

## ВПЛИВ АГМАТИНУ НА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ГЕМОГЛОБІНУ ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

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

Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: lyuta.maryana@mail.ua

Встановлено, що ендогенний інгібітор індукцибельної ізоформи NO-синтази – агматин – при введенні його внутрішньом'язово у концентрації 20 мг/кг маси щурів викликає зміни у ділянці смуги Сорє електронних спектрів нітрозилгемоглобіну та сповільнення швидкості переходу дезоксигемоглобіну в нітрозозому за умов експериментального цукрового діабету. В результаті проведеного аналізу перерозподілу вмісту лігандних форм гемоглобіну виявлено достовірне зростання рівня карбоксигемоглобіну за досліджуваної патології.

*Ключові слова:* цукровий діабет, оксид азоту, агматин, лігандні форми гемоглобіну.

За умов цукрового діабету 1-го типу суттєвих функціональних і структурних змін зазнає система крові, її окремі компоненти, зокрема, гемоглобін еритроцитів. Гемоглобін має виняткову властивість – він оборотно зв'язує кисень, що є молекулярною основою дихальної функції крові. При взаємодії гемоглобіну з киснем утворюється оксигемоглобін (HbO<sub>2</sub>). Кисень у гемоглобіні за певних умов може замінюватися такими лігандами, як CO та NO. Також відомі сполуки гемоглобіну з CN<sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO [3, 16, 19, 20]. Що стосується NO, то у його сполуках з гемоглобіном один атом Феруму приєднує одну молекулу NO. При дослідженні електронної структури комплексу гема гемоглобіну з оксидом азоту було встановлено, що NO зв'язується із залізом гема ковалентно, а між O<sub>2</sub> і Fe<sup>2+</sup> формуються лише слабкі іон-дипольні взаємодії [11]. Спорідненість NO до гемоглобіну на кілька порядків вища, ніж у кисню. NO може зв'язуватись із гемовою частиною гемоглобіну, утворюючи нітрозилгемоглобін (NOHb), а також із цистеїном у 93 положенні β-ланцюга глобіну – нітрозогемоглобін (SNOHb) [7, 17]. Механізми цих реакцій зображені на рис. 1.

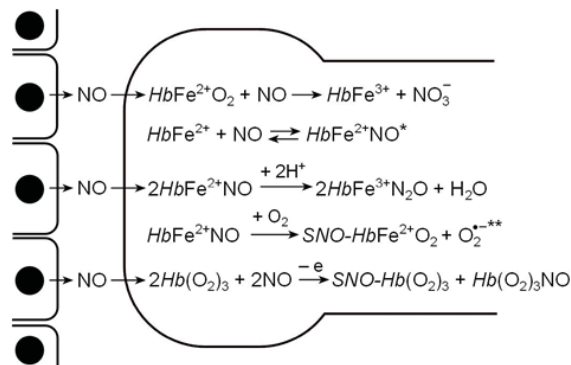


Рис. 1. Взаємодія NO, який утворюється в ендотелії, із внутрішньоеритроцитарним гемоглобіном:  
\* – реакція нітрузування (приєднання NO до Fe<sup>2+</sup> у гемовій групі); \*\* – реакція нітрозилування (приєднання NO до цистеїну глобінового ланцюга по місцю SH-групи).

