

УДК 577.152.361:616.092

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ГЕМОГЛОБІНУ
І АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ЕРИТРОЦИТІВ КРОВІ ЩУРІВ
ЗА АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ**

К. Дудок*, Л. Старикович*, І. Влох, Т. Дудок***, Н. Гринчишин**, Н. Сибірна***

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

*** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
вул. Пекарська, 69, Львів 79010, Україна*

****Інститут фізичної оптики МОН України
вул. Драгоманова, 23, Львів 79005, Україна*

Встановлено, що за тривалої алкогольної інтоксикації щурів змінюються фізико-хімічні та функціональні характеристики компонентів еритроцитів крові – гемоглобіну й окремих ферментів антиоксидантної системи. Ці зміни стосуються зниження спорідненості гемоглобіну до кисню, співвідношення лігандних форм та зростання вмісту лужностійкого гемоглобіну. Спостерігається зниження сумарної каталазної активності, зростання пероксидазної активності метгемоглобіну. Алкогольна інтоксикація впливає не тільки на рівень окисно-відновних процесів у клітині, але й на їх регуляцію, до якої залучені шляхи утворення й утилізації NO, що підтверджено результатами дослідження активності NO-синтази (NOS). Виявлені зміни значною мірою корелюють із рівнем окисних процесів, оцінених за каталазною активністю, активністю NOS, вмістом гідрогену пероксиду.

Ключові слова: алкогольна інтоксикація, гемоглобін, оксигенація, каталаза, NO-синтаза.

Біотрансформація етилового спирту здійснюється, в основному, за участю алкогольдегідрогенази (АДГ) та альдегіддегідрогенази (АльДГ), які є NAD-залежними ферментами. За гострого отруєння алкоголем і хронічної алкогольної інтоксикації в організмі ссавців відбуваються значні зміни не лише у тканинах, які зазнають первинного контакту з алкоголем, але й у тих, де відбувається його метаболізм. Особливу роль у відповідних метаболічних зрушеннях відіграє ацетальдегід – один із основних продуктів розпаду етанолу, накопичення якого призводить до зміни окисно-відновного потенціалу за рахунок утворення надлишку NADH. Зміна співвідношення $NAD^+/NADH$ є однією з причин зниження активності NAD-залежних дегідрогеназ і гальмування пов'язаних з цим окиснювальних реакцій [4]. Крім того, перший метаболіт етанолу – ацетальдегід – може опосередковано стимулювати процеси перекисного окиснення ліпідів, розвиток оксидативного стресу тощо [2]. Ймовірно, що інтенсифікація за алкогольної інтоксикації процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) може призвести до порушення цілісності еритроцитарних мембран, функціонування основних компонентів системи транспорту кисню – еритроцитів і гемоглобіну.

З іншого боку, компоненти системи етанол – ацетальдегід, особливо ацетальдегід – реакційно активні й токсичні сполуки. Вони ковалентно зв'язуються з функціональними групами (-SH, -NH₂, -COO⁻, -OH), які є у складі білків плазми крові [9]. Можна припустити, що подібні модифікації стосуються також гемоглобіну. Підтвердженням цього можуть бути результати проведених нами раніше спектроскопічних досліджень ліган-

доспецифічних комплексів гемоглобіну алкоголізованих щурів і гемоглобіну пацієнтів, хворих на алкоголізм [5, 12, 13]. Не викликає сумнівів те, що зафіксовані хімічні модифікації є молекулярною основою зміни спорідненості гемоглобіну до кисню. Ймовірно, що за цієї патології частина гемоглобіну усувається від транспортування кисню внаслідок окиснення заліза гему і утворення метгемоглобіну (MetHb). Перераховані зміни можуть бути у комплексі обставин виникнення вторинної тканинної гіпоксії за досліджуваної патології.

Варто зазначити, що у сучасній науковій літературі досить обмежена інформація щодо стану кисневотранспортної системи крові за хронічної алкогольної інтоксикації та недостатньо висвітлена роль гемоглобіну й окремих ферментів еритроцита у розвитку і перебігу цієї патології.

