



УДК 612.111: 612.393

## ВПЛИВ СПІРОКАРБОНУ ТА ПОХІДНИХ ПІРОЛОПІРИМІДИНДІОНІВ НА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛІГАНДНИХ ФОРМ ГЕМОГЛОБІНУ *IN VITRO*

**К. П. Дудок<sup>1</sup>, А. М. Федорович<sup>1</sup>, Т. Г. Дудок<sup>2</sup>, О. Н. Речицький<sup>3</sup>  
В. А. Єресько<sup>3</sup>, А. В. Шкаволяк<sup>4</sup>, Н. О. Сибірна<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

<sup>2</sup>Інститут фізичної оптики МОН України, вул. Драгоманова, 23, Львів 79005, Україна

<sup>3</sup>Херсонський державний університет, вул. 40 років Жовтня, 27, Херсон 73002, Україна

<sup>4</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького  
вул. Пекарська, 69, Львів 79010, Україна

Досліджували вплив гетероциклічної спіросполуки спірокарбону та похідних піролопіримідиндіонів на динаміку перерозподілу лігандних форм гемоглобіну (R<sub>h</sub>Hb, HbO<sub>2</sub>, HbCO, SHb, MetHb), його лужну стабільність, пероксидазну активність метгемоглобіну і на спектрофотометричні характеристики комплексів CNMetHb-Coomassі G-250 крові здорових донорів.

Показано, що за дії спірокарбону дещо знижується вміст HbO<sub>2</sub>. У дослідях з використанням похідних піролопіримідиндіонів середні значення вмісту HbO<sub>2</sub> перебувають у межах контролю. Проведено аналіз електронних спектрів HbO<sub>2</sub>, MetHb, CNMetHb і комплексів CNMetHb-Coomassі G-250.

Показано достовірне зростання вмісту лужностійкого гемоглобіну та зниження пероксидазної активності за дії спірокарбону. Дія похідних піролопіримідиндіонів приводить до підвищення пероксидазної активності метгемоглобіну досліджуваних зразків крові.

**Ключові слова:** гемоглобін, лігандні форми, електронні спектри, спірокарбон, похідні піролопіримідиндіонів, лужна стійкість, пероксидаза.

### ВСТУП

Відомо, що різного типу захворювання (алкоголізм, діабет, променева патологія тощо) супроводжуються широким спектром метаболічних порушень і тому лікування, а також правильна діагностика потребують ретельного підбору лікарських препаратів, нових протекторних сполук, які здатні не лише запобігати розвиткові певної патології, але й сприяти нормалізації обмінних процесів загалом. Сьогодні у лабораторній

діагностиці, наукових дослідженнях, лікарській практиці використовуються новосинтезовані препарати, нові лікарські форми. І тому особливої уваги заслуговують дослідження їхніх фізико-хімічних властивостей, токсичності, способів введення в організм, механізмів впливу на ті чи інші структури організму. Крім того, перспективними і цінними є дослідження молекулярних механізмів впливу нових біологічно активних синтетичних препаратів як на окремі ланки обміну речовин в організмі, так і на їхню взаємодію з важливими біомакромолекулами, а також із метаболітами різного походження. Не менш важливими є дослідження цих сполук як маркерів ідентифікації структурно-функціональних змін біологічно важливих макромолекул, чи надмолекулярних комплексів.

Відомо, що периферична кров є тією системою, на якій позначається дія на організм токсичних хімічних сполук довкілля, фізичних чинників, зв'язування і транспорт ендогенних метаболітів, сполук екзогенного походження. Перш за все, це стосується кисневотранспортної, імунокомпетентної та інших функціональних систем крові.

У цьому плані унікальними індикаторами виступають білки плазми крові, еритроцити і гемоглобін. Особливої уваги заслуговує кисневотранспортний білок гемоглобін – основний білок еритроцитів. Передусім, головна функція цього дихального білка полягає у приєднанні Оксигену та вивільненні його в органах і тканинах. І, власне, цей процес узалежнений від багатьох факторів як ендогенного, так і екзогенного походження. Факторами екзогенного походження можна вважати й окремі лікарські препарати, токсичні сполуки.

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 при взаємодії з гемоглобіном змінювати його конформацію, так звані ліганди (Оксиген, Гідроген, карбон оксид, органічні та неорганічні іони). Опосередкований вплив реалізується через хімічні сполуки чи фізичні фактори, що здатні змінювати характер взаємодії цього білка з лігандами через зміну умов середовища або через утворення специфічних метаболітів [5, 16, 18]. Крім того, надходження в організм токсичних сполук довкілля або дія фізичних чинників спричиняє посилений гемоліз еритроцитів, що призводить до появи гемоглобіну у плазмі периферичної крові, подальше його окиснення до метгемоглобіну та генерації супероксид-аніон радикалу ( $O_2^-$ ) [9]. Водночас відомо, що при взаємодії гемоглобіну з  $O_2$  залізо гема перебуває у низькоспіновому стані та проявляє щодо  $O_2$  іонно-радикальні властивості. Конформаційні зміни у структурі гема гемоглобіну, зміна його гідрофобності у зв'язку з появою в його оточенні аніонів приводить до вивільнення Оксигену у формі супероксид аніону і переходу  $Fe^{2+}$  у  $Fe^{3+}$  [3, 6]. З іншого боку, розпад гемоглобіну зумовлює вивільнення гема, який є активним прооксидантом. Останнє може спричинити порушення рівноваги антиоксидант  $\leftrightarrow$  прооксидант.