Stamler J.S. [18] та співробітники показали, що SNOHb розширює судини та прискорює кровоплин, тобто SNOHb діє як „алостерично контрольований буфер”, який обмінює свою NO-групу з тіолами середовища, у тому числі з глутатионом, і, тим самим, змінює кровоплин (як вазодилататор), виконуючи роль критичного фактора постачання  $O_2$  [18]. Щодо NO, зв'язаного з гемом, то такий комплекс стійкий, і у фізіологічних умовах NO не може з нього вивільнитися. У цьому випадку гемоглобін виступає в ролі «утилізатора», а SNOHb – як своєрідне «депо» NO. У будь-якому разі вивчення механізмів взаємодії гемоглобіну з NO є важливим, зокрема за різних патологічних станів. Нашими попередніми дослідженнями було показано, що за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД) у щурів переважає процес нітрозилування по SH-групах цистеїну  $\beta$ -ланцюга глобінової частини гемоглобіну, який має адаптивний характер і спрямований на полегшення від'єднання NO з гема та постачання його до гіпоксичних тканин [12]. За умов цукрового діабету 1-го типу можуть розвиватися всі відомі форми гіпоксії, зокрема, тканинна та гемічна (анемічна). Важливе значення в розвитку гіпоксії при цій патології має порушення транспорту кисню кров'ю, тобто здатності гемоглобіну зв'язувати і віддавати кисень [5]. На спорідненість гемоглобіну до кисню крім 2,3-дифосфогліцерату, який є основним модулятором кисеньзв'язувальної функції цього гемопротейну, може впливати система L-аргінін/NO, а саме, через внутрішньоеритроцитарні механізми регуляції, кисеньзалежний характер утворення NO, регуляцію судинного тонуусу, дію пероксинітриту [7]. В організмі людини та тварин NO утворюється ензиматичним шляхом з амінокислоти L-аргініну за участю різних ізоформ NO-синтази. Відомо три ізоформи цього ферменту, які відрізняються локалізацією в організмі та способом активації і кодуються різними генами: ендотеліальна NOS (eNOS), нейрональна NOS (nNOS), індукцйбельна NOS (iNOS) [12]. Поширеним підходом у експериментальних модельних дослідженнях ролі системи L-аргінін/NO за різних фізіологічних і патологічних станів є використання ефективних інгібіторів NO-синтаз. У наших дослідженнях ми використовували агматин, який за даними деяких авторів є селективним інгібітором iNOS [13], оскільки саме активність цієї ізоформи значно зростає за досліджуваної патології.

Агматин – ендогенна біологічно активна речовина, що синтезується з амінокислоти L-аргініну за допомогою ферменту аргініндекарбоксилази (АДК). Агматин і АДК були виявлені в організмі людини, зокрема, у мозку, печінці, нирках, сечі, сироватці крові. Показано, що агматин може бути нейромедіатором, зв'язуватися з імідазольними і  $\alpha_2$ -адренорецепторами та індукує вивільнення деяких пептидних гормонів, зокрема інсуліну [13–15].

Метою роботи було дослідити вплив інгібітора iNOS – агматину на спектральні характеристики та динаміку вмісту лігандних форм гемоглобіну за умов ЕЦД.

Досліди проводили на безпородних щурах-самцях масою 120–150 г (n=24) згідно з етичним кодексом МОЗ України. Тваринам було забезпечено вільний доступ до їжі та води із перебуванням у стандартних умовах виварію (12-годинна зміна світла і темряви).

Експериментальний цукровий діабет у щурів викликали введенням стрептозотоцину фірми “Sigma” (США) з розрахунку 70 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: 1.

Контроль (К); 2. К + агматин; 3. Діабет (Д); 4. Д + агматин. Визначення вмісту лігандних форм гемоглобіну проводили в цільній крові з використанням методу абсорбційної спектроскопії [2].

Дослідження процесів нітрозилування дезоксигемоглобіну проводили згідно з [10] у нашій модифікації. До 3 мл гемолізату крові (у співвідношенні 1:200) додавали 2,5 мл розчину дитіоніту ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) для відновлення оксигемоглобіну до дезоксигемоглобіну (RHb). Для утворення NO у розчин RHb вносили 0,15мл  $\text{NaNO}_2$  (0,05 М) і спостерігали за зміною забарвлення, що вказує на утворення RHb. При аналізі спектральної характеристики отриманої лігандної форми гемоглобіну два характерні максимуми нітрозилгемоглобіну фіксували на спектрофотометрі Specord-M40 (Німеччина). Умови реєстрації електронних спектрів поглинання: видима ділянка спектра: 450–800 нм ( $x=2$ ,  $y=1$ ), УФ-ділянка спектра: 210–450 нм ( $x=1$ ,  $y=2$ ).

Результати обробляли статистично, використовуючи критерій Стьюдента. Розбіжності вважалися статистично вірогідними, якщо  $P \leq 0,05$ .

