

## ВПЛИВ L-АРГІНІНУ ТА N $\Omega$ -НІТРО-L-АРГІНІН МЕТИЛОВОГО ЕФІРУ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Н. Єфіменко\*, Н. Сибірна

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: nataliya\_yefimenko@mail.ru*

За умов експериментальної алкогольної інтоксикації (АІ) у щурів виявлено зниження показників альціаніндукованої агрегації еритроцитів, що узгоджується зі зниженням загального від'ємного заряду глікокаліксу їхніх мембран. Було показано, що вміст загальних мембранозв'язаних сіалових кислот за умов АІ знижується на 36,4 % порівняно з контролем. Споживання тваринами контрольної групи L-аргініну та N $\omega$ -нітро-L-аргінін метилового ефіру (L-NAME) не викликало достовірних змін цього показника щодо контролю. За умов АІ вміст сіалових кислот зростає на 28,2 % за споживання L-аргініну та знижується на 13,8 % за споживання L-NAME. Вміст протеїнзв'язаних сіалових кислот за умов АІ знижується на 31 % порівняно з контролем. За патології вміст ліпідзв'язаних сіалових кислот зменшується удвічі щодо контрольних варіантів. За споживання алкоголізованими тваринами субстрату NO-синтази (NOS) – L-аргініну показано його нормалізуючий вплив на функціональний стан еритроцитів. Споживання щурами за умов АІ неселективного інгібітора цього ферменту – L-NAME, який є структурним аналогом L-аргініну, не супроводжувалося достовірними змінами рівня альціаніндукованої агрегації та вмісту сіалових кислот щодо показників алкоголізованих тварин.

*Ключові слова:* алкогольна інтоксикація, еритроцити, агрегація.

Регуляція метаболізму в організмі та його адаптаційна реорганізація у відповідь на вплив різних чинників значною мірою пов'язані з фізико-хімічними процесами, що відбуваються в мембрані клітини, це стосується і еритроцитів [3, 13]. Зміна біофізичних властивостей еритроцитів відіграє важливу роль у виникненні патології периферичного кровообігу. За фізіологічної норми зовнішній шар глікокаліксу поверхні мембрани еритроцитів від'ємно заряджений, що дає клітинам змогу відштовхуватися одна від одної. Це забезпечує виконання ними важливих фізіологічних функцій: взаємодія клітин між собою, газообмін, адсорбція амінокислот, білків і продуктів їхнього розпаду, антигенів, антитіл, ферментів тощо [5]. Ефект такого електророзподілу перешкоджає склеюванню еритроцитів і створює умови для їхнього обертання навколо власної осі. Електричний заряд поверхні клітини відносно постійний у нормі, однак залежить від вмісту у структурі мембран вуглеводних компонентів глікокон'югатів, а саме – сіалових кислот, оскільки вони на 60 % визначають сумарний негативний поверхневий заряд клітини. Зміна кількості сіалових кислот на поверхні клітини призводить до зміни їхніх адгезивних і агрегаційних властивостей [6].

Залежно від етіології захворювання, клінічна картина є досить різноманітною. За умов алкогольної інтоксикації інформативними можуть бути такі дослідження структурно-функціональних змін, які виникають у біологічних мембранах унаслідок впливу етанолу та метаболітів його окиснення. Унаслідок окисної модифікації ліпідних і білкових молекул мембран клітинних компонентів крові (еритроцитів, тромбоцитів) за АІ відбувається їхня біомеханічна дестабілізація, що визначає реологічний статус крові.

Останніми роками наукова література поповнюється дедалі більшою кількістю робіт, які стосуються ролі нітрогену монооксиду – NO як поліфункціонального регулятора структурно-метаболических процесів в організмі [1, 7]. Для моделювання NO-залежної регуляції структурно-функціонального стану еритроцитів за AI було обрано умовно незамінну амінокислоту L-аргінін як субстрат NOS для синтезу нітрогену оксиду (NO) та неспецифічний інгібітор цього ензиму – L-NAME.