Отже, процес окиснення гемоглобіну, зміна його конформації та розпад можуть прискорюватися за введення в організм ряду лікарських препаратів, потрапляння гемолітичних отрут тощо.

Варто враховувати і те, що використання у медичній практиці низькомолекулярних сполук – біорегуляторів – може зумовлювати утворення відповідних асоціатів за рахунок міжмолекулярних взаємодій, що позначиться на нормальному перебігу окисно-відновних процесів у тканинах організму.

Отже, різнобічні дослідження впливу фізичних і хімічних факторів ендогенного чи екзогенного походження та новосинтезованих біологічно активних сполук на структурно-функціональні особливості гемоглобіну є актуальними, становлять теоретичний і практичний інтерес.

Попередні дослідження фармакологічних властивостей спірокарбону вказують на його низьку токсичність (3 000 мг/кг маси) [10, 14]. Похідні піролопіримідиніонів останніми роками привертають до себе увагу завдяки їхній високій біологічній активності. Показано, що сполуки цього ряду мають цінні лікарські властивості [10]. Однак ці властивості мало вивчені, а практичне застосування цих препаратів потребує всебічних досліджень. Метою даної роботи було вивчення впливу *in vitro* речовин № 1, № 2 та № 3 на співвідношення лігандних форм гемоглобіну у цільній крові, спектри поглинання лігандоспецифічних комплексів ціанметгемоглобіну, лужної стабільності гемоглобіну, пероксидазної активності метгемоглобіну периферичної крові здорових донорів.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У наших дослідженнях були використані органічні сполуки, синтезовані на кафедрі органічної та біологічної хімії Херсонського державного університету. Перша з них: спіросполука, яка складається з двох гетероциклів і названа спірокарбоном (речовина № 1), дві інші – похідні піролопіримідиніонів: 1,6-диметил-4-феніл-1,2,3,4,5,7-гексагідропіроло-[3,4-d]-піримідиніон-2,5(1H) (речовина № 2) та (1,6-диметил-4-(2-трифлуорометилфеніл)-1,2,3,4,5,7-гексагідропіроло-[3,4-d]-піримідиніон-2,5(1H) (речовина № 3) [10, 14].

Для аналізів використовували цільну периферичну кров практично здорових донорів і гемоглобін, виділений з крові цих донорів. Кров відбирали загальноприйнятим методом із ліктьової 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). Процедура відмивання повторювали 5 разів при 500 g. Гемоглобін виділяли за методикою Драбкіна [20]. Концентрацію гемоглобіну визначали за методом Кушаковського [13]. Визначення 5 лігандних форм гемоглобіну: дезокси-, окси-, карбокси-, сульф- і метформи (RHb, HbO<sub>2</sub>, COHb, SHb, MetHb) у цільній крові проводили за методом [1, 19]. Вміст лужностабільного гемоглобіну визначали за методом Зінгера в модифікації [15], пероксидазну активність метгемоглобіну визначали за методом [11]. Для спектроскопічних аналізів використовували гемоглобін в оксиформі, метформі та у ціанметформі (CNMetHb). Для вивчення впливу речовин № 1, № 2, № 3 на досліджувані параметри гемоглобіну еритроцитарну масу інкубували з розчинами цих речовин у співвідношенні 1:3. Вихідні концентрації розчинів: речовина № 1 – 1 мг/мл; речовина № 2 – 1 мг/мл; речовина № 3 – 0,5 мг/мл. Після 1 год інкубації проводили гемоліз еритроцитів, центрифугували, виділяли гемоглобін. Одержаний гемоглобін використовували для подальших досліджень. Контролем були гемолізати неінкубованих еритроцитів. Як специфічний ліганд („зонд”) для спектроскопічних досліджень гемоглобіну використовували органічний барвник Coomassie G-250 фірми Fluka (Швейцарія). Проби для аналізів готували за схемою: до 2 мл розчину CNMetHb (50 мкМ) додавали 2 мл розчину Coomassie G-250 (50 мкМ). Через 10 хв записували спектри поглинання утворених комплексів на спектрофотометрі Specord M-40 у діапазоні довжин хвиль 450–750 нм.

Отримані результати обробляли статистично з використанням критерію Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Унікальна властивість гемоглобіну – його здатність зворотно зв'язувати O<sub>2</sub> – пов'язана зі специфікою організації глобули гемоглобіну, динамікою його лігандних форм, вміст яких залежить як від електронної структури порфірину, так і від конформації

білкового компонента. Оскільки статична та динамічна конформація гемоглобіну може змінюватися за дії різних факторів, як було сказано вище, то ми вивчали вплив хімічних сполук – речовин № 1, № 2 та № 3 – на окремі фізико-хімічні та функціональні характеристики гемоглобіну.