Кількісна і якісна характеристика лігандних форм гемоглобіну ґрунтується на їхніх спектральних властивостях. Нами був проведений порівняльний аналіз лігандних форм гемоглобіну крові щурів у нормі та за умов ЕЦД при введенні агматину. Розроблений на кафедрі біохімії ЛНУ імені Івана Франка метод абсорбційної спектроскопії дає змогу проводити таке визначення з високою точністю в автоматичному режимі. Необхідно зауважити, що в літературі практично відсутні відомості про аналогічні дослідження.

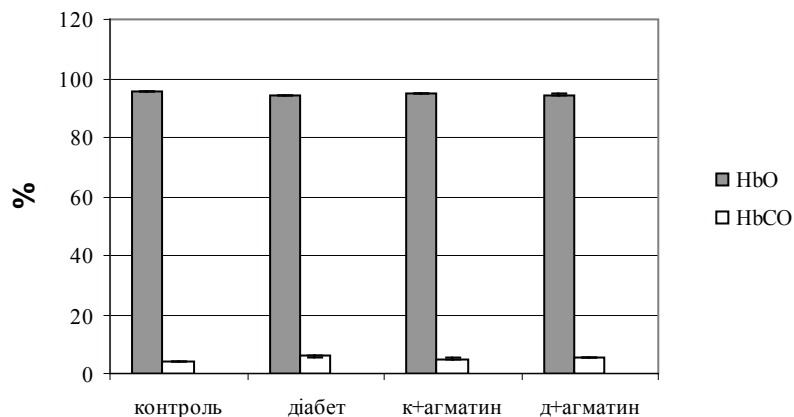


Рис. 2 Вміст окремих лігандних форм гемоглобіну в крові щурів у нормі та при ЕЦД за умов дії агматину ( $M \pm m$ ,  $n=6$ ).

У результаті проведених досліджень нами було встановлено, що за умов ЕЦД у еритроцитах щурів достовірно зростає вміст HbCO (рис.2). На нашу думку, це пов'язано з підвищенням пулу ендogenous монооксиду Карбону (CO). Відомо, що еритроцити в кінці їхнього 120-денного життєвого циклу секвеструються ретикулоендотеліальною системою, при цьому гемоглобін розпадається на гем і протеїн. Глобін повертається в судинне русло, а гем підлягає подальшому перетворенню під дією ферменту гемоксигенази з утворенням еквімолярних кількостей білівердину, заліза і CO [6, 9]. Біологічна дія ендogenous утвореного CO визначається його високою афінністю до гемвісних білків, особливо до гемоглобіну, тому підвищення у крові вмісту CO веде до зростання рівня HbCO, і, як наслідок, виникає

порушення оксигенації гемоглобіну та розвитку гіпоксії. Підвищення продукції CO за умов цукрового діабету може бути пов'язане зі скороченням життя еритроцитів [4], а також із підвищенням активності гемоксигенази, зокрема її індукційної ізоформи (НОх-1), яка відіграє важливу роль у адаптації клітин в умовах стресу [8, 9]. НОх-1 здатна швидко активуватися при змінах парціального тиску кисню ( $pO_2$ ), активних форм кисню (АФК), збільшенні вмісту «вільного» гема. Крім того, є дані, що за умов важкої гіпоксії ( $pO_2 \leq 2$  мм рт. ст.) на підвищення рівня експресії та активності НОх-1 впливає надсинтез NO у результаті активації iNOS [6]. Показано, що в механізми регуляції експресії НОх-1 при гіпоксії також залучені такі процеси, як окиснення глутатіону й утворення S-нітрозотіолів [6, 9]. Введення агматину щурам не викликало достовірних змін у вмісті HbCO як у контролі, так і за ЕЦД.

