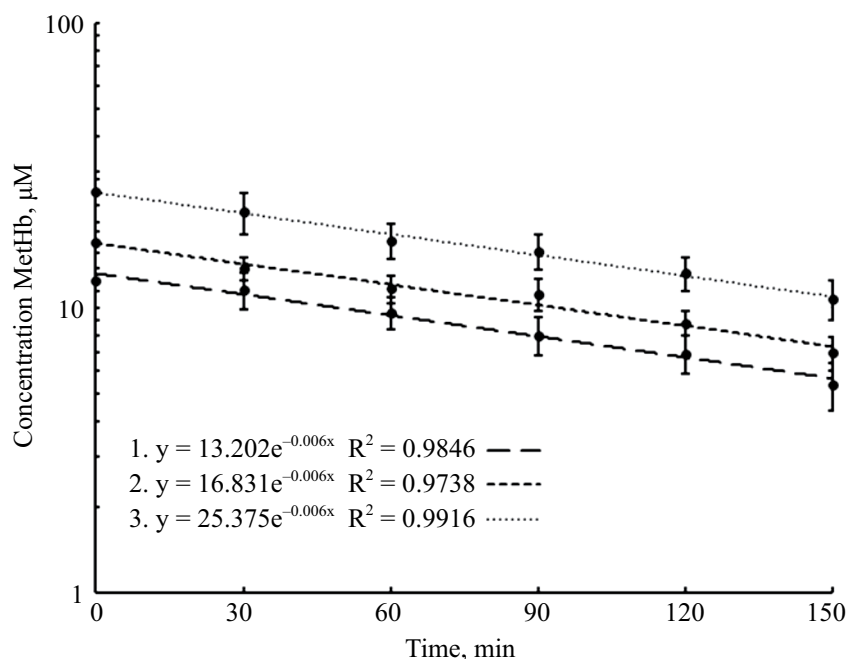
Оценку MetHb-редуктазной активности проводили с учетом концентрации гемоглобина в крови рыб. Результаты выражали в  $\mu\text{M MetHb мин}^{-1} \text{ г}^{-1} \text{ Hb}$  (рис. 5). Как видно, активность зависела от величины предшествующей окислительной нагрузки. При  $1.5 \text{ mM NaNO}_2$  значения были минимальны:  $0.84 \pm 0.10 \mu\text{M MetHb мин}^{-1} \text{ г}^{-1} \text{ Hb}$ , а при  $6.0 \text{ mM NaNO}_2$  достигали максимальных значений  $1.73 \pm 0.21 \mu\text{M MetHb мин}^{-1} \text{ г}^{-1} \text{ Hb}$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предложенная в настоящей работе процедура определения метгемоглобинредуктазной активности в ядерных эритроцитах морского ерша во многом

близка к методике, рассмотренной в работе (Jensen, Nielsen, 2018), в которой использовался  $\text{NaNO}_2$  для перевода гемоглобина в ферри-форму. Отличие состояло в том, что отмывку эритроцитарной массы проводили в среде (Tiihonen, Nikinmaa, 1991), состав которой отличался от предложенного в работе (Jensen, Nielsen, 2018). К отличиям следует отнести также применение фосфатного буфера ( $0.02 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7.3$ ) для лизиса эритроцитарной массы с последующим спектральным анализом лизатов, что позволяло определить в них долю ОхуHb, DeoxyHb и MetHb. Несмотря на различия в методиках, полученные результаты во многом оказались близкими.

Кинетика восстановления MetHb, независимо от уровня окислительной нагрузки, также описывалась константой скорости первого порядка ( $k$ ). При  $25^\circ\text{C}$  ее значения составляли  $5.75\text{--}6.45 (10^{-3}) \text{ мин}^{-1}$ , что сопоставимо с данными, полученными для форели (*Oncorhynchus mykiss*), карпа (*Cyprinus carpio*) (Jensen, Nielsen, 2018), рыбы-клоуна-ножа (*Chitala ornata*) (Gam *et al.*, 2017). Считается, что эффективность  $\text{NADH}_2$ -MetHb-редуктазы у рыб существенно выше, чем у млекопитающих (Jensen, Nielsen, 2018). В нашем случае различия не были