Отже, для з'ясування молекулярних механізмів патогенезу за алкогольної інтоксикації нами проведені дослідження співвідношення лігандних форм гемоглобіну, вмісту лужностійкого гемоглобіну, спорідненості гемоглобіну до кисню, пероксидазної активності метгемоглобіну, каталазної активності, активності NO-синтази (NOS), рівня метаболітів кисню та нітрогену.

У дослідженнях використовували самок безпородних білих щурів масою 150–180 г. Тварин утримували на раціоні віварію. Алкогольну інтоксикацію викликали шляхом додавання протягом місяця щоденно у раціон щурів замість питної води 15% розчин етилового спирту. Примусова алкоголізація проведена на базі науково-дослідної лабораторії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Для аналізів використовували цільну кров щурів, одержану після декапітації під ефірним наркозом. Кров збирали у центрифужні пробірки, які містили розчин гепарину (20 МО на 1 см³ крові). Еритроцити відділяли від плазми шляхом центрифугування і тричі промивали фізіологічним розчином.

Спорідненість гемоглобіну до кисню визначали спектрофотометричним методом Іванова [7], співвідношення лігандних форм гемоглобіну визначали за методикою Білого і спів. [1], пероксидазну активність метгемоглобіну – за Зенковим і ін. [6]. Вміст гідрогенпероксиду визначали за Бастор [11], каталазну – за Гріном [3] та NO'-синтазну активність – за Сумбаєвим і ін. [10]. Вміст метаболітів кисню та нітрогену, а також активність ферментів обчислювали з урахуванням концентрації білка у пробах.

З огляду на важливість встановлення ступеня забезпечення киснем органів і тканин за патології, викликаній алкогольною інтоксикацією, ми провели порівняльні дослідження кінетики насичення гемоглобіну щурів киснем методом побудови кривих оксигенації. Установлено, що за тривалої алкогольної інтоксикації знижується спорідненість гемоглобіну до кисню (рис. 1). Параметр P₅₀ свідчить про те, що насичення гемоглобіну алкоголізованих щурів відбувається за достовірно вищих значень парціального тиску кисню у середовищі, ніж гемоглобіну контрольних тварин (табл. 1).

Спричинена алкогольною інтоксикацією прискорена віддача кисню і сповільнене насичення призводять до порушення динамічної рівноваги дезоксигемоглобін ↔ оксигемоглобін. Останнє може бути причиною виникнення гіпоксії у тканинах.

Підставою зміни спорідненості гемоглобіну до кисню може бути зміна конформації гемоглобіну, оскільки у процесі оксигенації молекула гемоглобіну перебуває у переході між двома конформаційними станами – напруженому і розслабленому (R ↔ T). Одним із факторів зміни конформації гемоглобіну є модифікація глобінової компоненти, яка може бути спричинена ендогенними метаболітами чи сполуками екзогенного

