

## КИСЕНЬТРАНСПОРТНА ФУНКЦІЯ ГЕМОГЛОБІНУ ПРИ ВВЕДЕННІ АГМАТИНУ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

**М. Люта, І. Ференц, В. Бурда, А. Федорович, К. Дудок, Н. Сибірна**

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: lyutam@gmail.com*

Досліджено вплив агматину – селективного інгібітора NO-синтази на стан системи транспортування кисню та спектральні характеристики гемоглобіну шурів за умов експериментального цукрового діабету, індукованого стрептозотоцином. У разі внутрішньом'язового введення агматину тваринам зі стрептозотоциновим діабетом у концентрації 20 мг/кг маси тіла упродовж 14 днів спостерігали зміни у спорідненості гемоглобіну до кисню. А саме, відбувалося зміщення кривої дисоціації оксигемоглобіну вправо, зростання  $P_{50}$  та зниження рівня лужності гемоглобіну. Також встановлено, що введення агматину викликає зміни у електронних спектрах гемоглобіну в ділянці смуги Сорє (350–450 нм). Показано, що агматин як ендogenous регулятор синтезу NO може виявляти свій вплив на спорідненість гемоглобіну до кисню, спектральні характеристики та кисеньтранспортну функцію гемоглобіну, змінюючи рівень утворення оксиду азоту і процеси депонування NO шляхом утворення S-нітросо- та нітрозилгемоглобіну.

*Ключові слова:* гемоглобін, крива дисоціації оксигемоглобіну, спектри поглинання оксигемоглобіну, агматин, експериментальний цукровий діабет.

Гемоглобін в організмі представлений гетерогенною родиною білків, що містять як простетичну групу протопорфірин IX (гем). Крім транспорту кисню, вони виконують цілу низку важливих функцій: зв'язування оксиду азоту і сульфідів, взаємодію з активними формами кисню та нітрогену, сенсорні функції та інші. За останні роки також значно розширилися уявлення про фізіологічну роль гемоглобінів у живих організмах [10, 34].

У тварин відомі такі типи гемумісних білків, які задіяні у кисеньтранспортній функції: гемоглобіни крові та гемолімфи, що переносять кисень, міоглобіни скелетних м'язів і серця, які беруть участь у транспорті й депонуванні кисню, а також недавно виявлені цитоглобіни та нейроглобіни [19, 25, 27].

Існує велика кількість публікацій, у яких показано, що первинна функція гемоглобінів, ймовірно, полягала у захисті клітин від нітративного стресу і модулювання сигнальної функції NO. Наприклад, спільною для основних груп відомих гемоглобінів є реакція перетворення NO в  $NO_3^-$ . Гемоглобіни також здатні взаємодіяти з активними формами кисню та нітрогену, тобто функціонувати в умовах оксидативного і нітративного стресів, що особливо важливо при дії на живі організми несприятливих чинників, а також за низки патологічних станів, зокрема, і цукрового діабету [10].

У результаті гіперглікемії відбувається посилення утворення вільних радикалів, зокрема, супероксид-аніона, який, взаємодіючи з іншими сполуками, може перетворюватися на гідроксил-радикал, гідроген пероксид і пероксинітрид (ONOO<sup>-</sup>) [28]. Пероксинітрид, у свою чергу, може викликати модифікації білків, розриви у ДНК, зміни у передачі сигналу

всередині клітини, перекисне окиснення ліпідів, індукцію загибелі клітин шляхом некрозу або апоптозу [28].

Відомо, що гемопротейни є мішенями впливу пероксинітриду. При взаємодії пероксинітриду з оксигемоглобіном і оксиміоглобіном відбувається утворення метформи гемопротейнів, пошкодження порфіринового кільця з подальшою деградацією гему. Деградація гему здійснюється у дві стадії та включає окиснення заліза гему і нітрування залишків тирозину в апоферменті. Нітрування гемоглобіну призводить до зміни конформації білка, в результаті якої гем виходить із гідрофобної кишені, й, отже, підвищується ймовірність його вивільнення і руйнування [17]. Нашими попередніми дослідженнями було показано, що за експериментального цукрового діабету (ЕЦД) у щурів підвищується швидкість нітрозилювання гемоглобіну в системі *in vitro* та відбувається перерозподіл вмісту лігандних форм гемоглобіну в еритроцитах [11].