Багаторазові порівняльні дослідження вмісту п'яти лігандних форм гемоглобіну здорових донорів і за патологій різної етіології, проведені нами раніше, дають змогу зробити висновок, що вміст  $\text{HbO}_2$  у крові здорових пацієнтів перебуває у межах 94–97% [1, 2, 4, 16, 21–23]. Результати аналізів п'яти лігандних форм гемоглобіну, представлені у даній роботі, свідчать про незначний перерозподіл його окремих форм у досліджуваних варіантах донорської крові (табл. 1). Зокрема, спостерігається деяке зниження вмісту оксигемоглобіну за дії речовини № 1. У цих же варіантах досліджуваного вмісту метгемоглобіну досягав 1,5%. Однак відомо, що вміст метгемоглобіну у здорових пацієнтів, як правило, становить менше одного відсотка [13]. У варіантах із речовинами № 2 і № 3 вміст метгемоглобіну був у межах норми, а середні значення вмісту оксигемоглобіну дорівнювали 94,16%. Спостерігався незначний перерозподіл карбокси- та сульфгемоглобіну.

**Таблиця 1. Вміст лігандних форм гемоглобіну за дії спірокарбону (речовина № 1) та похідних піролопіримідиндіонів (речовини № 2 і № 3) у системі *in vitro*, ( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ ), %**

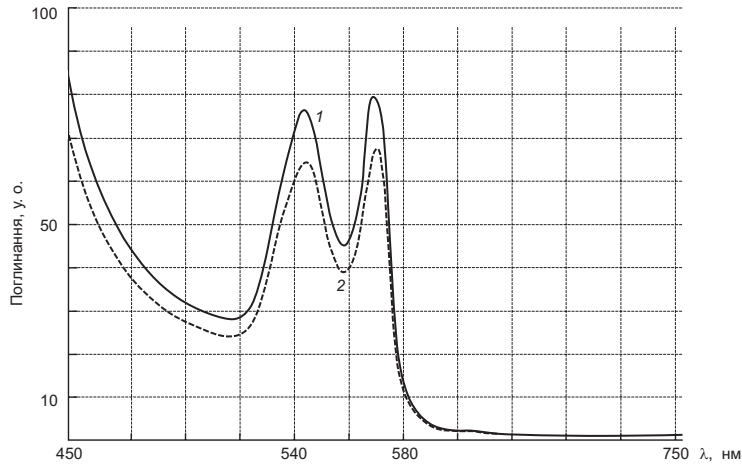
**Table 1. The amount of hemoglobin ligand forms under the effect of Spirocarbon (substance N1) and piropirymidyndion derivatives (substances N2, N3) *in vitro*, ( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ ), %**

Варіанти	Лігандні форми				
	RHb	HbO <sub>2</sub>	COHb	SHb	MetHb
Варіант 1 (Контроль) (n=10)	0,46±0,03	94,18±0,42	4,27±0,48	0,73±0,42	0,36±0,15
Варіант 2 (Еритроцити+речовина №1) (n=8)	0,79±0,01	92,05±1,19	4,63±0,77	0,96±0,45	1,48±0,58
Варіант 3 (Еритроцити+речовина №2) (n=6)	0,10±0,01	94,16±1,17	5,02±0,64	0,13±0,07	0,69±0,07
Варіант 4 (Еритроцити+речовина №3) (n=6)	0,10±0,01	94,45±0,35	4,55±0,84	0,44±0,25	0,56±0,06

Структурний стан гемоглобіну оцінювали за характеристичними значеннями спектрів поглинання. Нами проведені порівняльні спектроскопічні дослідження лігандних форм гемоглобіну крові здорових донорів: окси-, мет-, ціанметформи ( $\text{HbO}_2$ , MetHb, CNMetHb), їх комплексів з Coomassie G-250 (контроль) і за дії препаратів № 1, № 2, № 3 у діапазоні довжин хвиль 450–750 нм. Результати представлені на рис. 1–4 і табл. 2.

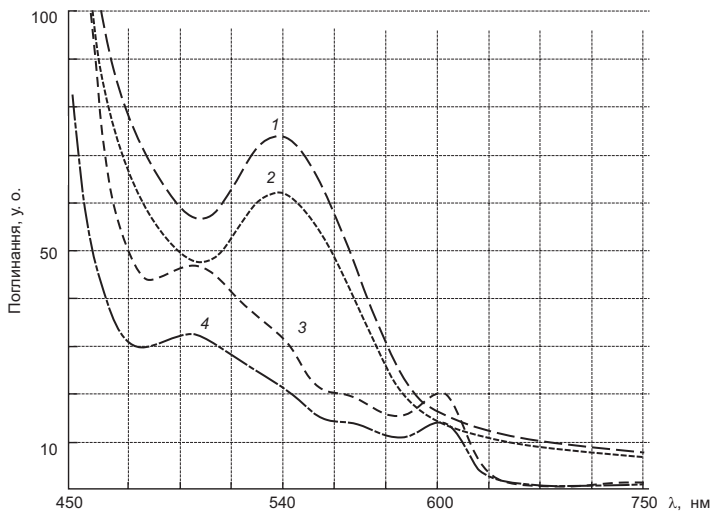
Аналіз електронних спектрів оксигемоглобіну дає підстави стверджувати, що речовина № 1 у використовуваній концентрації не впливає на спектр поглинання  $\text{HbO}_2$  (рис. 1).

