

ВПЛИВ СПІРОКАРБОНУ НА СПЕКТРАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛІГАНДНИХ ФОРМ ГЕМОГЛОБІНУ КРОВІ ЛЮДЕЙ, ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ ПЕРШОГО ТИПУ, *IN VITRO*

Н. Любас^{1*}, Р. Шкрєбнюк², О. Речицький³, Н. Сибірна¹

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

²Львівський обласний державний клінічний лікувально-діагностичний
ендокринологічний центр

вул. Острозького, 1, Львів 79010, Україна

³Херсонський державний університет

вул. 40 років Жовтня, 27, Херсон 73002, Україна

e-mail: n_lubas@ukr.net

Досліджували вплив гетероциклічної сполуки спірокарбон на спектральні характеристики лігандних форм гемоглобіну HbO₂, MetHb, CNMetHb крові здорових донорів та хворих на цукровий діабет першого типу, лужну стабільність гемоглобіну, вміст метгемоглобіну. Порівняльний аналіз електронних спектрів гемоглобіну досліджуваних гемолізатів периферичної крові здорових донорів та хворих на цукровий діабет першого типу, свідчить про зростання вмісту MetHb у хворих пацієнтів. Встановлено, що після одноденної інкубації еритроцитів периферичної крові з розчином спірокарбону, достовірно знижується вміст MetHb у варіантах з цукровим діабетом 1-го типу, про що свідчать максимуми поглинання при 630 нм, тоді як у здорових пацієнтів такої кореляції не відмічається. Спостерігали незначне зміщення максимуму поглинання для варіанта досліді CNMetHb + спірокарбон. Показано зростання вмісту лужностійкого гемоглобіну за дії спірокарбону у здорових донорів та хворих на цукровий діабет першого типу. Проведені дослідження певною мірою висвітлюють специфіку впливу спірокарбону на фізико-хімічні й окремі функціональні властивості кисневотранспортного білка – гемоглобіну: стійкість до денатурації лугом, а також його спектральні характеристики за цукрового діабету першого типу.

Ключові слова: гемоглобін, лігандні форми, електронні спектри, спірокарбон, лужна стабільність.

Цукровий діабет (ЦД) – це стан хронічної гіперглікемії, що виникає внаслідок абсолютної чи відносної недостатності інсуліну, зумовлений впливом різноманітних екзогенних, імунних, ендокринних і генетичних факторів або їх поєднанням. За цукрового діабету відзначаються порушення вуглеводного, жирового і білкового обміну, які обумовлені порушеннями дії інсуліну на тканини-мішені [3].

Відомо, що периферична кров є тією системою, на якій позначається дія на організм токсичних хімічних сполук докільця, фізичних чинників, зв'язування і транспорт ендокринних метаболітів. Особливої уваги заслуговує кисневотранспортний білок гемоглобін – основний білок еритроцитів. Фактори, які визначають функціональні властивості гемоглобіну, поділяються за механізмами їхнього впливу на фактори прямої та опосередкованої дії [8, 17]. Прямий вплив здійснюють хімічні речовини, здатні до взаємодії як із глобіновим компонентом, так і з гемом, наслідком якого є конформація гемоглобіну. Це так звані ліганди: Оксиген, Гідроген, карбон оксид, органічні та неорганічні іони, які утворюють відповідні лігандні форми гемоглобіну. У крові людини можна виділити такі лігандні форми гемоглобіну: оксигемоглобін (HbO₂), карбоксигемоглобін (HbCO), метгемоглобін (MetHb),

дезоксигемоглобін (RHb), сульфгемоглобін (SHb), нітрозилгемоглобін та інші мінорні лігандні форми. У нормі оксигемоглобін становить 94–97 %, вміст карбоксигемоглобіну є 0–2 %, вміст дезоксигемоглобіну – 0–5%, вміст метгемоглобіну – 1–2 %, сульфгемоглобіну – можливі мінорні кількості [16]. Опосередкований вплив реалізується через хімічні сполуки чи фізичні фактори, що здатні змінювати характер взаємодії цього білка з лігандами через зміну умов середовища або за дії утворених специфічних метаболітів [5, 16, 18].