На основі отриманих раніше результатів ми припустили, що введення етанолу за споживання L-аргінину або L-NAME може призвести до зміни поверхневої структури рецепторного апарату мембран еритроцитів і супроводжуватиметься зміною їхніх агрегаційних властивостей [4].

Метою цієї роботи було дослідити вплив L-аргінину або L-NAME на структурно-функціональний стан мембран еритроцитів щурів за умов експериментальної алкогольної інтоксикації.

### Матеріали та методи

Дослідження проводили на самцях нелінійних безпородних щурів з початковою масою 200-300 г, попередньо відібраних за допомогою “двопляшкового методу”, для виявлення їхньої схильності до етанолу [2]. Тварини перебували у стандартних умовах віварію, з дотриманням етичних норм проведення експериментальних досліджень згідно з “Загальними принципами роботи на тваринах”, затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) та Законом України “Про захист тварин від жорстокого поводження” від 26.02.2006 р.

Тварини були розподілені на 6 груп: *перша* – контроль (К), *друга* – контрольні тварини, яким вводили L-аргінін (К + L-аргінін), *третья* – контрольні тварини, яким вводили L-NAME (К + L-NAME), *четверта* – тварини з експериментальною алкогольною інтоксикацією (AI), *п'ята* – тварини з AI, яким вводили L-аргінін (AI + L-аргінін), *шоста* – тварини з AI, яким вводили L-NAME (AI + L-NAME).

Модель експериментальної AI у щурів створювали щоденним введенням 20 % розчину етанолу (EtOH) *per os* протягом 14 діб за допомогою зонду з медичної сталі з розрахунку 6 г на 1 кг маси тіла.

Контрольним щурам вводили еквівалентний за калорійністю розчин глюкози у дозі 10,2 г/кг, для збереження енергетичної цінності раціону. Такий напрям узгоджується з рекомендаціями ВООЗ та ФАО (Food and agriculture organization of the united nations) вважати EtOH як енергетично багату сполуку при оцінці енергетичної цінності [9].

Для дослідження ефективності функціонування L-аргінін/NO-системи за умов AI групи контрольних і алкоголізованих щурів з моменту індукції AI з питною водою споживали розчин основного субстрату NOS – L-аргінін (“Reanal”, Угорщина) з концентрацією 1,25 г/л, у розрахунку 125 мг/кг маси тіла тварини; інші тварини споживали розчин неселективного інгібітора NOS — L-NAME (“Sigma”, США) з концентрацією 70 мг/л, у розрахунку 7 мг/кг маси тварини. Використовували розчини тварини отримували 2 тижні зі щоденним моніторингом і корекцією спожитої речовини відповідно до зміни ваги.

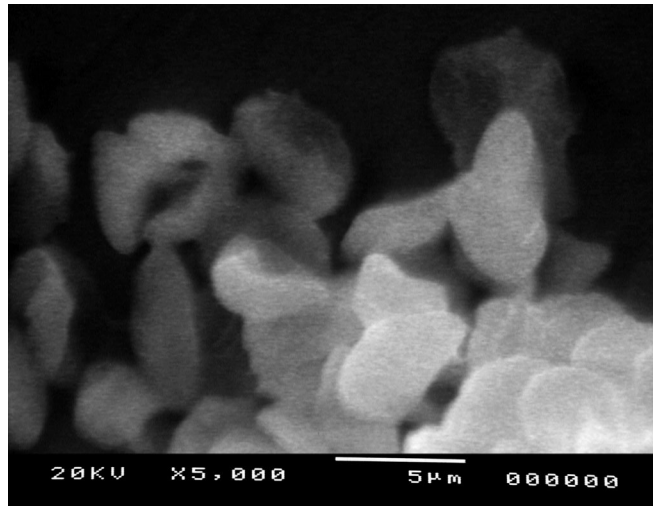
Агрегаційну здатність еритроцитів вивчали турбідиметричним методом [8] за допомогою двоканального лазерного аналізатора агрегації “LA 230” (НВФ “БИОЛА”, Росія) у суспензії відмитих еритроцитів ( $4,2 \times 10^6$  клітин в 1 мл) при перемішуванні зі швидкістю 200 об/хв (+37 °C). Максимальний ступінь агрегації визначали як максимальне значення світлопропускання після додавання індуктора і виражали у відсотках. Як індуктор агрегації використовували альціановий синій у концентрації 7 мкг/мл. Загальний вміст сіалових