Кожна лігандна форма гемоглобіну характеризується певним електронним спектром поглинання. Найбільш інтенсивною смугою у спектрі поглинання гемоглобіну є смуга Соре, яка характеризує процеси у порфіриновій частині його молекули. За змінами положення та інтенсивності поглинання цієї смуги можна судити про конформаційні зміни у молекулі гемоглобіну. Встановлено, що нітрозобензол та інші ароматичні нітросполуки можуть витіснити кисень з  $HbO_2$ , утворюючи сполуки з характерними смугами поглинання, які нагадують спектри оксигемоглобіну:  $\alpha$  – 576 нм,  $\beta$  – 541 нм і смуга Соре – 414 нм. Смуга Соре досить інтенсивна і широка, але залежно від лігандної форми гемоглобіну її максимум може зміщуватися на 5–10 нм [3].

Проведений нами аналіз спектрів поглинання NOHb щурів за дії природного інгібітора iNOS – агматину у контролі та за умов стрептозотоцинового діабету свідчить про деяке зміщення смуги Соре (рис. 3, табл. 1).

Таблиця 1

Вплив агматину на характеристичні параметри спектрів поглинання нітрозилгемоглобіну крові щурів у нормі та за умов цукрового діабету

Варіанти дослідів	$\lambda$ , нм		
	Смуга Соре	Різниця ( $\Delta\lambda$ ) інтенсивності щодо контролю	Зміщення щодо контролю, нм
Контроль (HbNO)	412,9	0,7703	-
Діабет (HbNO)	410,9	0,6844	-2
Контроль + агматин (HbNO)	416,3	0,6726	+ 3,4
Діабет + агматин (HbNO)	409,5	0,6575	- 1,4

**Примітка.** \* – різниця вірогідна порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ; \*\* – різниця вірогідна порівняно з діабетом,  $p < 0,05$ .

Зокрема, за введення агматину контрольним тваринам спостерігається зниження інтенсивності нітрузування гемового компонента (пік Соре) порівняно з гемоглобіном контрольних тварин (рис. 3). Така ж картина відзначена нами при введенні інгібітора NO-синтази щурам з ЕЦД порівняно з гемоглобіном тварин, хворих на цукровий діабет. Агматин викликає зсув максимуму спектра поглинання нітрозилгемоглобіну в довгохвильову ділянку спектра на 3,4 нм (батохромний ефект) у контрольних тварин і зсув вліво у короткохвильову ділянку спектра (гіпсохромний ефект) на 1,4 нм у тварин з ЕЦД. Відомо, що порфірини, за структурою, є системами зі спряженими подвійними зв'язками і мають ароматичні властивості. Експериментально доведено, що спектр поглинання молекул, у будові яких є спряжені подвійні зв'язки, визначається усією системою спряжених зв'язків. Будь-

які зміни у системі зв'язків порфірину, які спричиняють перебудову електронної структури порфіринового ядра, перерозподіл електронної густини та розміщення електронних рівнів, призводять до зміни спектрів поглинання у видимій ділянці [1, 3]. При вивченні дії різних розчинів солей гуанідину на фізико-хімічні властивості різних форм гемоглобіну було встановлено факт зв'язування цих сполук із білковою частиною гемоглобіну, наслідком чого є зміна конформації субодиниць гемопротеїну, зниження інтенсивності смуги Соре.