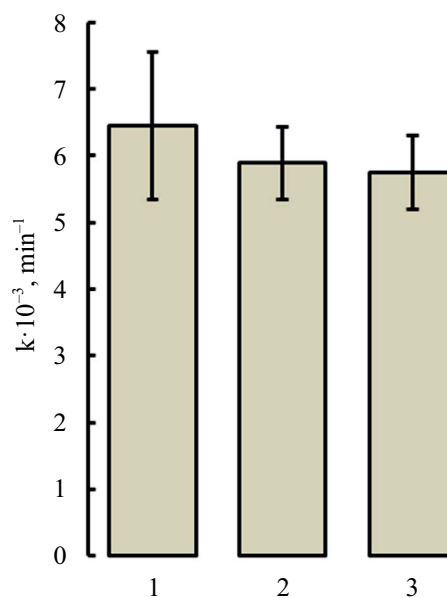
**Рис. 3.** Кинетические характеристики процесса восстановления MetHb после устранения окислительной нагрузки разной интенсивности (1 – при 1.5 mM NaNO<sub>2</sub>; 2 – при 3.0 mM NaNO<sub>2</sub>; 3 – при 6.0 mM NaNO<sub>2</sub>)

столь значительны. Они лишь немного превышали величины, зарегистрированные для овец и человека: 0,00552 и 0,00427 мин<sup>-1</sup> соответственно (39°C и 37°C) (Power *et al.*, 2007).

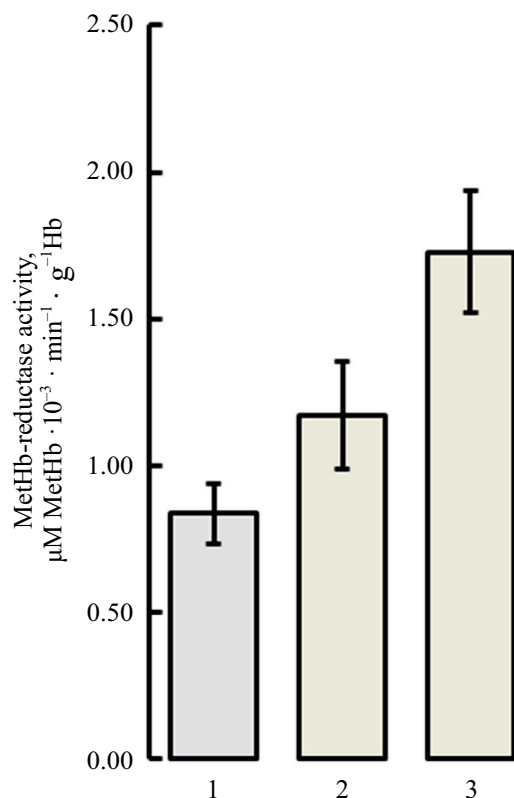
Мнение о том, что наиболее высокие значения константы скорости первого порядка ( $k$ ) отмечают у видов, толерантных к условиям внешней гипоксии (Gam *et al.*, 2017; Jensen, Nielsen, 2018), в нашем случае также не находит окончательного подтверждения. Полученные значения  $k$  для морского ерша были выше, чем у форели, но ниже, чем у карпа (Jensen, Nielsen, 2018). Вместе с тем морской ерш считается одним из наиболее устойчивых к дефициту кислорода видов в черноморском регионе. Для него зарегистрированы наиболее низкие значения критических и пороговых концентраций кислорода (Andreyeva *et al.*, 2017). Скорее при оценке величины  $k$  следует учитывать уровень окислительной нагрузки, с которой сталкивается вид в среде обитания. Как отмечалось, MetHb способен нейтрализовать H<sub>2</sub>S (Jensen, Fago, 2020). Для донных видов, к которым относится и морской ерш, это весьма актуально. Поэтому поддержание повышенных концентраций MetHb в крови данного вида оказывается функционально целесообразно, а это возможно только на фоне пониженной активности NADH<sub>2</sub>-MetHb-редуктазы, что, по-видимому, и имеет место.

При оценке метгемоглобинредуктазной активности эритроцитов следует обращать внимание на несколько составляющих. Безусловно, решающий

вклад в процесс восстановления MetHb вносит NADH-MetHb-редуктаза, которая передает электрон на цитохром b<sub>5</sub> (уравнение показано выше). При этом определенный вклад может вносить и NADPH-MetHb-редуктаза (Mansouri, Lurie, 1993).