кислот у мембранах еритроцитів визначали методом Ворена [10, 16]. Статистичну обробку результатів здійснювали, використовуючи t-критерій Стьюдента.

### Результати досліджень і їхнє обговорення

Проведені нами дослідження засвідчили високу спонтанну агрегацію еритроцитів крові щурів у варіантах з АІ порівняно з контрольними (див. рисунок).

За допомогою електронної скануючої мікроскопії зафіксовано невпорядковані розрихлені еритроцитарні скупчення, вміст клітин яких неможливо полічити.



Спонтанна агрегація еритроцитів периферичної крові щурів за умов АІ

Однак у результаті дослідження альціаніндукованої агрегації еритроцитів за умов АІ показано зниження максимального ступеня агрегації на 41,7 %, порівняно з контролем, при цьому зменшуються розміри агрегатів приблизно удвічі і зростає час початку агрегації на 18,8 % (табл. 1). Ці дані свідчать про зміну фіксованого поверхневого заряду еритроцитів у щурів за умов АІ.

Таблиця 1

Показники альціаніндукованої агрегації еритроцитів у контролі та за умов алкогольної інтоксикації ( $M \pm m$ ;  $n = 8-10$ )

| Індуктор агрегації | Варіант дослідження | Максимальний розмір агрегату, у.о. | Час початку агрегації, с | Ступінь агрегації, % |
|--------------------|---------------------|------------------------------------|--------------------------|----------------------|
| Альціановий синій  | Контроль            | 3,48±0,37                          | 80±5,6                   | 24±1,47              |
|                    | К + L-аргінін       | 2,98±0,2                           | 92±6,4                   | 22±0,83              |
|                    | К + L-NAME          | 3,8±0,3                            | 73±2,4                   | 27,3±0,35            |
|                    | АІ                  | 1,7±0,1*                           | 95±3,7*                  | 14±1,4*              |
|                    | АІ+ L-аргінін       | 2,56±0,1**                         | 89±1,2**                 | 18±0,9**             |
|                    | АІ + L-NAME         | 2±0,23                             | 97±1,55                  | 17±1,3               |

**Примітки:** \* - різниця вірогідна, порівняно з показниками в контролі,  $P < 0,05$ ; \*\* - різниця вірогідна, порівняно з показниками за умов АІ,  $P < 0,05$ .

Введення L-аргініну контрольним тваринам не призводило до достовірно відмінних значень, але споживання алкоголізованими щурами L-аргініну супроводжувалося підвищенням альціаніндукованої агрегації.

При споживанні контрольними й алкоголізованими щурами розчину L-NAME не відмічено вірогідних змін агрегаційних властивостей.

Відомо, що в організмі тварин і людини постійно відбуваються процеси відновлення поверхневої архітектури клітин, а також рівномірного ремоделювання тканин, враховуючи цитоскелетні структури сполучної тканини. Процеси відновлення стосуються сироваткових і тканинних глікопротеїнів та гліколіпідів, які надають негативного заряду поверхні клітин. Зміна поверхневого заряду еритроцитів може бути результатом або екранування негативно заряджених поверхневих залишків, або перерозподілу внеску окремих груп у значення електрокінетичного потенціалу.