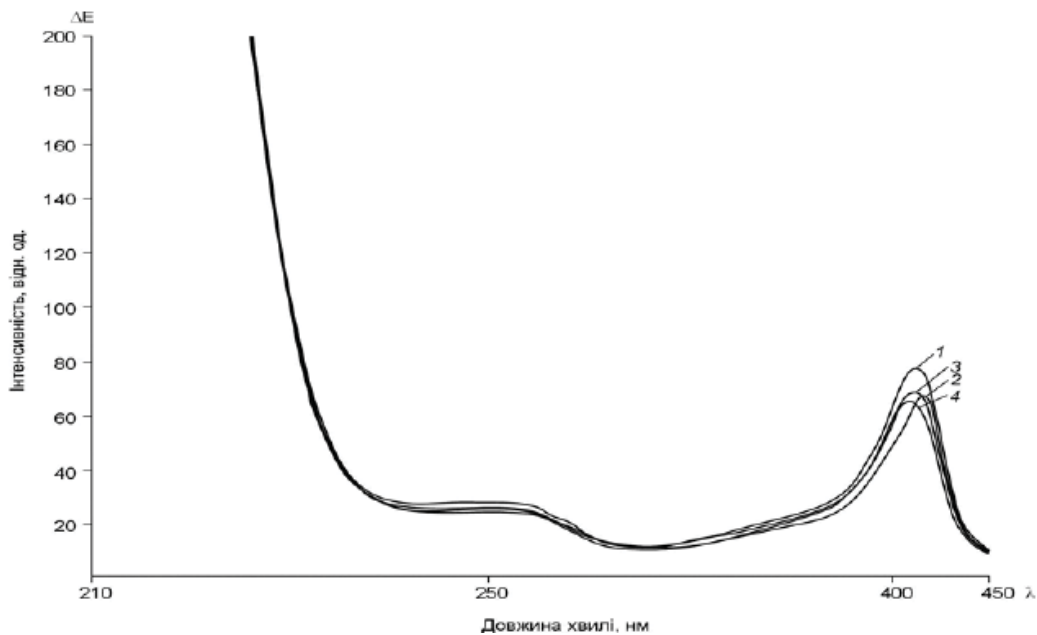


Рис. 3 Електронні спектри нітрозилгемоглобіну крові щурів при введенні агматину: 1 – контроль; 2 – контроль + агматин; 3 – діабет; 4 – діабет + агматин.

Виявлені нами зміни спектральних характеристик за введення агматину у видимій ділянці, очевидно, є відображенням конформаційних перетворень структури як гема, так і глобіну. Агматин через гуанідинову групу може взаємодіяти з карбоксильними групами гема гемоглобіну, порушуючи його хімічну структуру, наслідком якої є зміни інтенсивності та характеристичних максимумів спектрів поглинання, швидкості зв'язування з лігандами.

Щодо змін у максимумі поглинання нітрозилгемоглобіну в ділянці ароматичних амінокислот (218,6 нм), то достовірних змін ми не спостерігали у всіх серіях досліджень.

Приєднання та віддача ліганда молекулою гемоглобіну супроводжується змінами структури останньої, що призводить до відповідних змін у електронному спектрі поглинання. Спектри поглинання різних лігандних форм гемоглобіну ( $\text{HbO}_2$ , RНb, HbCO, MetHb, SHb, NOHb) детально описані у літературі [1–3]. Оригінальність наших досліджень полягала у вивченні динаміки процесу приєднання NO до гемоглобіну щурів у системі *in vitro*. Такий експериментальний підхід дав нам змогу охарактеризувати швидкість нітרוзування/нітрозилування цього гемопротеїну. Перетворення RНb в NOHb фіксувалося за характерними змінами поглинання у видимій ділянці електронного спектра (рис. 4). У результаті було отримано два максимуми поглинання (контроль (К) – 546,1 і 572,1 нм; ЕЦД – 544,6 і 571,4 нм; К+агматин – 543,8 і 571,9 нм; ЕЦД+агматин – 542,1 і 575,8 нм), що є властивими для NOHb.