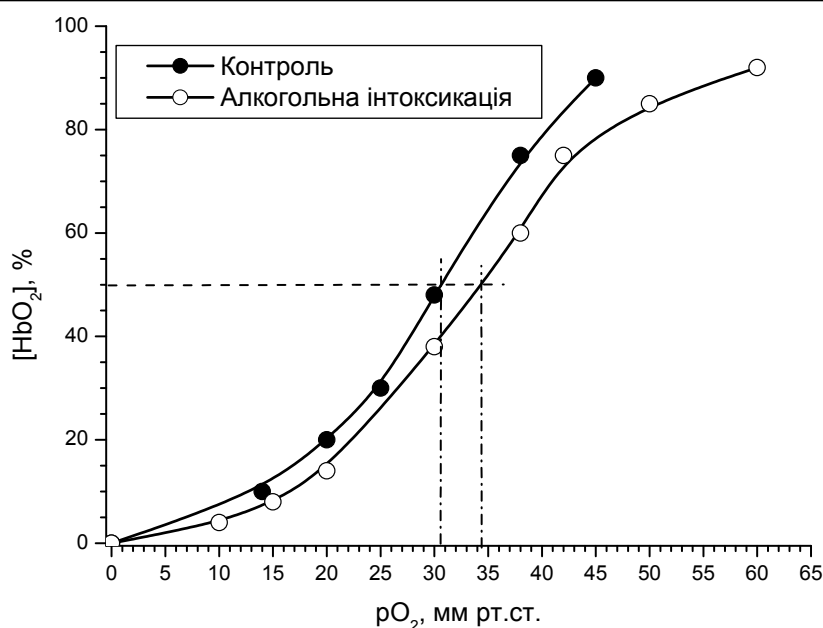


Рис. 1. Типові криві насичення гемоглобіну киснем контрольних щурів і за тривалої алкогольної інтоксикації.

Таблиця 1

Кінетика насичення гемоглобіну щурів киснем за різних значень парціального тиску кисню

№ п/п	Варіанти досліджу	n	P ₅₀ , мм. рт. ст. M±m	P ₇₅ , мм. рт. ст. M±m	P ₉₀ , мм. рт. ст. M±m
1.	Контроль	9	27,80±0,35	37,50±0,58	45,00±0,62
2.	Алкоголізовані щурі	15	31,20±0,86*	44,60±0,50*	57,20±0,68*

Примітка. * – Різниця достовірна щодо контролю P≤0,05.

походження. У наших дослідженнях особливої уваги заслуговує ацетальдегід, який здатний реагувати з білками крові, викликаючи їх модифікацію [2].

Інша причина порушення спорідненості гемоглобіну до кисню - зміна співвідношення лігандних форм гемоглобіну (табл. 2).

Результати досліджень свідчать про зростання вмісту сульф- та метгемоглобіну у гемолізатах еритроцитів крові алкоголізованих щурів. Однак отримані дані ще не дають

Таблиця 2

Співвідношення лігандних форм гемоглобіну у крові щурів за алкогольної інтоксикації протягом місяця (%), (M±m)

№ п/п	Варіанти досліджу	n	Лігандні форми гемоглобіну				
			RHb	HbO ₂	HbCO	SHb	MetHb
1.	Контроль	11	0,10±0,05	91,2±1,8	2,10±0,08	3,6±0,4	3,2±0,3
2.	Дослід	6	0,10±0,05	87,1±0,6	2,6±1,0	5,4*±0,4	4,7*±0,2

Примітка. * – Різниця достовірна щодо контролю, P≤0,05.

остаточних підстав для пояснення зниження спорідненості гемоглобіну до кисню за алкогольної інтоксикації.

Значний вплив на киснево-транспортні властивості гемоглобіну може мати також вміст лужностійкого гемоглобіну. Отримані результати свідчать про достовірне зростання вмісту лужностійкого гемоглобіну у гемолізатах крові алкоголізованих щурів (табл. 3). Зазвичай стійкістю до дії лугів відзначається фетальний гемоглобін (FНb). Однак не виключено, що за умов досліджуваної патології лужностійка фракція може бути представлена не лише FНb, але й іншими компонентами гетерогенної системи гемоглобіну, які зазнали модифікації внаслідок дії екстремальних факторів.

Підвищення вмісту лужностійкого гемоглобіну у гемолізатах крові дослідних щурів може мати компенсаторно-приспосувальний характер в умовах гіпоксії, оскільки гемоглобін типу фетального володіє підвищеною спорідненістю до кисню. Однак у наших експериментах спостерігали зсув кривих оксигенації вправо. Цей факт непрямо може свідчити про перевагу інших механізмів регулювання оксигенації гемоглобіну за алкогольної інтоксикації, зокрема, збільшення вмісту фосфатів як неорганічних, так і органічних (2,3 – BPG, АТР, Pin), а отже, і про зміну у регулюванні метаболічних процесів і активності антиоксидантної системи.