На сьогодні у лабораторній діагностиці, наукових дослідженнях, лікарській практиці тестуються новосинтезовані препарати, нові лікарські форми, які були би здатні не лише запобігати розвитку цукрового діабету, але й сприяти нормалізації обмінних процесів загалом. У цьому плані особливої уваги заслуговують дослідження фізико-хімічних властивостей, токсичності, способів введення в організм, механізмів впливу на ті чи інші структури організму цих новосинтезованих сполук [5]. Останніми роками, завдяки своїй високій біологічній активності, привертають увагу спіросполуки (продукти конденсації сечовини), до яких належить спірокарбон. Спірокарбон – це конденсована гетероциклічна сполука, що містить у кожній із циклічних структур по два атоми Нітрогену та чотири атоми Карбону, один із яких є спільним. За своїми фізичними властивостями ця сполука є водорозчинною, температура плавлення становить +306...307 °C [4, 5, 11].

Попередні дослідження фармакологічних властивостей спірокарбону вказують на його низьку токсичність (3000 мг/кг маси) та цінні лікарські властивості [9, 11]. Однак ці властивості вивчені мало, а практичне застосування таких препаратів потребує всебічних досліджень.

Метою даної роботи було вивчити вплив спірокарбону *in vitro* на спектральні характеристики лігандних форм гемоглобіну (HbO₂, MetHb, CNMetHb) крові, лужну стабільність гемоглобіну периферичної крові здорових донорів і хворих на цукровий діабет 1-го типу.

Матеріали та методи

У наших дослідженнях було використано органічну сполуку, синтезовану на кафедрі органічної та біологічної хімії Херсонського державного університету, яка описана вище і названа спірокарбоном [10, 12].

Для аналізів використовували цільну периферичну кров практично здорових донорів та людей, хворих на ЦД 1-го типу, які перебували на лікуванні у Львівському обласному державному клінічному лікувально-діагностичному ендокринологічному центрі.

Кров відбирали загальноприйнятим методом із ліктрової вени з використанням гепарину як антикоагулянта. Еритроцити відділяли від плазми шляхом центрифугування при 500 g та відмивали від плазми крові ізотонічним розчином NaCl (0,150 M). Процедуру відмивання повторювали 5 разів. Гемоглобін виділяли за методикою Драбкіна [17]. Концентрацію гемоглобіну визначали за методом Кушаковського [10]. Вміст лужностабільного гемоглобіну визначали за методом Зінгера в модифікації Н. О. Сибірної [12].

Для спектроскопічних аналізів використовували гемоглобін в оксиформі (HbO₂), метформі (MetHb) та у ціанметформі (CNMetHb). Для вивчення впливу спірокарбону на досліджувані параметри гемоглобіну еритроцитарну масу інкубували з розчином цієї речовини у співвідношенні 1:3 протягом 1 год. Вихідна концентрація розчину спірокарбону – 1 мг/мл. Після інкубації проводили центрифугування при 500 g для відділення еритроцитарної маси від інкубаційного розчину. Гемоліз еритроцитів проводили дистильованою водою у співвідношенні 1:3, для осадження уламків еритроцитарних мембран центрифугували при 1500 g. Виділений таким методом гемоглобін використовували для подальших досліджень. Електронні спектри записували на спектрофотометрі ULAB у діапазоні довжин хвиль 450–750 нм.

Результати обробляли статистично з використанням критерію Стьюдента. Вірогідною вважалася різниця при P<0,05.

Результати і їхнє обговорення

Нами проведено порівняльні спектроскопічні дослідження лігандних форм гемоглобіну

крові здорових донорів і хворих на цукровий діабет: окси-, мет-, ціанметформи (HbO_2 , MetHb, CNMetHb) за дії препарату спірокарбону в діапазоні довжин хвиль 450–750 нм. Структурний стан гемоглобіну оцінювали за характеристичними значеннями спектрів поглинання.

Аналіз електронних спектрів оксигемоглобіну не засвідчив змін у розміщенні характеристичних максимумів (смуг) поглинання у хворих на цукровий діабет пацієнтів порівняно з гемоглобіном здорових донорів (рис. 1).