Зниження альціаніндукованої агрегації еритроцитів у щурів за умов щоденного введення однакової концентрації алкоголю свідчить про те, що EtOH та його токсичні метаболіти, зокрема АцА, можуть модифікувати клітинну мембрану або безпосередньо, або шляхом десіалізації зовнішньої поверхні мембран. Однак при споживанні алкоголізованими щурами розчину L-аргініну спостерігається збільшення альціаніндукованої агрегації. Еритроцити характеризуються наявністю транспортера катіонних амінокислот CAT1 (від англ. Cationic Aminoacid Transporter 1), який опосередковує транспорт L-аргініну, L-орнітину, L-гістидину та L-лізину з позаклітинного простору [14]. На нашу думку, від процесу десіалізації зовнішньої поверхні мембран захищає виражена катіонна властивість гуанідинової групи L-аргініну, яка здатна до комплексоутворення, протонування й утворення міжмолекулярних зв'язків з альдегідами [11].

Для визначення причини низької альціаніндукованої агрегаційної здатності еритроцитів за умов АІ ми визначали вміст мембранозв'язаних сіалових кислот цих клітин. Нами було показано, що вміст загальних мембранозв'язаних сіалових кислот за умов АІ знижувався на 36,4 % порівняно з контролем. Споживання тваринами контрольної групи L-аргініну та L-NAME не викликало достовірних змін цього показника щодо контролю. Натомість за умов АІ вміст сіалових кислот зростав на 28,2 % за споживання L-аргініну та знижувався на 13,8 % за споживання L-NAME щодо АІ (табл. 2).

Найсуттєвіші зміни щодо вмісту сіалових кислот спостерігали у ліпідній фракції мембран. За патології вміст ліпідзв'язаних сіалових кислот зменшується у 2,36 рази щодо контрольних варіантів. У контролі при введенні L-аргініну та L-NAME не спостерігали достовірних відмінностей. У варіантах зі споживанням L-NAME алкоголізованими щурами цей показник незначно зменшувався, але за дії L-аргініну вміст ліпідзв'язаних сіалових кислот зростав на 27,2 %.

Вміст протеїнзв'язаних сіалових кислот за умов АІ знижується на 31 % порівняно з контролем. У контрольних щурів при введенні досліджуваних чинників кількісний вміст протеїнзв'язаних сіалових кислот мембран еритроцитів суттєво не змінюється. Споживання тваринами L-аргініну за АІ супроводжувалося зростанням вмісту протеїнзв'язаних сіалових кислот на 28,5 %, тоді як споживання L-NAME за АІ сприяло ще більшому зниженню їхнього вмісту (на 14,3 %) (табл. 2).

Отримані результати вказують саме на десіалювання еритроцитів за умов АІ. Зниження негативного заряду супроводжується підвищенням природної агрегації еритроцитів, що свідчить про порушення реологічних властивостей крові (змін в'язкості і структури крові) та, як наслідок, ініціації процесу тромбоутворення.

Структура вуглеводних компонентів мембрани є сигналом для розпізнавання старіючих або пошкоджених еритроцитів для подальшого видалення їх із кров'яного руслу. Пошкоджені еритроцити розпізнаються рецепторами макрофагів, лігандом до яких є сіаловмісні олігосахаридні ланцюги кластеризованого або агрегованого глікофору [15].

Таблиця 2

Вміст мембранозв'язаних сіалових кислот еритроцитів щурів у контролі,  
за умов АІ та при введенні L-NAME або L-аргініну (M±m; n=6-8)

| Групи   | К          | К +<br>L-аргінін | К +<br>L-NAME | АІ         | АІ +<br>L-аргінін | АІ +<br>L-NAME |
|---|------------|------------------|---------------|------------|-------------------|----------------|
| Загальні сіалові кислоти (TSA), мкг/мг протеїну         | 13,83±0,78 | 13,02±0,59       | 13,19±0,73    | 8,79±0,37* | 11,27±0,45**      | 7,58±0,43**    |
| Ліпідзв'язані сіалові кислоти (LASA), мкг/мг протеїну   | 2,95±0,15  | 2,69±0,11        | 2,75±0,23     | 1,25±0,09* | 1,59±0,08**       | 1,13±0,08      |
| Протеїнзв'язані сіалові кислоти (PASA), мкг/мг протеїну | 10,88±0,66 | 10,34±0,55       | 10,43±0,89    | 7,54±0,40* | 9,69±0,45**       | 6,46±0,39**    |