На рис. 2 представлені електронні спектри CNMetHb та MetHb крові здорових донорів після інкубації еритроцитів із речовинами №1 у діапазоні довжин хвиль



**Рис. 1.** Електронні спектри оксигемоглобіну ( $\text{HbO}_2$ ) крові здорових донорів *in vitro*:  
 1 – без дії спірокарбону; максимуми – 541,7 і 576,6 нм;  
 2 – за дії спірокарбону; максимуми – 541, 7 і 576,6 нм

**Fig. 1.** Oxyhemoglobin ( $\text{HbO}_2$ ) electron spectra of healthy donors' blood *in vitro*:  
 1 – without spirocarbon; maxima – 541,7nm, 576,6 nm;  
 2 – incubated with spirocarbon; maxima – 541, 7nm, 576,6 nm



**Рис. 2.** Електронні спектри лігандних форм гемоглобіну крові здорових донорів з додаванням препарату № 1 (спірокарбону) *in vitro*:

- 1 – CNMetHb; максимум поглинання – 542,2 нм;
- 2 – CNMetHb + спірокарбон; максимум поглинання – 541,1 нм;
- 3 – MetHb; максимум поглинання – 501 і 631,2 нм;
- 4 – MetHb + спірокарбон - максимум поглинання – 499,0 і 630,4 нм

**Fig. 2.** Hemoglobin ligand forms electron spectra of healthy donors' blood under the effect of substance N1 (Spirocarbon) *in vitro*:

- 1 – CNMetHb; absorption maxima – 542,2 nm;
- 2 – CNMetHb + spirocarbon; absorption maxima – 541,1 nm;
- 3 – MetHb; absorption maxima – 501 і 631,2 nm;
- 4 – MetHb + spirocarbon; absorption maxima – 499,0 і 630,4 nm

Таблиця 2. Характеристичні параметри електронних спектрів лігандних форм гемоглобіну крові здорових донорів за впливу спірокарбону (речовина № 1), похідних піролопіримідиндіонів (речовини № 2, № 3),  $\lambda$ , нмTable 2. Characteristic parameters of healthy donors' blood hemoglobin ligand form electron spectra under the effect of Spirocarbon (substance N1), pirolopirymidindion derivatives (substance N2, N3),  $\lambda$ , нм

Варіанти досліджу	Максимум смуги поглинання, $\lambda$ , нм	Відносне зміщення максимумів смуг, $\lambda$ , нм:		
		щодо смуги CNMetHb	щодо смуги Coomassi G-250	щодо контрольної проби
Розчин Coomassi G-250	*584,0	+41,8	–	+ 29,1–
CNMetHb	*542,2	–	+41,8	-12,9
Комплекс CNMetHb-Coomassi G-250 (Контрольна проба) (n = 9)	*554,9	+12,7	-29,1	–
Інкубація з речовинами №1, №2, №3 еритроцитів. Комплекс CNMetHb-Coomassi G-250				
За дії речовини № 1 (n = 5)	*554,9	+ 12,7	-29,1	0
За дії речовини № 2 (n = 5)	*554,9	+ 12,9	-29,1	0
За дії речовини № 3 (n = 5)	*556,1	+ 13,9	-27,9	+1,2
Додавання до розчинів гемоглобіну розчинів речовин №1, №2, №3. Комплекс CNMetHb-Coomassi G-250				
HbO <sub>2</sub> + речовина № 1 (n = 4)	*556,1	+13,9	-27,9	+1,2
HbO <sub>2</sub> + речовина № 2 (n = 4)	*558,0	+15,8	-26,0	+3,2
HbO <sub>2</sub> + речовина № 3 (n = 4)	*556,7	+14,5	-27,3	+1,8
Примітки. „*” – усереднені значення довжин хвиль характеристичних максимумів; „+” – зміщення характеристичних максимумів вправо; „–” – зміщення характеристичних максимумів вліво.				

450–750 нм. Як випливає з отриманих спектрів, для CNMetHb максимум поглинання становить 542,2 нм; для CNMetHb + Спірокарбон максимум поглинання – 541,1 нм. Для MetHb у видимій ділянці спектра характерні дві смуги. У наших дослідженнях ми спостерігали для MetHb смугу при 501 нм і 631,2 нм. У зразках MetHb + Спірокарбон максимуми характеристичних смуг були трохи зміщені (499,0 та 630,4 нм). Незначне зміщення максимуму поглинання простежується і для варіанта CNMetHb + Спірокарбон.

Отримані результати дають привід для розширених пошуків методів виявлення впливу використовуваних сполук на гемоглобін.