Поглинання світла метало- та хромопротейнами, зокрема гемоглобіном, у видимій ділянці спектра визначається простетичними групами. На межі між видимою і ультрафіолетовою ділянками спектра усі порфірини характеризуються інтенсивною смугою поглинання з максимумом у межах 400–418 нм – смуга Соре. Вона характеризує зміни електронної структури порфіринового кільця. За змінами положення та інтенсивності поглинання цієї смуги можна судити про конформаційні зміни у молекулі гемоглобіну на рівні гему. В умовах гіперглікемії оксидативно-нітративного стресу, що мають місце за умов цукрового діабету [28], гемоглобін зазнає глікозилювання, і, як наслідок, змінюється його спорідненість до кисню та порушується кисеньтранспортна функція в цілому. Кисеньзв'язуючі властивості крові відіграють важливу роль у фізіологічних механізмах збереження рівноваги між процесами вільнорадикального окиснення й антиоксидантного захисту в організмі. Зазначені властивості крові визначають характер і величину дифузії кисню до тканин залежно від потреб у ньому й ефективності його використання, вносять вклад у прооксидантно-антиоксидантний стан, виявляючи в різних ситуаціях антиоксидантні або прооксидантні властивості. На спорідненість гемоглобіну до кисню, крім 2,3-дифосфогліцерату, який є основним модулятором кисеньзв'язуючої функції цього гемопротейну, може впливати система L-аргінін/NO. Її вплив здійснюється через внутрішньоеритроцитарні механізми регуляції, кисеньзалежний характер утворення NO, регуляцію судинного тонуусу та дію пероксинітриду [7].

За умов гіперглікемії відбувається нагромадження у крові кінцевих продуктів неферментативного глікозилювання. При їх взаємодії з рецепторами на поверхні клітин відбувається активація цілого каскаду сигнальних шляхів, що призводить до зростання експресії та утворення великої кількості прозапальних цитокінів (ФНП- $\alpha$ , інтерлейкінів 1, та 6) [26]. У результаті в багатьох типах клітин відбувається експресія гена та підвищення кількості індукцибельної ізоформи NO-синтази (iNOS) і, як наслідок, – надсинтез NO [3].

З метою зниження надпродукції NO за умов досліджуваної патології в роботі було використано агматин (4-амінобутил-гуанідин) – продукт декарбоксилування L-аргініну. Оскільки агматин є аналогом L-аргініну за рахунок наявності гуанідинової групи, він виконує роль селективного конкурентного інгібітора iNOS ( $K_i=220$  мкМ).

Метою роботи було дослідити вплив агматину на стан системи транспортування кисню та спектральні характеристики гемоглобіну щурів за умов експериментального цукрового діабету, індукованого стрептозотоцином.

#### Матеріали та методи

Досліди проводили на безпородних щурах-самцях масою 150–180 г ( $n=24$ ). Тварин утримували у стаціонарних умовах віварію за постійної температури на основному раціо-

ні. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно із Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України „Про захист тварин від жорстокого поводження”, „Загальними принципами роботи на тваринах”, затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погодженими з положеннями „Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях” (Страсбург, Франція, 1985). Експериментальний цукровий діабет (ЕЦД) у щурів викликали введенням стрептозотоцину фірми “Sigma” (США) з розрахунку 60 мг/кг маси тіла внутрішньочеревно. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози у крові, яку визначали з використанням набору реактивів “Філісіт-діагностика” (Україна).

Вплив агматину “Sigma” (США) оцінювали *in vivo*: при введенні внутрішньом’язово піддослідним тваринам у концентрації 20 мг/кг маси протягом 14 днів, починаючи з третього дня після індукції цукрового діабету. Дослідження проводили в таких групах тварин: 1. Контроль (К); 2. К + агматин; 3. Діабет (Д); 4. Д + агматин. Вміст глікозильованого гемоглобіну (HbA<sub>1c</sub>) в еритроцитах визначали колориметричним методом [33]. Рівень гемоглобіну F, який характеризується значною стійкістю до дії лугів, визначали згідно з методом К. Зінгера у модифікації Н. Сибірної [13]. Спорідненість гемоглобіну до кисню визначали спектрофотометричним методом побудови кривих дисоціації оксигемоглобіну [8]. За допомогою побудованих кривих графічно визначали P<sub>50</sub>. Гемоліз еритроцитів проводили 3 мМ К<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>-фосфатним буфером, рН 7,36. Електронні спектри гемоглобіну реєстрували за допомогою спектрофотометра Specord M-40 (Німеччина). Результати обробляли статистично з використанням критерію Стьюдента. Вірогідною вважалася різниця при P<0,05.