**Примітки:** \* - різниця вірогідна, порівняно з показниками в контролі, P<0,05; \*\* - різниця вірогідна, порівняно з показниками за умов АІ, P<0,05.

Десіалювання вуглеводних компонентів призводить до захоплення еритроцитів галактозоспецифічними лектинами в печінці та видалення їх із кров'яного русла, таким чином скорочуючи час їхнього життя в організмі [12], що підтвердило наші попередні спостереження про перерозподіл різновікових популяцій еритроцитів і відмінність стану еритроцитарних мембран за умов АІ та під впливом досліджуваних чинників. Виходячи з аналізу отриманих експериментальних даних, дослідження агрегаційної здатності еритроцитів із використанням як індуктора агрегації альціанового синього, можна зробити висновок, що за АІ знижується загальний негативний поверхневий заряд. Оскільки загальний вміст сіалових кислот визначається кількістю вуглеводних компонентів у складі як глікопротеїнів, так і гліколіпідів, то зниження цього показника у наших дослідженнях зумовлене втратою кількості сіалових кислот у складі як гліколіпідних, так і глікопротеїнових представників глікокон'югатів в еритроцитах.

Споживання тваринами L-аргініну за АІ виявляло нормалізуючий вплив на функціональний стан еритроцитів. Споживання L-NAME за умов АІ не супроводжувалося достовірними змінами.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андронов Е. В., Киричук В.Ф., Иванов А.Н., Мамонтова Н.В. Роль оксида азота в регуляції мікроциркуляторного звена системи гемостаза: обзор литературы // Саратов. науч.-мед. журн. 2007. Т. 3. № 3. С. 39-44.
2. Буров Ю. В., Ведерникова Н. Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. М.: Медицина, 1985. С. 5-72.
3. Васильева Е. М. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии // Биомед. химия. 2005. Т.51. №2. С. 118-126.
4. Єфіменко Н. В., Дудок К. П., Климишин Н. І., Сибірна Н. О. Вплив L-аргініну та L-NAME на морфологію еритроцитів периферійної крові щурів за умов алкогольної інтоксикації // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2015. Т.14. №3. С. 58-61.
5. Крылов В. Н. Влияние низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ-диапазона на некоторые показатели гомеостаза животных // Вестн. Нижегород. ун-та. им. Лобачевского. Сер. Биология. 2003. Вып. 1. №6. С. 14-24.

6. Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., Степная Е. А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск.: Изд-во Том. ун-та, 2004. 202 с.
7. Омельченко Ю., Миленко М., Максимович Я. Вплив алкоголю на систему оксиду азоту в організмі // Вісн. КНУ ім. Т. Шевченка. Сер. Біологія. 2010. № 56. С. 51–52.
8. Спасов А. А., Островский О. А., Дегтярев А. Н., Кучерявенко А. Ф. Изучение агрегации эритроцитов на лазерном агрегометре // Клин. лаб. диагностика. 2000. № 5. С. 21-23.
9. Besoins énergétiques et besoins en protéines. Rapport d'une consultation conjointe d'experts FAO/OMS/UNU. Série de Rapports technique. Org. mond. de la Santé. Geneve, 1986. 144 p.
10. Folch J., Lees M., Stauley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497.
11. Guoyao W. U., Morris S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond // Biochem. J. 1998. Vol. 366. Pt 1. P. 1–17.
12. Rampling M. W., Meiselman H. J., Neu B., Baskurt O. K. Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation // Biorheology. 2004. 41. № 2. P. 91–112.
13. Reiter C. D., Wang X., Santos J. E. Cell free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle cell disease // Cell. Mol. Biol. Lett. 2003. Vol. 8. № 2. P. 455-460.
14. Shima Y., Maeda T., Aizawa S. et al. L-arginine import via cationic amino acid transporter CAT1 is essential for both differentiation and proliferation of erythrocytes // Blood. 2006. Vol. 107. № 4. P. 1352–1356.
15. Varki A., Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2012. Vol. 1253. P. 16–36.
16. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acid // J. Biol. Chem. 1959. № 234. P.1971-1975.