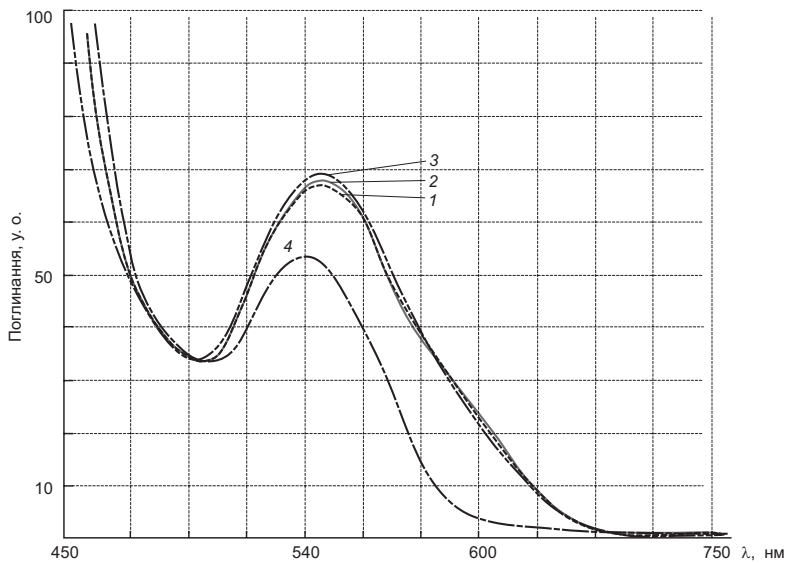
Доречно припустити, що використані у дослідженнях препарати можуть взаємодіяти з білковим компонентом гемоглобіну, не впливаючи на оточення гема та його структуру. У такому випадку спектральні характеристики гемоглобіну у видимій ділянці спектра не будуть суттєво змінюватися.

З огляду на це ми провели серію досліджень, у яких використали барвник Coomassi G-250, що має у своїй структурі хромофори бензоїдної та хіноїдної природи, а також активні екзоциклічні групи (карбонільні, сульфгідрильні). Ці групи здатні вступати у взаємодію з відповідними радикалами на поверхні білкової молекули, утворюючи стабільні забарвлені комплекси з характерними смугами у видимій ділянці

спектра. Кількість утвореного комплексу пропорційна кількості доступних для ліганду груп. У разі зв'язування чи екранування активних груп на поверхні білкової глобули відповідними сполуками можна очікувати зміни спектрів поглинання комплексів. Отже, характер взаємодії гемоглобіну з органічним барвником може дати інформацію про перерозподіл на поверхні макромолекули полярних або неполярних груп, викликаний дією екзогенних сполук або ендогенними метаболітами.

Базуючись на попередніх наших дослідженнях гемоглобінів за алкогольної інтоксикації різної етіології [21–23], ми провели подібні спектроскопічні аналізи комплексів CNMetHb + Coomassi G-250 за впливу речовин № 1, № 2, № 3 *in vitro*.

Як свідчать дані, наведені на рис. 3, 4 і табл. 2, спектральні характеристики лігандоспецифічних комплексів Coomassi G-250 з гемоглобінами, виділеними

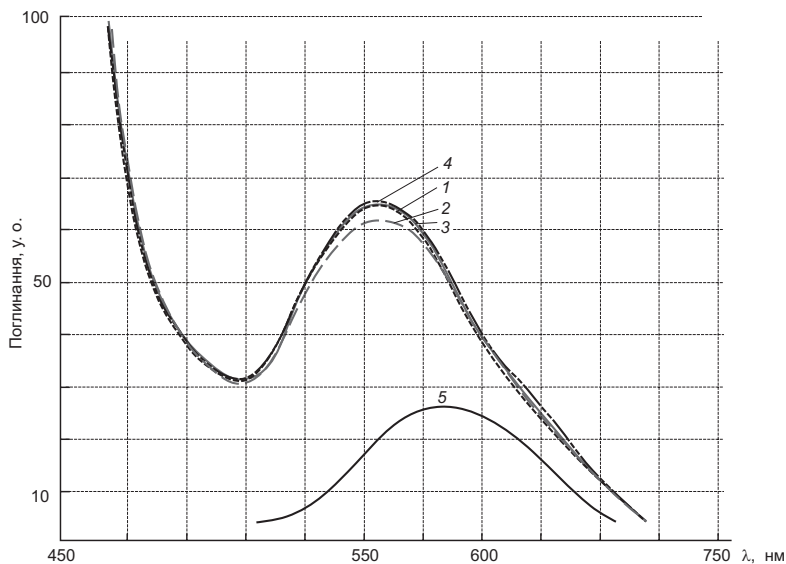


**Рис. 3.** Електронні спектри комплексів цیانметгемоглобін (CNMetHb) крові здорових донорів – Coomassi G-250 після 24-годинної інкубації еритроцитів з речовиною № 1, речовиною № 2, речовиною № 3 та додавання ацетальдегіду *in vitro*:

- 1 – спектр розчину (CNMetHb + Coomassi G-250) за дії речовини № 1; максимум поглинання – 554,9 нм;
  - 2 – спектр розчину (CNMetHb + Coomassi G-250) за дії речовини № 2; максимум поглинання – 554,9 нм;
  - 3 – спектр розчину (CNMetHb + Coomassi G-250) за дії речовини № 3; максимум поглинання – 556,1 нм;
  - 4 – спектр розчину CNMetHb; максимум поглинання – 542,2 нм
- Максимум поглинання CNMetHb + Coomassi G-250 – 554,9 нм