З огляду на це ми дослідили пероксидазну активність метгемоглобіну, а також сумарну каталазну активність (табл. 4, 5).

Як відомо, систему антиоксидантного захисту забезпечує низка ферментів, у тому числі пероксидаза і каталаза. За умов оксидативного стресу метгемоглобін може долучатися до знешкодження пероксидів, компенсуючи втрати загальної пероксидазної активності.

Отже, зростання пероксидазної активності гемоглобіну, очевидно, має частково знешкоджувати пероксиди, генеровані за участі метаболітів алкоголю, у тому числі й

Таблиця 3

Вміст лужностійкого гемоглобіну у крові щурів у нормі та за алкогольної інтоксикації (% , $M \pm m$)

№ п/п	Варіанти досліджу	n	Гемолізати крові
1	Контроль	8	6,80±0,35
2.	Дослід	18	8,90±0,38*
	Т		2,5

Примітка. * – Різниця достовірна щодо контролю, $P \leq 0,05$. Т – порівняння контролю з дослідом.

Таблиця 4

Пероксидазна активність метгемоглобіну щурів і сумарна каталазна активність гемолізатів еритроцитів у нормі та за алкогольної інтоксикації

№ п/п	Варіанти досліджу	n	Пероксидазна активність MetHb, ($M \pm m$), $\text{мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot [\text{Hb}]^{-1}$	Сумарна каталазна активність, ($M \pm m$), $\text{нмоль} \text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг білка}^{-1}$
1.	Контроль	12	1,72±0,06	301,46±20,82
2.	Алкогольна інтоксикація	8	3,10±0,12*	28,49±6,87*

Примітка. * – Різниця порівняно з контролем ймовірна, $P \leq 0,05$.

Таблиця 5

Вміст гідрогену пероксиду в еритроцитах контрольних щурів та за алкогольної інтоксикації ($M \pm m$, нмоль $H_2O_2 \cdot mg^{-1}$ білка)

Варіанти досліджу	n	Вміст гідрогену пероксиду
Контроль	11	1,03±0,25
Алкогольна інтоксикація	4	1,58±0,27
T		1,53

Примітка. T – порівняння контролю з алкогольною інтоксикацією.

ацетальдегіду. Крім того, за алкогольної інтоксикації серед очікуваних активних форм кисню, ймовірно, може утворюватися ще й гідрогену пероксид.

З літератури відомо, що вміст H_2O_2 у клітинах значною мірою залежить від збалансованості процесів окиснення та відновлення. Шляхи утворення цього активного метаболіту кисню можуть бути неферментативними й ензиматичними. Неферментативні шляхи утворення H_2O_2 переважно пов'язані з факторами, які інтенсифікують процеси ПОЛ, наприклад, за дії іонізуючого випромінювання, важких металів, деяких ксенобіотиків [10].

Джерелом утворення пероксиду можуть бути і ферментативні реакції, каталізовані оксидазами, які переносять два електрони на молекулу кисню, наприклад, гліколатоксидаза, оксидази α -гідроксикислот, оксидази L-амінокислот, супероксиддисмутаза, ксантиноксидаза тощо. Відомо, що у клітинах еукаріот ферменти, які призводять до накопичення пероксиду, локалізовані переважно у пероксисомах, а захист від цього активного метаболіту кисню здійснюється в основному каталазою. Особливістю функціонування цих органел є те, що їхнє утворення, а також біосинтез деяких ферментів антиоксидантної системи може індукуватися низкою факторів, у тому числі алкогольною інтоксикацією, ксенобіотиками, фармакологічними лікарськими препаратами [6, 10].

Стійкість клітин ссавців до дії пероксиду гідрогену узалежнена від глутатіонпероксидазної та каталазної систем. Глутатіонпероксидаза зазвичай функціонує за малих концентрацій H_2O_2 , а каталаза – за високих. Рівень активності цих ферментів регулюється різними факторами, у тому числі й генерацією пероксиду.