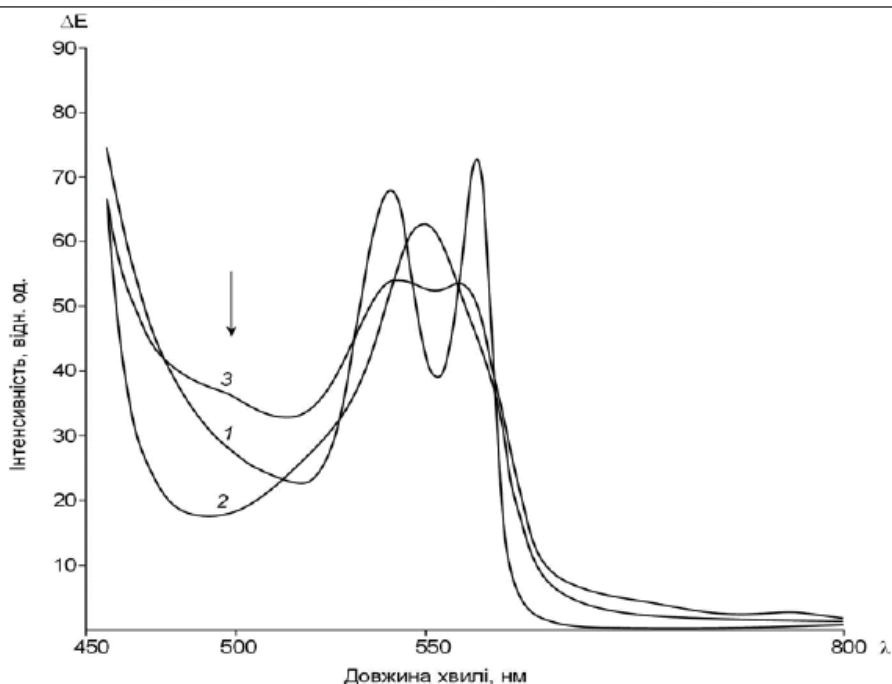


Рис. 4. Електронні спектри при переході  $\text{HbO}_2$  в  $\text{NOHb}$ : 1 –  $\text{HbO}_2$ ; 2 –  $\text{RHb}$ ; 3 –  $\text{NOHb}$ .

Встановлено, що за дії агматину відбувається сповільнення процесу нітрозилування дезоксигемоглобіну у контрольних (в 1,3 разу) та у тварин з ЕЦД (в 1,5 разу) (табл. 2). Отже, введення агматину діабетичним щурам нормалізує час переходу дезоксигемоглобіну в нітрозилгемоглобін, наближаючи його до контрольного рівня.

Таблиця 2

Час переходу дезоксигемоглобіну в нітрузоформу в нормі та за умов ЕЦД на фоні введення агматину ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Показники	Час, хв
Контроль (К)	$15,51 \pm 0,28$
К + агматин	$21,00 \pm 0,36^*$
Діабет (Д)	$10,50 \pm 0,25^*$
Д + агматин	$15,67 \pm 0,58^{**}$

Зменшення швидкості переходу дезоксигемоглобіну в нітрузоформу при введенні агматину за умов ЕЦД, можливо, пов'язано з інгібуванням iNOS та, відповідно, зменшенням пулу ендogenous NO.

Таким чином, виявлені нами зміни у спектральних характеристиках нітрозилгемоглобіну (зсуви у ділянці смуги Soret) та тривалості процесу нітрозилування за умов дії ендogenous інгібітора NO-синтази – агматину в нормі та за ЕЦД можуть бути результатом модифікації глобінового компонента (нітрозилування по SH-групах цистеїну у 93 положенні  $\beta$ -ланцюга), а також порушення зв'язку гема з глобіном унаслідок зміни конформаційного стану молекули цього гемопротейну. Швидкість приєднання NO та інших лігандів до гемоглобіну поряд зі спектральними характеристиками утворених лігандних форм може бути основою розуміння механізмів взаємодії цих молекул за різних патологічних станів.