**Fig. 3.** Healthy donors' blood cyanmethemoglobin (CNMetHb) – Coomassi G-250 electron spectra after 24-hour erythrocyte incubation with substance N1, substance N2, substance N3 and after acetaldehyde addition *in vitro*:

- 1 – solution spectrum (CNMetHb + Coomassi G-250) under the effect of substance N1; absorption maximum – 554,9 nm;
  - 2 – solution spectrum (CNMetHb + Coomassi G-250) under the effect of substance N2; absorption maximum – 554,9 nm;
  - 3 – solution spectrum (CNMetHb + Coomassi G-250) under the effect of substance N3; absorption maximum – 556,1 nm;
  - 4 – solution spectrum CNMetHb; absorption maximum – 542,2 nm
- Absorption maximum CNMetHb + Coomassi G-250 – 554,9 nm



**Рис. 4.** Електронні спектри лігандоспецифічних комплексів CNMetHb крові здорових донорів з розчином Coomassi G-250 на фоні додавання препаратів № 1, № 2, № 3 до розчинів гемоглобіну: 1 – спектр поглинання розчину CNMetHb + речовина № 1; максимум поглинання – 556,1 нм; 2 – спектр поглинання розчину CNMetHb + речовина № 2; максимум поглинання – 558,0 нм; 3 – спектр поглинання розчину CNMetHb + речовина № 3; максимум поглинання – 556,7 нм; 4 – спектр поглинання розчину CNMetHb + H<sub>2</sub>O; максимум поглинання – 554,3 нм; 5 – спектр поглинання розчину Coomassi G-250; максимум поглинання – 585,8 нм

**Fig. 4.** Electron spectra of healthy donors' blood ligand complexes with Coomassi G-250 under the effect of addition substances N1, N2, N3 to the hemoglobin solutions:

- 1 – absorption spectrum CNMetHb + substance N1; absorption maximum – 556,1 nm;  
 2 – absorption spectrum CNMetHb + substance N2; absorption maximum – 558,0 nm;  
 3 – absorption spectrum CNMetHb + substance N3; absorption maximum – 556,7 nm;  
 4 – absorption spectrum CNMetHb + H<sub>2</sub>O; absorption maximum – 554,3 nm;  
 5 – absorption spectrum Coomassi G-250; absorption maximum – 585,8 nm

з еритроцитів після інкубації з речовинами № 1, № 2, № 3, суттєво не відрізняються між собою. Поряд із тим, додавання досліджуваних препаратів (0,1 мл/2мл HbO<sub>2</sub>) до розчинів оксиформи гемоглобіну з подальшим переведенням їх у ціанметформу та додаванням в еквімолярних кількостях Coomassi G-250 вказує на деяке зміщення смуг електронних спектрів (рис. 4, табл. 2).

На нашу думку, навіть незначна зміна спорідненості Coomassi G-250 до гемоглобіну може бути пов'язана зі зміною гідрофобності чи порушенням водневих взаємодій між окремими доменами білкової глобули, викликаними дією досліджуваних сполук. Частковою відповіддю на це можуть бути результати визначення лужної стабільності гемоглобіну за даних умов досліді. Результати представлені у табл. 3.

Стойкість гемоглобіну до дії лугу залежить від форми, у якій він міститься. Відомо, що MetHb є менш стійкий до дії лугу порівняно з HbO<sub>2</sub> і HbCO. Це, очевидно, пов'язано з окисненням заліза гема, яке супроводжується зміною четвертинної структури молекули [12, 17]. У той же час Перутц [25, 26] на базі аналізів амінокислотної послідовності, а також просторової структури гемоглобіну людини і деяких тварин дійшов висновку, що денатурація цього білка визначається, в основному, іонізацією амінокислотних залишків, недоступних для розчинника, які перебувають на поверхні  $\alpha_1\beta_1$ -контактів. За умов гідратації відбувається розгортання димерів до мономерів. У гемоглобіні людини в оточенні  $\alpha_1\beta_1$ -контактів містяться амінокислоти цистеїн і тирозин. Вважають,



**Таблиця 3. Вміст лужнотійкого гемоглобіну у гемолізатах крові здорових донорів за впливу спірокарбону (речовина № 1) та похідних піролопиримідиндіонів (речовини № 2, № 3), ( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ ), %**

**Table 3. The amount of basic stable hemoglobin in the healthy donors' blood hemolysates under the effect of Spirocarbon (substance N1) and piropirymidyndion derivatives (substances N2, N3), ( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ ), %**

№/№	Варіанти дослідів	n	Вміст лужнотійкого гемоглобіну
1	Гемолізати крові здорових донорів (контроль)	10	0,86±0,02
2	Гемолізати крові здорових донорів після інкубації еритроцитів з речовиною № 1	6	6,43±0,18***
3	Гемолізати крові здорових донорів після інкубації еритроцитів з речовиною № 2	8	0,55±0,03*
4	Гемолізати крові здорових донорів після інкубації еритроцитів з речовиною № 3	8	0,43±0,05*

*Примітка.* \* – Різниця щодо контролю вірогідна,  $p < 0,05$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$

що зміна іонізації бокових груп цих амінокислотних залишків є причиною зростання стійкості до денатурації лугом [17, 24].