#### Результати і їхнє обговорення

Гемоглобін – перший білок, для якого було показано неферментативне глікозилювання [24]. Неферментативне глікозилювання – посттрансляційна реакція хімічної конденсації білка з моносахаридом. Вміст у крові глікозильованих білків підвищується у разі таких захворювань, як цукровий діабет, галактоземія, різноманітні мелітурії, атеросклероз та ін. [4]. Вміст у крові глікозильованого гемоглобіну (HbA<sub>1c</sub>) є маркером порушень вуглеводного обміну. В результаті проведених нами досліджень встановлено зростання вмісту HbA<sub>1c</sub> у щурів з ЕЦД порівняно з контролем (табл. 1), що узгоджується з літературними даними [4, 10]. Переважно сайтами глікозилювання гемоглобіну є аміногрупи N-кінцевої амінокислоти валіну обох β-ланцюгів, а також ε-аміногрупи деяких залишків лізину α- і β-ланцюгів глобіну [32]. Присутність молекули глюкози на N-кінцях β-ланцюгів глобіну робить неможливою взаємодію HbA<sub>1c</sub> з 2,3-дифосфоліцератом, який зумовлює зниження спорідненості гемоглобіну до кисню. Глікозильований гемоглобін має підвищену спорідненість до кисню, і збільшення його рівня може погіршити оксигенацію тканин [9, 22]. Але, з іншого боку, утворення HbA<sub>1c</sub> також може бути пристосувальною реакцією організму для збільшення кисневої ємності периферичної крові.

Процес зв’язування кисню гемоглобіном, кисеньтранспортну функцію крові та оксигенацію тканин у цілому наочно відображає крива дисоціації оксигемоглобіну (КДО), характер якої змінюється за різних патологій, а особливо тих, що характеризуються розвитком гіпоксичного стану тканин.

Універсальним показником ступеня спорідненості гемоглобіну до кисню (СГК) є P<sub>50</sub> – значення pO<sub>2</sub>, за якого гемоглобін вивільняє 50% зв’язаного кисню. Нами показано, що за ЕЦД при дослідженні гемоглобіну еритроцитів щурів відбувається зсув КДО вліво та зниження P<sub>50</sub> на 21% порівняно з контролем (рис. 1, табл. 1). За цих же умов спостерігали підвищення вмісту HbA<sub>1c</sub>, що вказує на інтенсифікацію процесів неферментативного глікозилювання білків за умов цукрового діабету. Рівень лужностійкого гемоглобіну зростав на 17%.

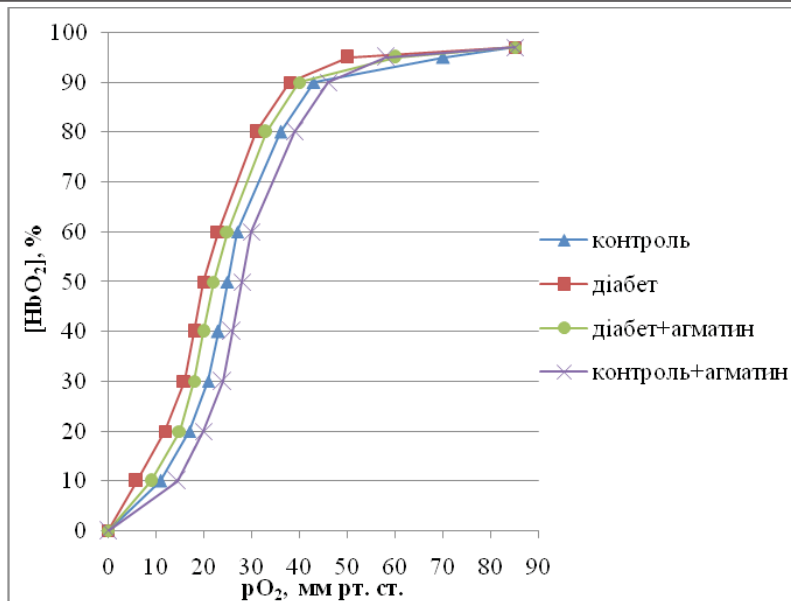


Рис. 1. Криві дисоціації оксигемоглобіну в нормі та за ЕЦД у разі впливу агматину.