**Рис. 4.** Константа скорости реакции ( $k$ ) первого порядка (1 – при 1.5 mM NaNO<sub>2</sub>; 2 – при 3.0 mM NaNO<sub>2</sub>; 3 – при 6.0 mM NaNO<sub>2</sub>)



**Рис. 5.** MetHb-редуктазная активность ядерных эритроцитов морского ерша при окислительной нагрузке разной интенсивности (1 – при 1.5 mM NaNO<sub>2</sub>; 2 – при 3.0 mM NaNO<sub>2</sub>; 3 – при 6.0 mM NaNO<sub>2</sub>)

Однако эффективность этого фермента должна быть более низкой, так как ресурс клеточного NADPH в большей степени сопряжен с глутатионовой системой. В восстановлении MetHb может принимать участие и антиоксидантный ферментный комплекс ядерного эритроцита. Известно, что активность ряда ферментов (пероксидазы, супероксиддисмутазы) и концентрация восстановителей (GSH) в клетках красной крови рыб превышает таковую у человека (Woo *et al.*, 2006).

В настоящей работе предпринята попытка оценить эффективность системы восстановления MetHb в зависимости от величины окислительной нагрузки. Расчет активности привязан к концентрации гемоглобина в крови (µM MetHb мин<sup>-1</sup> г<sup>-1</sup> Hb). Из полученных результатов следует, что активность системы существенно возрастала по мере увеличения окислительной нагрузки. Причину этого, по-видимому, следует связывать с долей ОхуHb в клеточных взвешах. При 6.0 mM NaNO<sub>2</sub> она была минимальна. Известно, что скорость восстановления MetHb значительно увеличивается при дезоксигенации гемоглобина (Gladwin, Kim-Shapiro, 2008). Можно допустить, что переход

клетки на анаэробный метаболизм делает более доступным NADH для NADH-MetHb-редуктазы, что повышает активность системы восстановления MetHb эритроцита в целом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренная в настоящей работе методика оценки MetHb-редуктазной активности ядерных эритроцитов позволила установить кинетические характеристики данной реакции. Показано, что зависимость хорошо описывалась уравнением экспоненциальной функции при коэффициенте детерминации ( $R^2$ ) более 0.9. Характер зависимости сохранялся при различных уровнях окислительной нагрузки. Это позволило рассчитать константу скорости первого порядка  $k$  (25 °C). У морского ерша она составила 5.75–6.45 (10<sup>-3</sup>) мин<sup>-1</sup>, что несколько превышает известные значения для млекопитающих, и было близко к данным, полученным для других видов костистых рыб. Установлено, что MetHb-редуктазная активность ядерных эритроцитов морского ерша повышалась при росте окислительной нагрузки. Допускается, что это связано с процессом деоксигенации гемоглобина, что облегчает процесс восстановления ферри-формы.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Andreyeva A. Y., Soldatov A. A., Mukhanov V. S. The influence of acute hypoxia on the functional and morphological state of the black scorpionfish red blood cells // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 2017. V. 53. P. 312–319. DOI: 10.1007/s11626-016-0111-4