Результати наших досліджень дають змогу припустити, що використовувані речовини завдяки своїм хімічним властивостям можуть посилювати гідрофобність, змінюючи кількість і взаємозалежне розміщення у ньому гідрофобних груп. Вони можуть зв'язуватися з відповідними групами глобінового компонента гемоглобіну, екранувати їх, понижуючи або, в окремих випадках, підвищуючи гідратацію молекули і в такий спосіб впливати на його лужну стійкість, здатність взаємодіяти з іншими лігандами. Відомо, що гідрофобні ліганди впливають на неспецифічну взаємодію імуноглобулінів з антигенами [7]. У цьому плані становить інтерес спірокарбон, оскільки він є конденсованою гетероциклічною сполукою і містить 4 метильні гідрофобні групи.

Подальші наші дослідження були спрямовані на з'ясування обставин, які можуть підтвердити причини стійкості гемоглобіну до денатуруючих агентів, його конформаційного стану та функції (табл. 4). Унікальним тестом на зміну фізико-хімічних

**Таблиця 4. Пероксидазна активність метгемоглобіну еритроцитів крові здорових донорів за дії спірокарбону (речовина № 1) та похідних піролопиримідиндіонів (речовини № 2, № 3), ( $M \pm m$ ,  $n = 6-8$ )**

**Table 4. Peroxidase activity of erythrocyte methemoglobin from healthy donors' blood under the effect of Spirocarbon (substance N1) and piropirymidyndion derivatives (substances N2, N3), ( $M \pm m$ ,  $n = 6-8$ )**

№/№	Варіанти дослідів	n	Питома пероксидазна активність, у.о./мкг білка×хв	Зміна питомої пероксидазної активності щодо контролю, %
1	Гемолізати крові здорових донорів	8	0,533±0,046	100
2	Гемолізати крові здорових донорів після інкубації еритроцитів з речовиною № 1	6	0,360±0,015*	67,5
3	Гемолізати крові здорових донорів після інкубації еритроцитів з речовиною № 2	8	0,604±0,069*	113,3
4	Гемолізати крові здорових донорів після інкубації еритроцитів з речовиною № 3	8	0,667±0,048*	125,1

*Примітка.* \* – Різниця щодо контролю вірогідна –  $p < 0,05$

характеристик і функції білка, пов'язану з його модифікацією, зміною конформації, є його ферментативна активність за умов її наявності. Враховуючи те, що гемоглобін має пероксидазну активність, ми визначали пероксидазну активність метгемоглобіну досліджуваних зразків донорської крові за описаною вище схемою. Одержані результати свідчать про достовірні відмінності пероксидазної активності MetHb у різних досліджуваних варіантах. Слід зазначити, що у варіантах зі спірокарбоном пероксидазна активність знижується, а за впливу похідних піролопиримідиндіонів – зростає.

## ПІДСУМОК

Проведені дослідження певною мірою висвітлюють специфіку впливу спірокарбону (речовина № 1) та похідних піролопиримідиндіонів (речовини № 2, № 3) на фізико-хімічні й окремі функціональні властивості киснетранспортного білка – гемоглобіну: його пероксидазну активність, стійкість до денатурації лугом, динаміку вмісту лігандних форм, а також електронні спектри. Однак отримані результати не дають однозначних підстав стверджувати, що досліджувані препарати не будуть суттєво впливати на спорідненість гемоглобіну до кисню – на його киснетранспортну функцію. Вивчення цього питання є предметом наших подальших досліджень.

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. Беженар А.А., Влох І.Й., Петрашко Л.Я. та ін. Дослідження впливу „Спірокарбону” на спектральні характеристики лігандних форм гемоглобіну крові людей, хворих на алкоголізм. **III Міжнародна конференція молодих науковців „Біологія: від молекули до біосфери”** (18–21 листопада 2008 р., м. Харків): Тези доп. Харків, 2008: 19–20.
3. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков. **Успехи совр. биологии**, 1993; 113 (1): 71–81.
4. Дудок К.П., Білий Р.О., Федорович А.М. Дослідження лігандних форм гемоглобіну методом електронної оптичної спектроскопії. **Вісник Львів. ун.-ту. Сер. біол.**, 2002; 29: 32–36.
5. Дюбук Л.С., Дефер Ж.В. Алкоголізм: Гостра та хронічна інтоксикація. **Медицина світу**, 1997; 3, (4): 184–193.
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., Веревка С.В. Лигандиндуцированное структурирование полиреактивных иммуноглобулинов. **Укр. біохім. журнал**, 2003; 75 (6): 56 – 61.
8. Иржак Л.И. **Гемоглобины и их свойства.** М.: Наука, 1975. 239 с.
9. Каліман П.А. Регуляція метаболізму за умов надходження до організму токсичних сполук доквілля. **Матеріали ІХ Українського біохімічного з'їзду (24–27 жовтня 2006, Харків).** **Укр. біохім. журнал**, 2006; 2: 150.
10. Кошелева В.Д., Бойко Р.Т., Єресько В.А. Влияние спирокарбона на гипоталамо-гипофизарную нейросекреторную систему (ГНС) растущих животных. **Материалы Всеукр. науч.-практ. конф.** Сб. тез. Херсон, 1994. 103 с.
11. Крикливий І.А., Рекун Г.М, Артюх В.П., Стародуб Н.Ф. Методы изучения функциональных свойств гемоглобина. **Методы молекулярной биологии.** Киев: Наук. думка, 1979: 191–200.
12. Кучеренко Ю.В., Розанова Е.Д. Влияние криопротекторов на связывание бромтимолового синего метгемоглобином быка. **Укр. біохім. журнал**, 2001; 73, (4): 65–68.
13. Кушаковский И.С. **Клинические формы повреждения гемоглобина.** Ленинград, 1968. 230 с.