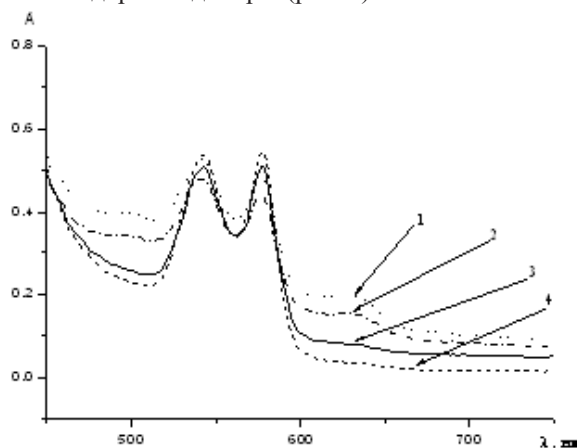


Рис. 1. Електронні спектри оксигемоглобіну (HbO_2) крові здорових донорів і хворих на цукровий діабет 1 типу *in vitro*: 1 – діабет; максимуми – 541,7 нм і 576,6 нм; 2 – діабет + спірокарбон; максимуми – 540,7 нм і 576,6 нм; 3 – контроль; максимуми – 541,7 нм і 576,6 нм; 4 – контроль + спірокарбон; максимуми – 541,7 нм і 576,6 нм

Нами виявлено, що електронні спектри гемоглобіну хворих на цукровий діабет характеризуються відмінностями у поглинанні в діапазоні довжин хвиль 500 нм і 630 нм, які відповідають метгемоглобіну. У варіантах дослідження діабет + спірокарбон спостерігається зниження поглинання при зазначених довжинах хвиль. Отримані результати свідчать, що спірокарбон призводить до зниження вмісту MetHb у досліджуваних гемолізатах периферичної крові.

Для уточнення впливу спірокарбону на утворення MetHb ми провели експерименти з переведенням отриманого розчину оксигемоглобіну в метформу. Електронні спектри зразків гемоглобіну у метформі свідчать, що спірокарбон запобігає утворенню MetHb у варіантах із цукровим діабетом 1-го типу, про що свідчать максимуми поглинання при 630 нм (рис. 2). У здорових пацієнтів такої кореляції не відмічається, при 630 нм максимуми поглинання дослідних зразків - контроль MetHb та контроль MetHb + спірокарбон – накладаються.

Наступний етап роботи полягав у дослідженні спектральних характеристик CN-MetHb периферичної крові здорових донорів, хворих на ЦД 1-го типу, та за дії спірокарбону *in vitro*. На рис. 3 представлені електронні спектри CNMetHb периферичної крові здорових донорів і хворих на цукровий діабет 1-го типу без дії спірокарбону та після інкубації еритроцитів зі спірокарбоном.

Отримані результати свідчать, що спектри гемоглобіну крові здорових донорів у ціанметформі характеризуються максимумом поглинання при 541,2 нм; варіанти дослідження контроль CNMetHb + спірокарбон максимум поглинання – 541,1 нм. Аналіз електронних спектрів CNMetHb крові хворих на цукровий діабет 1-го типу показав, що для CNMetHb максимум поглинання становить 540,2 нм; для варіантів діабет CNMetHb + спірокарбон максимум поглинання – 541,1 нм. Ми спостерігали незначне зміщення максимуму поглинання для варіанта дослідження CNMetHb + спірокарбон.

Отримані результати дають привід для розширених пошуків методів виявлення впливу використовуваної сполуки на гемоглобін за цукрового діабету. Доречно припустити,

що використаний у дослідженнях препарат може взаємодіяти з білковим компонентом гемоглобіну, не впливаючи на оточення гема та його структуру. У такому разі спектральні характеристики гемоглобіну у видимій ділянці спектра не будуть суттєво змінюватися.

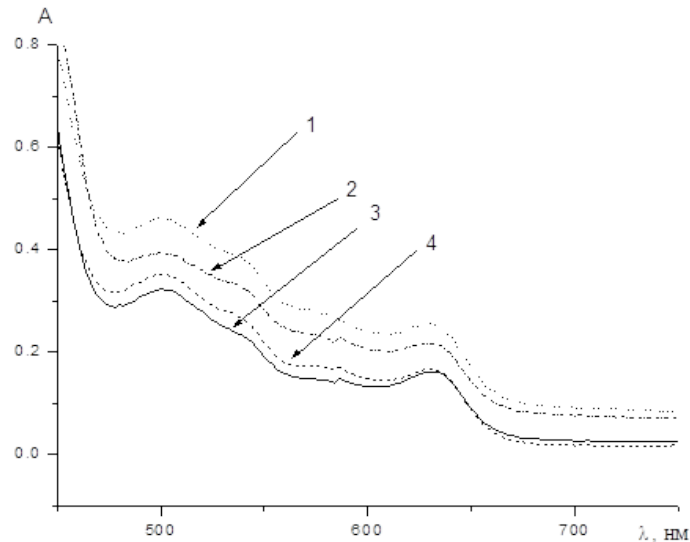


Рис. 2. Електронні спектри метгемоглобіну (MetHb) периферичної крові здорових та хворих на цукровий діабет 1-го типу донорів з додаванням препарату спірокарбону *in vitro*: 1 – діабет MetHb; максимум поглинання – 500,2 нм; 631,9 нм; 2 – діабет MetHb + спірокарбон; максимум поглинання – 499,1 нм; 630,4 нм; 3 – контроль MetHb; максимум поглинання – 501 і 630,2 нм; 4 – контроль MetHb + спірокарбон - максимум поглинання – 502,0 нм і 630,4 нм