1. *Артюхов В. Г.* Гемопротеиды: закономерности фотохимических превращений в условиях различного микроокружения. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 1995. С. 1–280.
2. *Білий О. І., Дудок К. П., Лук'янець В. М.* Визначення вмісту гемоглобіну та його лігандних форм у цільній крові за методом абсорбційної спектроскопії. Львів: Вид-во ЛДУ, 1998. 12 с.
3. *Блюменфельд Л. А.* Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода. М.: Сов. наука, 1957. 139 с.
4. *Выдыборец С. В.* Изменения эритроцитов при сахарном диабете // *Врач. дело.* 1990. № 2. С. 11–14.
5. *Дударев В. П.* Роль гемоглобина в адаптации к гипоксии. К.: Наук. думка, 1979. 149 с.
6. *Жукова А. Г., Сазонтова Т. Г.* Гем-оксигеназа: функция, регуляция, биологическая роль // *Нурохіа Medical J.* 2004. Т. 12. № 3–4. С. 30–43.
7. *Зинчук В. В.* Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина // *Успехи физиол. наук.* 2003. Т. 34. № 2. С. 33–45.
8. *Калиман П. А., Филмоненко В. П., Никитченко И. В.* Гемоксигеназная активность в тканях сосудов и сердца крыс при совместном введении ингибитора NO-синтазы и хлорида гемина // *Укр. біохім. журн.* 2008. Т. 80. № 2. С. 128–134.
9. *Коржов В. И., Видмаченко А. В., Коржов М. В.* Монооксид углерода (обзор литературы) // *Журн. АМН України.* 2010. Т. 16. № 1. С. 23–37.
10. Пат. UA45158. Пристрій для отримання і дозованої подачі оксиду азоту і побудови кривих дисоціації оксигемоглобіну в присутності NO / Коробов В.М., Федорович А.М., Соколик Н.В. (Україна); опубл. 17.06.2002р. Бюл. №6.
11. *Романова Т. А., Краснов П. О., Аврамов П. В.* Электронная структура комплекса гема гемоглобина с оксидом азота и динамика атомного остова при физиологической температуре // *Вопросы мед. химии.* 2001. № 3. С. 52–60.
12. *Сибірна Н. О., Люта М. Я., Бурда В. А., Федорович А. М.* Вплив аміногуанідину на фізико-хімічні властивості гемоглобіну за умов цукрового діабету 1-го типу // *Біологія тварин.* 2005. Т. 7. № 1–2. С. 194–199.
13. *Auguet M., Viossat I., Marin and Chabrier J.-G.* Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by agmatine // *Jpn. J. Pharmacol.* 1995. Vol. 69. P. 285–287.
14. *Halaris A., Plietz J.* Agmatine: metabolic pathway and spectrum of activity in brain. *CNS Drugs.* 2007; 21(11): 885-900.
15. *Ozyazgan S., Bicakci B., Ozaydin A. et al.* The effect of agmatine on the vascular reactivity in streptozotocin-diabetic rats // *Pharmacol Res.* 2003 Vol. 48. N 2. P. 133–138.
16. *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.
17. *Shumaev K. B., Gubkin A. A., Serezhnikov V. A. et al.* Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin – and haemoglobin bound dinitrosyl iron complexes // *Nitric Oxide.* 2008. Vol. 18. P. 37–46.
18. *Stamler J. S., Jia L., Eu J. P. et al.* Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient // *Sci.* 1997. Vol. 276. P. 2034–2037.
19. *Thomsen K., Rubin I., Lauritzen M.* NO- and non-NO-, non-prostanoid-dependent vasodilatation in rat sciatic nerve during maturation and developing experimental diabetic neuropathy // *J. Physiol.* 2002. Vol. 543. P. 977–993.
20. *Van Faassen E. E., Bahrami S., Feelisch M. et al.* Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology // *Med. Res. Rev.* 2009. Vol. 29. N 5. P. 683–741.

## THE EFFECTS OF AGMATINE ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF RAT HEMOGLOBIN UNDER EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

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

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

It was determined, that agmatine, the endogenous inhibitor of inducible NO-synthase, after intramuscular injection (20 mg/kg) of rats, induces the changes in Core band of electronic spectres of nitrosohemoglobin and decrease in speed of desoxyhemoglobin to nitrosohemoglobin conversion under the experimental diabetes mellitus. During the analysis of redistribution ligand form of hemoglobin, was found the significant increase in carboxy-hemoglobin content under the diabetes mellitus.

*Key words:* diabetes mellitus, nitric oxide, agmatine, ligand forms of hemoglobin.

## ВЛИЯНИЕ АГМАТИНА НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЕМОГЛОБИНА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

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

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: lyuta.maryana@mail.ua*

Установлено, что эндогенный ингибитор индуцибельной изоформы NO-синтазы – агматин – при вводе его внутримышечно в концентрации 20 мг/кг массы крыс вызывает изменения в области полосы Core электронных спектров нитрозил-гемоглобина и замедление скорости перехода дезоксигемоглобина в нитрозоформу в условиях экспериментального сахарного диабета. В результате проведенного анализа перераспределения содержания лигандных форм гемоглобина выявлено достоверное увеличение уровня карбоксигемоглобина при исследуемой патологии.

*Ключевые слова:* сахарный диабет, оксид азота, агматин, лигандные формы гемоглобина.