- Benesch R.E., Benesch R., Yung S.* Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures // *Anal. Biochem.* 1973. V. 55. P. 245–248.  
DOI: 10.1016/0003-2697(73)90309-6
- Blair B., Barlow C., Martin E., Schumaker R., McIntyre J.* Methemoglobin determination by multi-component analysis in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) possessing unstable hemoglobin // *Methods.* 2020. V. 7. № 100836.  
doi.org/10.1016/j.mex.2020.100836
- Gam L.T.H., Jensen F.B., Damsgaard C., Huong D.T.T., Phuong N.T., Bayley M.* Extreme nitrite tolerance in the clown knifefish *Chitala ornata* is linked to up-regulation of methaemoglobin reductase activity. *Aquat. Toxicol.* 2017. V. 187. P. 9–17.  
DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.03.013
- Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B.* The functional nitrite reductase activity of the hemoglobins. *Blood.* 2008. V. 112. P. 2636–2647.  
DOI: 10.1182/blood-2008-01-115261
- Graham M.S., Fletcher G.L.* High concentrations of methemoglobin in five species of temperate marine teleosts // *J. Exp. Zool.* 1986. V. 239. P. 139–142.  
DOI: 10.1002/jez.1402390117
- 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.  
DOI: 10.1089/ars.2019.7877
- 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.  
doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.11.004
- 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. P. 7013–21.  
DOI: 10.1021/jf9006664
- Mansouri A., Lurie A.A.* Concise review: methemoglobinemia. *Am.J. Hematol.* 1993. V. 42. P. 7–12.  
DOI: 10.1002/ajh.2830420104
- Powell M.D., Perry S.F.* Respiratory and acid-base pathophysiology of hydrogen peroxide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Aquat. Toxicol.* 1997. V. 37. P. 99–112.  
doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00826-0
- Power G.G., Bragg S.L., Oshiro B.T., Dejam A., Hunter C.J., Blood A.B.* A novel method of measuring reduction of nitrite-induced methemoglobin applied to fetal and adult blood of humans and sheep // *J. Appl. Physiol.* 2007. V. 103. P. 1359–1365.  
DOI: 10.1152/japplphysiol.00443.2007
- Sajiki J., Takahashi K.* In Vitro Formation of Methemoglobin by Lipophilic Fractions in Fishes and the Causative Substance // *Eisei-Kagaku.* 1991. V. 37. P. 467–472.  
DOI: 10.1248/JHS1956.37.467
- 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.  
DOI: 10.1007/s10695-012-9677-2
- Schechter A.N.* Hemoglobin research and the origins of molecular medicine // *Blood.* 2008. V. 112. P. 3927–3938.  
DOI: 10.1182/blood-2008-04-078188
- Soldatov A.A.* Physiological Aspects of Effects of Urethane Anesthesia on the Organism of Marine Fishes // *Hydrobiol. J.* 2005. V. 41. P. 113–126.  
DOI: 10.1615/HydrobJ.v41.i1.130
- Soldatov A.A.* Cases of a Spontaneous Increase in Methemoglobin Concentration in Fish Blood during the Annual Cycle // *Inland Water Biology.* 2023. V. 16. P. 769–775.  
doi.org/10.1134/S1995082923040181
- Sztiller M., Puchala M., Kowalczyk A. et al.* The influence of ferrylhemoglobin and methemoglobin on the human erythrocyte membrane // *Red. Rep.* 2006. V. 11. P. 263–271.  
DOI: 10.1179/135100006X155012
- Tiihonen K., Nikinmaa M.* Short communication substrate utilization by carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes // *J. Exp. Biol.* 1991. V. 161. № 1. P. 509–514.  
DOI: 10.1242/jeb.161.1.509
- 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.  
doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.024
- 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.  
DOI: 10.1016/j.jembe.2006.05.013



**Methemoglobin reductase activity of nuclear erythrocytes of the sea ruff  
(*Scorpaena porcus*, Linnaeus, 1758) under normal  
and oxidative stress conditions (*In vitro* experiments)**

**A. A. Soldatov<sup>1, 2, #</sup>, N. T. Shalagina<sup>1</sup>, V. N. Rychkova<sup>1</sup>, T. A. Kukhareva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Federal Research Center "A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the South Seas of the Russian Academy of Sciences",  
Nakhimov av., 2, Sevastopol, 299011 Russia

<sup>2</sup>Sevastopol State University, Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053 Russia

<sup>#</sup>E-mail: alekssoldatov@yandex.ru

A method for evaluating the methemoglobin reductase activity of nuclear erythrocytes of teleost fish is proposed. The work was performed on a bottom marine species (*Scorpaena porcus*, Linnaeus, 1758). In an *in vitro* experiment, the erythrocyte suspension of this type was weighed in solutions with different concentrations of NaNO<sub>2</sub>, after washing from this compound, the process of methemoglobin (MetHb) reduction was studied for 150 min. The functional state of hemoglobin was judged by the results of spectral analysis. The study of the kinetics of MetHb reduction showed that the dependence was well described by the equation of an exponential function with a coefficient of determination ( $R^2$ ) greater than 0.9. The nature of the dependence remained at different levels of oxidative stress. This made it possible to calculate the velocity constant of the first order  $k$  (25 °C). In this species, it was 5.75–6.45 ( $10^{-3}$ ) min<sup>-1</sup>, which slightly exceeded the known values for mammals, and was close to the data obtained for other species of bony fish. It was found that the MetHb-reductase activity of the nuclear erythrocytes of the sea ruff increased with a rise in the oxidative load. At a concentration of 6.0 mM NaNO<sub>2</sub>, it was  $1.73 \pm 0.21 \mu\text{M MetHb min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ Hb}$ . It is assumed that this is due to the process of deoxygenation of hemoglobin.

**Keywords:** methemoglobin, oxidative load, MetHb-reductase activity, nuclear erythrocytes, *Scorpaena porcus*