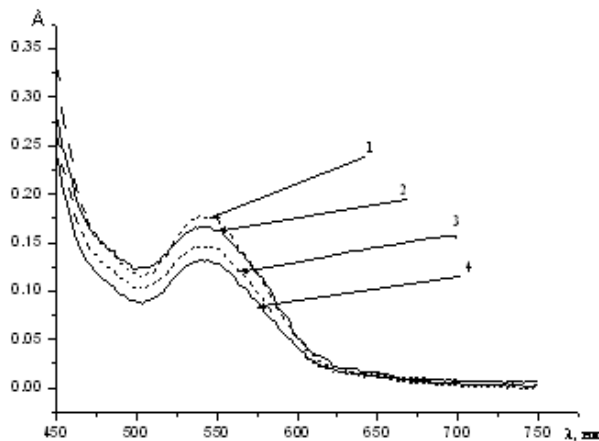


Рис. 3. Електронні спектри ціанметгемоглобіну (CNMetHb) крові здорових донорів і хворих на цукровий діабет 1-го типу з додаванням препарату спірокарбону *in vitro*: 1 – діабет CNMetHb; максимум поглинання – 540,2 нм; 2 – діабет CNMetHb + спірокарбон; максимум поглинання – 541,1 нм; 3 – контроль CNMetHb; максимум поглинання – 540,2 нм; 4 – контроль CNMetHb + спірокарбон; максимум поглинання – 541,1 нм

Результати попередніх і теперішніх досліджень дають змогу припустити, що препарат спірокарбон завдяки своїм хімічним властивостям (оскільки він є конденсованою гетероциклічною сполукою і містить 4 метильні гідрофобні групи), може посилювати

гідрофобність глобули гемоглобіну, змінюючи кількість і взаємозалежне розміщення у ньому гідрофобних груп, екранувати їх, понижуючи або, в окремих випадках, підвищуючи гідратацію молекули і в такий спосіб впливати на його стійкість до лугу, здатність взаємодіяти з іншими лігандами [7].

Подальші наші дослідження були спрямовані на визначення вмісту лужнотійкого гемоглобіну в гемолізатах крові здорових донорів і хворих на цукровий діабет 1 типу та за дії спірокарбону. З'ясувалося, що за дії спірокарбону вміст лужнотійкого гемоглобіну збільшується в гемолізатах як здорових донорів? так і хворих на ЦД 1-го типу. У здорових донорів цей показник зростає у 2,5 рази, а у хворих - у 2 рази (див. таблицю).

Вміст лужнотійкого гемоглобіну в гемолізатах крові здорових донорів (n = 6)
та хворих на цукровий діабет 1-го типу (n = 8) за дії спірокарбону (M±m), %

Варіанти дослідів	Вміст лужнотійкого гемоглобіну
Гемолізати крові здорових донорів	1,54 ± 0,02
Гемолізати крові здорових донорів після інкубації еритроцитів зі спірокарбоном	3,79 ± 0,18***
Гемолізати крові хворих на цукровий діабет 1 типу донорів	2,20 ± 0,05***
Гемолізати крові хворих на цукровий діабет 1 типу донорів після інкубації еритроцитів зі спірокарбоном	4,56 ± 0,18***

Примітка: * – різниця щодо контролю вірогідна, p < 0,05; *** – p < 0,001

Із даних літератури відомо, що денатурація гемоглобіну визначається, в основному, іонізацією амінокислотних залишків, недоступних для розчинника, які перебувають на поверхні $\alpha_1\beta_1$ -контактів поліпептидних ланцюгів. За умов гідратації відбувається розгортання димерів до мономерів. У глобіну гемоглобіну людини в оточенні $\alpha_1\beta_1$ -контактів містяться амінокислоти цистеїн і тирозин. Вважають, що зміна іонізації бокових груп цих амінокислотних залишків є причиною зростання стійкості до денатурації лугом [15, 18, 19].