Таблиця 1

Значення P<sub>50</sub>, вміст глікозильованого і лужностійкого гемоглобіну (M±m, n=8–10)

Варіант досліджу	Вміст HbA <sub>1c</sub> , %	P <sub>50</sub> , мм рт. ст.	Вміст лужностійкого гемоглобіну, %
Контроль	5,34±0,14	25,62±1,01	13,91±2,30
ЕЦД	8,4±0,41*	20,21±0,60*	17,88±1,08*
Контроль + агматин	4,86±0,62	28,31±1,45*	11,56±1,15
ЕЦД + агматин	7,23±0,33	22,46±0,90#	13,76±1,59#

**Примітки.** У табл. 1 і 2: \* – різниця вірогідна порівняно з контролем, P<0,05; # – різниця вірогідна порівняно з діабетом, P<0,05.

Зміна положення КДО ліворуч свідчить про наявність в організмі гіпоксичного стану [31]. Як наслідок відбуваються зміни в системі зовнішнього дихання: гіпервентиляція легень, а в подальшому розвивається газовий алкалоз, що зумовлює підвищення рН усередині еритроцита [12, 20]. У підвищення кисневої ємності крові та спорідненості гемоглобіну до кисню вносить свій вклад збільшення вмісту метгемоглобіну та глікозильованих молекул цього білка. Це перешкоджає алостеричній регуляції кисеньтранспортної функції оксигемоглобіну з боку внутрішньоклітинних фосфатів, особливо 2,3-дифосфогліцерату [12, 30].

Крім того, в роботі [29] було виявлено значно вищий рівень нітрозогемоглобіну (SNO-Hb) в гемолізаті еритроцитів щурів з індукованим стрептозотоцином діабетом, порівняно з контролем, що дає підстави припускати участь глікозильованого гемоглобіну у процесах S-нітрозилування по амінокислотному залишку цистеїну в 93-му положенні β-ланцюга апопротеїну. Адитивний ефект таких посттрансляційних модифікацій гемоглобіну як глікозильування та S-нітрозилування може призводити до порушення функцій судин і розвитку діабетичної мікроангіопатії.

Введення інгібітора індукцйбельної NO-синтази агматину контрольним тваринам і тваринам з ЕЦД не викликало достовірних змін у вмісті HbA<sub>1c</sub>, проте впливало на

спорідненість гемоглобіну до кисню (рис. 1, табл. 1). В обох випадках відбувалося зміщення КДО, що реєструвалося за значенням  $P_{50}$ . У контрольних тварин, які отримували ін'єкції агматином, КДО зміщувалася праворуч і відбувалося збільшення  $P_{50}$  на 9,5%. Подібну тенденцію було відзначено нами у тварин з ЕЦД за дії агматину – зсув КДО вправо порівняно з діабетом, показник  $P_{50}$  зростає на 10,0% (табл. 1). Цікаво відзначити, що за умов дії агматину знижувався вміст лужностійкого гемоглобіну, що може бути одним із факторів, який викликає зміни у спорідненості гемоглобіну до кисню. Відомо, що різні сполуки NO з гемоглобіном можуть по-різному впливати на СГК всієї крові [5]. Метгемоглобін і SNO-Hb підвищують СГК, а нітрозилгемоглобін ( $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ ) її знижує; відповідно, перші зміщують КДО вліво, а останній – вправо. NO змінює СГК через перехід гемоглобіну з конформаційного стану R в T, підвищення рівня еритроцитарного метгемоглобіну, утворення нітрозотіолів і додаткових продуктів окиснення гемоглобіну [21]. Показник  $P_{50}$  SNO-Hb має значення менше 10 мм рт. ст. [18], а для  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$  його значення становить  $39,6 \pm 1,5$  мм рт. ст. [23]. Вплив агматину як інгібітора NOS на положення КДО та значення  $P_{50}$ , ймовірно, обумовлений різними ефектами NO-похідних гемоглобіну на СГК.