Оскільки в еритроцитах ссавців основним ферментом, який розщеплює пероксид гідрогену, є каталаза, очікуваним наслідком оксидативного стресу за умов алкогольної інтоксикації буде зростання каталазної активності.

Однак дослідження каталазної активності за умов тривалої алкогольної інтоксикації показало, що відбувається достовірне зниження активності цього ферменту порівняно з контролем (майже в 11 разів) (табл. 4). Така зміна активності каталази зумовлюється, в основному, впливом на фізико-хімічні властивості мембранних структур окисної модифікації ліпідних або білкових компонент і зменшенням виходу у розчинну фракцію цього ферменту.

Можливою також є інактивація каталази внаслідок безпосереднього впливу етанолу чи продуктів його метаболізму на структурну організацію цього ферменту, або пригнічення відповідних біосинтетичних процесів у попередниках еритроїдних клітин кісткового мозку токсичною дією ацетальдегіду. З результатів досліджень вмісту гідрогену пероксиду випливає, що за алкогольної інтоксикації щурів відбувається зростання (на 50%) вмісту цієї активної форми кисню, хоча рівень достовірних змін є невисоким (табл. 5).

Отже, незважаючи на значне зниження загальної каталазної активності у гемолізатах еритроцитів, суттєвих змін у вмісті H_2O_2 не спостерігається.

Таблиця 6

Активність NOS в еритроцитах контрольних щурів та за алкогольної інтоксикації
($M \pm m$, $\text{нмоль H}_2\text{O}_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{білка}$; $n=6-3$)

Варіанти досліджу	Сумарна NOS	У присутності ЕДТО
Контроль	4,95±0,49	4,21±0,29
Алкогольна інтоксикація	1,19±0,52	0,76±0,12
T ₁	5,29	11,12
T ₂	0,30	1,32

Примітка. T₁ – порівняння контролю з алкогольною інтоксикацією; T₂ – порівняння сумарної активності NOS та у присутності ЕДТО.

Оскільки алкогольна інтоксикація впливає не тільки на рівень окисно-відновних процесів у клітині, але й на їх регулювання, до якого залучені шляхи утворення й утилізації NO, нами проведено дослідження активності NO-синтази.

Сумарну NO-синтазну активність ми визначали у присутності субстратів NADPH та L-аргініну. Паралельно ставився дослід без аргініну, але у присутності NADPH, тобто визначено було NADPH-оксидазну активність, характерну і для інших білків, у тому числі й гемоглобіну.

Крім сумарної NO-синтазної активності (у присутності іонів кальцію та магнію) нами тестована також активність індукцибельної форми цього ферменту у присутності ЕДТО. Остання зв'язує іони двовалентних катіонів, утворюючи з ними комплекси. Однак у наших дослідках статистично достовірної відмінності між цими варіантами не виявлено. Отже, можна вважати, що індукцибельна форма ферменту в еритроцитах нами не встановлена.

У результаті встановлено, що значення NO-синтазної активності за алкогольної інтоксикації є меншими за контроль майже учетверо. Така значна відмінність може свідчити про порушення регуляторних процесів, пов'язаних з cGMP-залежними протеїнкіназами.

Отже, отримані результати дають підстави вважати, що зниження спорідненості гемоглобіну до кисню, яке спостерігається за алкогольної інтоксикації, очевидно, є наслідком системних змін, пов'язаних із ймовірою окисною модифікацією окремих амінокислотних залишків гемоглобіну, порушенням співвідношення лігандних форм, утворенням нітрозоподібних, залізонітрозильних комплексів гемоглобіну, зростанням лужнотривалого гемоглобіну. Зниження сумарної каталазної активності свідчить про посилення процесів пероксидації в еритроцитах, що, однак, частково компенсується зростанням метгемоглобінпероксидазної активності.

Алкогольна інтоксикація впливає не лише на рівень окисно-відновних процесів у клітині, але й на їх регулювання, до якого залучені шляхи утворення й утилізації NO, що підтверджено дослідженнями активності NOS.