Проведені дослідження певною мірою висвітлюють специфіку впливу спірокарбону на фізико-хімічні й окремі функціональні властивості кисневотранспортного білка – гемоглобіну: стійкість до денатурації лугом, а також його спектральні характеристики за цукрового діабету першого типу. Однак отримані результати не дають однозначних підстав стверджувати, що досліджувані препарати не будуть суттєво впливати на спорідненість гемоглобіну до кисню – на його кисневотранспортну функцію. Вивчення цього питання є предметом наших подальших досліджень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білий О. І., Дудок К. П., Лук'янець В. М. Визначення вмісту гемоглобіну та його лігандних форм у цільній крові за методом абсорбційної спектроскопії: метод. вказівки. Львів: Вид. центр ЛДУ ім. І. Франка, 1998. 12 с.
2. Бубнова М. М., Мартынова М. И. Сахарный диабет у детей. М.: Медгиз, 1963. 192 с.
3. Дудок К. П., Білий Р. О., Федорович А. М. Дослідження лігандних форм гемоглобіну методом електронної оптичної спектроскопії // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2002. Т. 29. С. 32–36.
4. Дудок К. П., Федорович А. М., Дудок Т. Г. та ін. Вплив спірокарбону та похідних піролопиримідиніонів на фізико-хімічні характеристики лігандних форм гемоглобіну *in vitro* // Біологічні студії / *Studia Biologica*. 2009. Т. 3. № 2. С. 23-34.
5. Ересько В., Речицький А., Бойко Р. и др. Синтез и фармакологические свойства 1,6-замещенных-4-арил-2,3,4,5,6,7-гексагидро-(1H)пирроло-[3,4-d] пиримидиндионов-2,5 // Физиологически активные вещества. 1995. Вып. 26. С. 27–30.
6. Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньшова Е. Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспект. М.: Маик, 2001. 343 с.

7. *Ильина Л. В., Вережка С. В.* Лигандиндуцированное структурирование полиреактивных иммуноглобулинов // Укр. біохім. журнал. 2003. Т. 75. № 6. С. 56–61.
8. *Иржак Л. И.* Гемоглобины и их свойства. М.: Наука, 1975. 239 с.
9. *Кошелева В. Д., Бойко Р. Т., Ересько В. А.* Влияние спирокарбона на гипоталамо-гипофизарную нейросекреторную систему (ГНС) растущих животных // Материалы Всеукр. науч.-практ. конф. (Херсон, 1994). С. 103.
10. *Кушаковский И. С.* Клинические формы повреждения гемоглобина. Л., 1968. 230 с.
11. *Рєчицький О. Н., Єресько В. А., Дудок К. П., Сибїрна Н. О.* Дослідження впливу „спирокарбону” на структурно-функціональний стан еритроцитарних мембран периферичної крові здорових людей та хворих на алкоголізм // Теорія і практика сучасного природознавства: матеріали III Всеукр. наук.-практ. конф. (Херсон, 2007). Херсон, 2007. С. 47–52.
12. *Сибїрна Н. О., Великий М. М.* Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові. метод. посіб. Львів: Вид. центр ЛДУ ім. І. Франка, 72 с.
13. *Сибїрна Н., Люта М., Бурда В.* та ін. Вплив системи L-аргїнін:NO на динаміку вмісту лігандних форм та спектральні характеристики гемоглобіну за умов цукрового діабету 1-го типу // Медична хімія. 2004. Т. № 3. С. 26–29.
14. *Старикович Л. С., Дудок К. П., Сибїрна Н. О.* та ін. Дослідження впливу спірокарбону на фізико-хімічні й біохімічні характеристики еритроцитів щурів у нормі та за алкогольної інтоксикації // Медична хімія. 2009. Т. 11. № 1. С. 58–62.
15. *Стародуб Н. Ф., Артюх В. П.* Содержание SH-групп в отдельных фракциях гемоглобина крыс // Укр. биохим. журнал. 1978. Т. 50. № 1. С. 76–80.
16. *Сухомлинов Б. Ф., Тиунов Л. А., Лукьянец В. М.* и др. Спектрофотометрическое исследование системы лигандных форм гемоглобина в одной пробе крови // Вестн. ЛГУ им. И. Франко. Биология. 1988. № 18. С. 36–42.
17. *Drabkin D. L.* The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species // J. Biol. Chem. 1946. Vol. 164, № 2. P.703–723.
18. *Perutz M. F.* Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron // Ann. Rev. Biochem. 1979. Vol. 48. P. 327–386.
19. *Perutz V. F.* Mechanism of denaturation of hemoglobin by alkali // Ann. Rev. Biochem. 1974. Vol. 247. P. 341–344.