NO взаємодіє з  $\text{O}_2^-$  із утворенням пероксинітриду (потужного окиснювача), який може бути модифікатором властивостей гемоглобіну. Існують два основні типи реакцій пероксинітриду з гемоглобіном: або з гемом, або з амінокислотними залишками поліпептидних ланцюгів глобіну (тирозином, цистеїном) [15]. Таким чином, гемоглобін може забезпечувати захист від пероксинітриду, виконуючи функцію внутрішньоклітинного антиоксиданта.

У видимій ділянці спектра поглинання оксигемоглобіну є три смуги з максимумами 415, 542–544, та 576–578 нм. На рис. 2 представлені спектри поглинання оксигемоглобіну в ділянці поглинання гему 350–450 нм (смуги Соре) з максимумом оптичної густини при довжині хвилі 415 нм за різних варіантів дослідження. За умов стрептозотоцинового діабету відбувається зниження інтенсивності максимуму поглинання на 11% (табл. 2). Це явище відоме в літературі як гіпохромний ефект [6]. Зниження оптичної густини може свідчити про часткове розгортання білкової глобули гемоглобіну [14]. Можливо, відбувається перерозподіл електронної густини навколо гемового компонента гемоглобіну.

Таблиця 2

Параметри електронних спектрів поглинання гемоглобіну  
за різних умов дослідження ( $M \pm m$ ,  $n=8-10$ )

Варіант дослідження	$\lambda$ , нм (пік Соре)	Інтенсивність поглинання, відн. од.
Контроль (К)	415	$1,483 \pm 0,058^*$
К+агматин	415	$1,582 \pm 0,097^*$
ЕЦД	415	$1,320 \pm 0,084^*$
ЕЦД+агматин	415	$1,511 \pm 0,055^{\#}$

За введення агматину контрольним тваринам спостерігається підвищення інтенсивності максимуму поглинання, зумовлене гемовим компонентом оксигемоглобіну (пік Соре) щодо спектра гемоглобіну контрольних тварин на 6,7%. Така ж картина відзначена нами при введенні інгібітора NO-синтази щурам з ЕЦД – агматин викликає підвищення інтенсивності поглинання у максимумі смуги Соре на 11,5% (гіперхромний ефект) щодо гемоглобіну тварин, хворих на цукровий діабет

Поглинання світла хромопротеїнами, зокрема, гемоглобіном, у видимій ділянці спектра визначається простетичними групами. Тому для аналізу спектрів поглинання гемоглобіну варто розглянути деякі закономірності спектральних характеристик

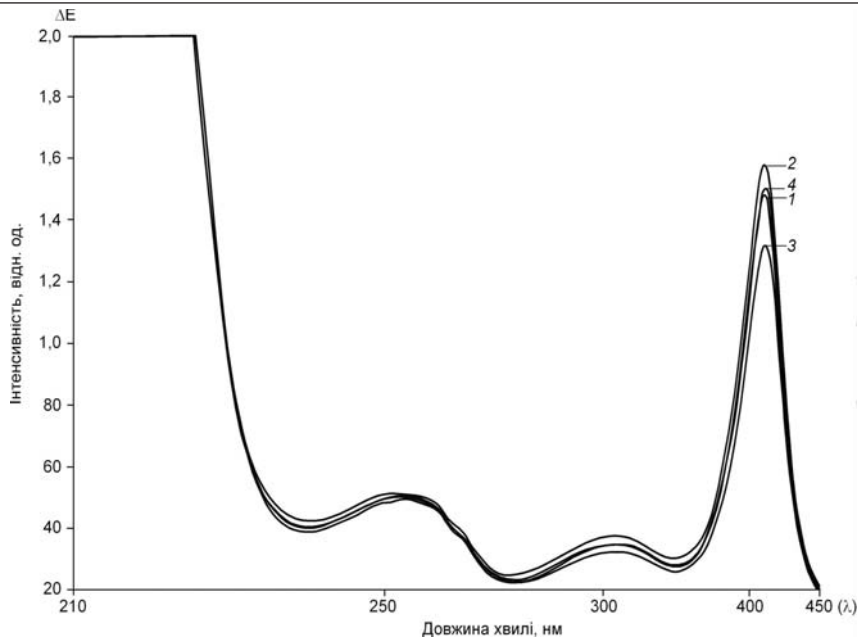


Рис. 2. Спектри поглинання оксигемоглобіну за різних умов досліджу: 1 – контроль; 2 – контроль + агматин; 3 – ЕЦД; 4 – ЕЦД+ агматин.