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: Методичні вказівки. Львів: Вид. центр ЛДУ, 1998. 12 с.
2. Божко Г. Х., Волошин П. В. Действие этанола на белки тканей и сыворотки крови человека и животных // Успехи соврем. биол. 1989. Т. 108. Вып. 1 (4). С. 52–65.
3. Гирин С. В. Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах // Лаб. диагностика. 1999. № 4. С. 45–46.
4. Гулий М. Ф. Про метаболічні порушення та корекцію їх в організмі людини за алкоголізму та наркоманії // Укр. біохім. журн. 2000. Т. 72. № 6. С. 103–105.
5. Дудок Е. П., Влох І. І., Сибирная Н. А. и др. Антиоксидантный статус некоторых

- компонентов крови лиц с алкогольной зависимостью // Биоантиоксидант: Мат. VII Всерос. конф. 25–26 октября 2006 года, г. Москва. М., 2006. С. 120–121.
6. *Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньшова Е. Б.* Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспект. М.: Маик, 2001. 343 с.
 7. *Иванов Ю. Т.* Модификация спектрофотометрического метода определения кислородно-диссоциационных кривых гемоглобина // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. 1975. Т. 79. № 11. С. 122–128.
 8. *Кіселик І. О., Луцик М. Д., Шевченко Л. Ю.* Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології // Лаб. діагностика. 2001. № 3. С. 43–45.
 9. *Козак Л. П., Коник І. В., Тимочко М. Ф.* та ін. Особливості порушення механізмів киснезалежних реакцій під час алкогольної інтоксикації // Експеримент. та клін. фізіол. і біохім. 2000. № 1. С. 43–46.
 10. *Сумбаев В. В., Ясинская И. М.* Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс // Совр. пробл. токсикол. 2000. Т. 3. С. 3–5.
 11. *Bartosz G.* Detekcja nadtlenu wodorodu. Detekcja wytwarzania H₂O₂ na podstawie utleniania czerwieni fenolowej // Druga twarz tlenu. Wyd. naukowe PMN: Warszawa, 1995. S. 371.
 12. *Dudok K., Dudok T., Vlokh I.* et al. Optical Spectra of Hemoglobin Taken from Alcohol Dependent Humans // Ukr. J. Phys. Opt. 2005. Vol. 6. N 4. P. 142–145.
 13. *Vlokh R., Vlokh I., Moroz O., Dudok K.* The hemoglobin changes of white rats with and without ethanol intoxication, heredity problem // XIII World Congress of Psychiatry. Cairo, September 10–15, 2005. P. 487.

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PECULIARITIES OF HAEMOGLOBIN
AND THE BLOOD ERYTHROCYTE ENZYMES ACTIVITY OF THE RATS
AT THE DURATION OF ETHANOL INTOXICATION**

K. Dudok*, L. Starykovich*, I. Vlokh, T. Dudok***, N. Grinchishin**, N. Sybirna***

**Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine*

***Danylo Galickii National Medical University
69, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine*

****Institute of Physical Optics
23, Dragomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

It has been determined that physical, chemical and functional characteristics of haemoglobin undergo changes at the duration of ethanol intoxication. This changes have to do with the decrease of haemoglobin affinity to oxygen, ligand forms correlation and an increase of basetable haemoglobin contents. We observed the decrease of total katalase activity and an increase of methaemoglobin peroxydase activity. Ethanol intoxication affects not only the redox processes level in the cell but also their regulation which involves the pathways of formation and utilization of NO. This is confirmed in the results of NO-synthase (NOS) investigation and the separate nitrogen metabolites correlation. The revealed changes considerably correlate with the oxidizing processes level which were estimated by the katalase activity, NOS activity, the hydrogen peroxyde contents.

Key words: ethanol intoxication, haemoglobin, oxigenation, katalase, NO-synthase.

Стаття надійшла до редколегії 22.05.08

Прийнята до друку 09.06.08