Стаття: надійшла до редакції 28.07.16  
доопрацьована 1.09.16  
прийнята до друку 6209.16

## ВЛИЯНИЕ L-АРГИНИНА И N $\Omega$ -НИТРО-L-АРГИНИН МЕТИЛОВОГО ЭФИРА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Н. Ефименко, Н. Сибирная

Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: nataliya\_yefimenko@mail.ru

В условиях экспериментальной алкогольной интоксикации (АИ) у крыс выявлено снижение параметров альцианиндуцированной агрегации эритроцитов, что согласуется со снижением общего отрицательного заряда гликокаликса их мембран. Было показано, что содержание общих мембраносвязанных сиаловых кислот в условиях АИ снижалось на 36,4 % по сравнению с контролем. Потребление животными контрольной группы L-аргинина и N $\omega$ -нитро-L-аргинин метилового эфира (L-NAME) не вызывало достоверных изменений этого показателя относительно контроля. В условиях АИ содержание сиаловых кислот увеличилось на 28,2 % при употреблении L-аргинина и уменьшилось на 13,8 % при употреблении L-NAME. Содержание протеинсвязанных сиаловых кислот в условиях АИ снижается на 31 % по сравнению с контролем. При патологии содержание липидсвязанных сиаловых



кислот уменьшается вдвое относительно контрольных вариантов. При употреблении алкоголизованными животными субстрата NO-синтазы (NOS) - L-аргинина показано его нормализующее влияние на функциональное состояние эритроцитов. Потребление крысами в условиях АИ неселективного ингибитора этого фермента - L-NAME, который является структурным аналогом L-аргинина, не сопровождалось достоверными изменениями уровня альцианиндуцированной агрегации и содержания сиаловых кислот относительно показателей алкоголизованных животных.

*Ключевые слова:* алкогольная интоксикация, эритроциты, агрегация.

## INFLUENCE OF L-ARGININE AND N $\omega$ -NITRO-L-ARGININE METHYL ESTER ON STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF ERYTHROCYTE MEMBRANS OF RATS UNDER ALCOHOLIC INTOXICATION

N. Yefimenko, N. Sybirna

*Ivan Franko Lviv National University  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: nataliya\_yefimenko@mail.ru*

It was shown a decrease in aggregation induction by alcian blue of red blood cells, which is consistent with the reduction of the negative charge of glycocalyx of membranes under experimental alcohol intoxication (AI) in rats. The content of total sialic acids in the membrane is decreased on 36.4 % under conditions of AI when compared with the control. The control groups animals which consumed L-arginine and N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) did not cause significant changes this index relative to the control. The content of sialic acids was increased on 28.2 % during consumption of L-arginine and decreased on 13.8 % after consumption of L-NAME under AI. The contents of protein-bound sialic acids are reduced on 31% under AI compared with the control. Through pathology, the content of the lipid bound sialic acids are decreased by twice relatively to the control. Has been shown that consumption of L-arginine - substrate of NO-synthase (NOS) normalize effect on the functional state of erythrocytes animals with AI. Consumption of nonselective inhibitor of this enzyme - N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), which is a structural analog of L-arginine, was not accompanied by significant changes in the level aggregation and content of sialic acids under conditions AI.

*Keywords:* alcohol intoxication, erythrocytes aggregation.