Стаття: надійшла до редакції 27.07.16
доопрацьована 2.09.16
прийнята до друку 5.09.16

IMPACT OF SPIROCARBON ON SPECTRAL CHARACTERISTICS OF LIGAND FORMS OF HEMOGLOBIN IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES *IN VITRO*

N. Lyubas¹, R. Shkrebnyuk², O. Rechytskyi³, N. Sybirna¹

¹Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine

²Lviv Regional State Clinical Diagnostic Endocrinology Center
1, Ostrozky St., Lviv 79010, Ukraine

³Kherson State University
27, 40 Years of October St., Kherson 73002, Ukraine
e-mail: n_lubas@ukr.net

Investigated the effect of heterocyclic spirocarbon compounds on the spectral characteristics of ligand forms of hemoglobin HbO₂, MetHb, CNMetHb in the blood of healthy donors and type 1 diabetes patients, and the alkaline stability of hemoglobin, contents MetHb. Comparative analysis of the electronic spectra of hemoglobin hemolysate of the

peripheral blood of healthy donors and patients with type 1 diabetes show an increase in the content MetHb patients. We saw that after one hour incubation of erythrocytes with a solution spirokarbon, significantly reduced the content MetHb in versions with diabetes type 1, as evidenced absorption maxima at 630 nm, whereas in healthy patients such correlation is not noticed. There was a slight shift of the maximum absorption experiment version CN-MetHb + spirokarbon Demonstrated the increase of alkaline-resistant hemoglobin content with spirocarbon treatment for healthy donors and patients with type 1 diabetes. Conducted researches some extent highlight the specific impact on spirokarbon physicochemical and some functional properties protein - hemoglobin, resistance to alkali denaturation, and its spectral characteristics of the patients with type 1 diabetes. The carried out researches in a certain degree of specificity of the effect of cover spirokarbon on physico - chemical and functional properties of individual oxygen transport protein - hemoglobin, to denaturation by alkali resistance, as well as its spectral characteristics at a diabetes of the first type.

Keywords: hemoglobin, ligand forms, electronic spectra, spirocarbon, alkaline resistance.

ВЛИЯНИЕ СПИРОКАРБОНА НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛИГАНДНЫХ ФОРМ ГЕМОГЛОБИНА *IN VITRO* КРОВИ ЛЮДЕЙ, БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ПЕРВОГО ТИПА

Н. Любас^{1*}, Р. Шкробнюк², О. Речицкий³, Н. Сибирная¹

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

²Львовский областной государственный клинический лечебно-диагностический эндокринологический центр
ул. Острожского, 1, Львов 79010, Украина

³Херсонский государственный университет
ул. 40 лет Октября, 27, Херсон 73002, Украина
e-mail: n_lubas@ukr.net

Исследовано влияние гетероциклического соединения спирокарбона на спектральные характеристики лигандных форм гемоглобина HbO₂, MetHb, CN-MetHb крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом 1 типа, щелочную стабильность гемоглобина. Сравнительный анализ электронных спектров гемоглобина исследуемых гемолизатов периферической крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом 1-го типа свидетельствует об увеличении содержания MetHb у больных пациентов. Установлено, что после одночасовой инкубации эритроцитов с раствором спирокарбона достоверно понижается уровень MetHb у вариантов с сахарным диабетом 1-го типа. О чем свидетельствуют максимумы поглощения при 630 нм, тогда как у здоровых пациентов такой корреляции не отмечается. Наблюдали незначительное смещение максимума поглощения для варианта опыта CNMetHb + спирокарбон. Показано увеличение содержания лужностабильного гемоглобина при действии спирокарбона в периферической крови у здоровых доноров и у больных сахарным диабетом 1-го типа. Проведённые исследования в определённой степени освещают специфику влияния спирокарбона на физико - химические и отдельные функциональные свойства кислородтранспортного белка – гемоглобина, устойчивость к денатурации щелочью, а также его спектральные характеристики при сахарном диабете первого типа.

Ключевые слова: гемоглобин, лигандные формы, электронные спектры, щелочная стабильность.