простетичних груп. Відомо, що порфірини мають плоску структуру, у якій чергуються одинарні та подвійні зв'язки, тобто є системою зі спряженими подвійними зв'язками. Експериментально доведено [1], що спектри поглинання молекул зі спряженими подвійними зв'язками визначаються усією системою спряжених зв'язків. Тому можна припустити, що будь-які зміни у системі спряжених зв'язків порфірину, які призводять до зміни симетрії електронної густини порфіринового ядра, можуть супроводжуватися зміною електронної густини молекули в цілому, розподілу електронних енергетичних рівнів і, як наслідок, зміною спектрів поглинання.

У досліджах *in vitro* показано, що інтенсивність смуги Soret обумовлена електронною структурою гему [1, 2]. Варто зазначити, що специфічні властивості гемоглобіну визначаються структурою молекули в цілому: структурою гему, глобінового компонента, природою зв'язку гему з глобіном. Важливу роль у цьому зв'язку відіграє залізо гему. Не менш вагомий вклад у зв'язках гему з глобіном вносять його карбоксильні групи через взаємодію з боковими групами основних амінокислотних залишків глобіну.

На зміну електронної густини гему може суттєво впливати його мікрооточення. Виявлені нами зміни спектральних характеристик у видимій ділянці, очевидно, є відображенням змін як у гемі, так і у глобіні. Агматин через гуанідинову групу може взаємодіяти з карбоксильними групами амінокислотних залишків глобіну, карбоксильними групами гему, екрануючи його взаємодію з глобіном. Сукупність таких взаємодій може суттєво впливати на електронну структуру гему, зміну взаємного положення площин порфіринових кілець, конформацію молекули в цілому і, як результат, зміну інтенсивності характерних максимумів спектрів поглинання.

Якщо аналізувати електронні спектри гемоглобіну через його взаємодію з NO, потрібно зауважити, що у присутності  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ , очевидно, відбуваються зміни просторового розташування окремих фрагментів поліпептидних ланцюгів у ділянці

гемової кишені, що полегшує доступ ліганда до активного центру молекули.  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$  відіграє в цьому процесі роль своєрідного алостеричного регулятора функціональної активності досліджуваного гемопротейну на рівні окремих тетрамерів [2]. Агматин як ендогенний регулятор синтезу NO може виявляти свій вплив на спектральні характеристики гемоглобіну та СГК в цілому через рівень утворення NO та його депонування з утворенням NO-похідних цього гемопротейну.

Таким чином, введення агматину в нашій експериментальній моделі викликало зміни у спорідненості гемоглобіну до кисню, що виявлялись у зміщенні положення КДО та збільшенні показника  $P_{50}$ , а також у зсувах характерних піків електронних спектрів цього гемопротейну, зокрема, у смузі Сорє. Потрібно відзначити, що в разі ЕЦД агматин виявляв позитивний ефект на кисеньтранспортну функцію оксигемоглобіну шурів, оскільки спостерігалася тенденція наближення значення параметра  $P_{50}$  до контрольного рівня.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Артюхов В. Г.* Гемопротейды: закономерности фотохимических превращений в условиях различного микроокружения. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 1995. 280 с.
2. *Артюхов В. Г., Калаева Е. А., Путинцева О. В.* Динамика оксигенации нативного и УФ-модифицированного гемоглобина человека в присутствии оксида азота // Физиология человека. 2004. Т. 30. № 2. С. 110–116.
3. *Бродяк І. В., Сибірна Н. О.* Особливості метаболізму L-аргініну в лейкоцитах крові за умов експериментального цукрового діабету // Фізіол. журнал. 2008. Т. 54. № 1. С. 63–69.
4. *Галенок В. А., Боднар П. Н., Диккер В. Е.* и др. Гликозилированные протеины. М.: Наука, 1989. 255 с.
5. *Глебов А. Н., Шульга Е. В., Зинчук В. В.* Роль кислородсвязывающих свойств крови в развитии окислительного стресса, индуцированного липополисахаридом. Гродно: ГрГМУ, 2011. 216 с.
6. *Демченко А. П.* Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. К.: Наукова думка, 1981. 208 с.
7. *Зинчук В. В.* Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина // Успехи физиол. наук. 2003. Т. 34. № 2. С. 33–45.
8. *Иванов Ю. Г.* Модификация спектрофотометрического метода определения кислородно-диссоциационных кривых гемоглобина // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. 1975. Т. 79. № 11. С. 122–123.
9. *Козлов Ю. А., Лаврова В. С.* Система крови при сахарном диабете // Успехи соврем. биологии. 1988. Т. 105. № 3. С. 505–520.
10. *Космачевская О. В., Топунов А. Ф.* Гемоглобины – разнообразие структуры и функций: обзор // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 6. С. 627–653.
11. *Люта М., Федорович А., Бурда В.* та ін. Вплив агматину на фізико-хімічні властивості гемоглобіну шурів за експериментального цукрового діабету // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2011. Вип. 55. С. 39–46.
12. *Середенко М. М., Дударев В. П., Лановенко И. И.* и др. Механизмы развития и компенсации гемической гипоксии. К.: Наук. думка, 1987. 200 с.
13. *Сибірна Н. О., Бурда В. А., Чайка Я. П.* Методи дослідження системи крові. Львів: Видавн. центр Львів. нац. ун-ту, 2006. 100 с.
14. *Стародуб Н. Ф., Коробов В. Н., Назаренко В. И.* Миоглобин: структура, свойства, синтез, биологическая роль. К.: Наукова думка, 1992. 282 с.
15. *Стародубцева М. Н., Черенкевич С. Н.* Механизмы реакций гемоглобина с пероксинитритом в водно-солевом растворе // Весті НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук. 2003. Т. 2. С. 86–90.
16. *Столяр О. Б., Петренко А. И., Коробов В. Н.* Молекулярные основы кислородной диссоциации оксигемоглобина кролика при действии рентгеновского облучения в дозе 600 Р // Вестн. Львов. ун-та. 1979. Т. 11. С. 64–75.
17. *Alayash A. I., Ryan B. A., Cashon R. E.* Peroxynitrite-mediated heme oxidation and protein modification of native and chemically modified hemoglobins // Arch. Biochem. Biophys. 1998. Vol. 349. P. 65–73.

18. *Bonaventura C., Ferruzzi G., Tesh S., Stevens R D.* Effects of S-nitrosation on oxygen binding by normal and sickle cell hemoglobin // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. N 35. P. 24742–24748.
19. *Burmester T., Ebner B., Weich B., Hankeln T.* Cytoglobin: A Novel Globin Type Ubiquitously Expressed in Vertebrate Tissues // *Mol. Biol. Evolution.* 2002. Vol. 19. N 4. P. 416–421.
20. *Garcia N., Hopkins S. R., Powell F. L.* Effects of intermittent hypoxia on the isocapnic hypoxic ventilatory response and erythropoiesis in humans // *Respir. Physiol.* 2000. Vol. 123. N 1–2. P. 39–49.
21. *Head C. A., Brugnara C., Martinez-Ruiz R.* et al. Low concentrations of nitric oxide increase oxygen affinity of sickle erythrocytes in vitro and in vivo // *J. Clin. Invest.* 1997. Vol. 100. N 5. P. 1193–1198.
22. *Inoguchi T., Li P., Umeda F.* et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells // *Diabetes.* 2000. Vol. 49. P. 1939–1945.
23. *Kosaka H., Seiyama A.* Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. Vol. 218. N 3. P. 749–752.
24. *Kunkel H. G., Wallenius G.* New hemoglobin in normal adult blood // *Sci.* 1955. Vol. 122. P. 288–288.
25. *Lundberg J., Gladwin M., Ahluwalia A.* et al. Nitrate and nitrite in biology nutrition and therapeutics // *Nature Chem. Biol.* 2009. Vol. 5. N 12. P. 865–869.
26. *Nogueira-Machado J. A., Chaves M. M.* From hyperglycemia to AGE-RAGE interaction on the cell surface: a dangerous metabolic route for diabetic patients // *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2008. Vol. 12. N 7. P. 871–82.
27. *Ostojic J., Sakaguchi D. S., Latboudier Y.* et al. Neuroglobin and cytoglobin: oxygen-binding proteins in retinal neurons // *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2006. Vol. 47. N 3. P. 1016–1023.
28. *Pacher P., Beckman S. J., Liaudet L.* Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease // *Physiol. Rev.* 2007. Vol. 87. N 1. P. 315–424.
29. *Padron J., Peiro C., Cercas E.* et al. Enhancement of S-nitrosylation in glycosylated hemoglobin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. Vol. 271. N 1. P. 217–221.
30. *Schena F., Cuzzolin L., Rossi L.* et al. Plasma nitrite/nitrate and erythropoietin levels in cross-country skiers during altitude training // *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 2002. Vol. 42. N 2. P. 129–134.
31. *Schumacker P. T., Suggett A. J., Wagner P. D., West J. B.* Role of hemoglobin P<sub>50</sub> in O<sub>2</sub> transport during normoxic and hypoxic exercise in the dog // *J. Appl. Physiol.* 1985. Vol. 59. N 3. P. 749–757.
32. *Shapiro R., Mc Manus M. J., Zalut C., Bunn H. F.* Sites of non-enzymatic glycosylation of human haemoglobin // *J. Brit. Chem.* 1980. Vol. 255. N 7. P. 3120–3127.
33. *Van Kampen E. J., Zijlstra W. G.* Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives // *Adv. Clin. Chem.* 1983. Vol. 23. P. 199–257.
34. *Vinogradov S. N., Moens L.* Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage and sensing // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. P. 8773–8777.

Стаття: надійшла до редакції 28.02.13

доопрацьована 29.04.13

прийнята до друку 30.04.13

#### OXYGEN TRANSPORT FUNCTION OF HEMOGLOBIN UNDER THE ADMISSION AGMATINE IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

**M. Lyuta, I. Ferents, V. Burda, A. Fedorovych, K. Dudok, N. Sybirna**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: lyuta.maryana@mail.ua*

The effect of agmatine – selective inhibitor of NO-synthase in the oxygen transport and spectral characteristics of rats hemoglobin with experimental diabetes induced by streptozotocin. In the case of intramuscular administration of agmatine diabetic animals with



concentration of 20 mg / kg for 14 days, we observed changes in the affinity of hemoglobin for oxygen. Curve of oxyhemoglobin dissociation was shifted to the right with increasing the  $P_{50}$  and reduced alkaline resistant hemoglobin. Also was found that the administration of agmatine causes changes in the electron spectr of hemoglobin in the Sore band (350–450 nm). Agmatine as an endogenous regulator of the synthesis of NO can exert its influence on the affinity of hemoglobin for oxygen, spectral characteristics and oxygen transport of hemoglobin through the level of NO and its deposit with formation of S-nitroso and nitrosyl-hemoglobin.

*Keywords:* hemoglobin, oxyhemoglobin dissociation curve, the absorption spectr of oxyhemoglobin, agmatine, experimental diabetes.

### **КИСЛОРОДТРАНСПОРТНАЯ ФУНКЦИЯ ГЕМОГЛОБИНА ПРИ ВВЕДЕНИИ АГМАТИНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА**

**М. Люта, И. Ференц, В. Бурда, А. Федорович, К. Дудок, Н. Сибирная**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: lyutam@gmail.com*

Исследовано влияние агматина – селективного ингибитора NO-синтазы на состояние системы транспорта кислорода и спектральные характеристики гемоглобина крыс в условиях экспериментального сахарного диабета, индуцированного стрептозотоцином. При внутримышечном введении агматина животным со стрептозотоциновым диабетом в концентрации 20 мг / кг массы тела в течении 14 дней наблюдались изменения в сродстве гемоглобина к кислороду. Происходило смещение кривой диссоциации оксигемоглобина вправо, увеличение  $P_{50}$  и снижение уровня щелочустойчивого гемоглобина. Также установлено, что введение агматина вызывает изменения в электронных спектрах гемоглобина в области полосы Sore (350–450 nm). Показано, что агматин как эндогенный регулятор синтеза NO может оказывать свое влияние на сродство гемоглобина к кислороду, спектральные характеристики и кислородтранспортную функцию гемоглобина, изменяя уровень образования оксида азота и процессы депонирования NO путем образования S-нитрозо- и нитрозилгемоглобина.

*Ключевые слова:* гемоглобин, кривая диссоциации оксигемоглобина, спектры поглощения оксигемоглобина, агматин, экспериментальный сахарный диабет.