14. Речицький О.Н., Єресько В.А., Дудок К.П., Сибірна Н.О. Дослідження впливу „спірокарбону” на структурно-функціональний стан еритроцитарних мембран периферичної крові здорових людей та хворих на алкоголізм. **Матер. III Всеукр. наук.-практ. конф. „Теорія і практика сучасного природознавства”, присвяч. 90-річчю утворення Херсонського держ. ун-ту.** Зб. ст. Херсон, 2007: 47–52.
15. Сибірна Н.О., Великий М.М. **Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові.** Метод. посібник. Львів: Вид. центр ЛДУ, 72 с.
16. Сибірна Н., Люта М., Бурда В. та ін. Вплив системи L-аргінін:NO на динаміку вмісту лігандних форм та спектральні характеристики гемоглобіну за умов цукрового діабету 1-го типу. **Медична хімія**, 2004; 6 (3): 26–29.
17. Стародуб Н.Ф., Артюх В.П. Содержание SH-групп в отдельных фракциях гемоглобина крыс. **Укр. биохим. журнал**, 1978; 50 (1): 76–80.
18. Чувилин Ф.Т., Серебренникова Г.А., Евстигнеева Р.П. Аллостерические регуляторы обратной оксигенации гемоглобина. **Биоорг. химия**, 1990; 16 (9): 1157–1176.
19. Veliky M.M., Bilyi O.I., Dudok K.P. Determination of hemoglobin derivatives in blood by method of optical density ratio. **Light and optics in biomedicine**, 2001; 4515:199–201.
20. Drabkin D.L. The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. **The Journal of Biological Chemistry**, 1946; 164, (2): 703–723.
21. Dudok K., Dudok T., Vlokh I. et al. Optical Spectra of Hemoglobin Taken form Alcohol Dependent Humans. **Ukr. J. Phys. Optics**, 2005; 6 (4): 142–145.
22. Dudok K.P., Moroz O.M., Dudok T. et al. Spectroscopic study of haemoglobin ligands forms and erythrocyte membrane dynamics at alcohol intoxication of white rats. **Ukr. J. Phys. Opt**, 2004; 5 (1): 32–36.
23. Dudok K., Dudok T., Vlokh I. et al. Optical Spectra of Hemoglobin Taken form Alcohol Dependent Humans. **Ukr. J. Phys. Optics**, 2005; 6 (4): 142–145.
24. Huisman T.H.J, Miller A., Schroder W.A. A  $\gamma^6$ -type of the hereditary persistence of fetal hemoglobin with  $\beta$ -chain production in cis. **Amer. J. Human Genet**, 1975; 27 (6): 765–777.
25. Perutz M.F. Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. **Ann. Review of Biochem**, 1979; 48: 327–386.
26. Perutz V.F. Mechanism of denaturation of hemoglobin by alkali **Ann. Review of Biochem**, 1974; 247 (5450): 341–344.

## INFLUENCE OF SPIROCARBONE AND DERIVATIVES OF PYRROLOPYRIMIDINEDIONS ON PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF THE HEMOGLOBIN LIGAND FORMS OF BLOOD *IN VITRO*

**K. P. Dudok<sup>1</sup>, A. M. Fedorovych<sup>1</sup>, T. G. Dudok<sup>2</sup>, O. N. Rechytsky<sup>3</sup>  
V. A. Yeresko<sup>3</sup>, A. V. Shkavolyak<sup>4</sup>, N.O. Sybirna<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevsky St., Lviv 79005, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Physical Optics MES of Ukraine, 23, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

<sup>3</sup>Kherson State University, 27, 40 Years of October St., Kherson 73002, Ukraine

<sup>4</sup>Danylo Halytsky National Medical University, 69, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine

The effect of heterocyclic substance spirocarbon and pyrrolopyrimidinedione derivatives was studied on the hemoglobin ligand forms dynamics (RHb, HbO<sub>2</sub>, HbCO, SHb, MetHb), its basic stability, methemoglobin peroxidase activity and spectrophotometric characteristics of CNMetHb-Coomassie G-250 in the healthy donors' blood.

It was shown that spirocarbon causes a slight HbO<sub>2</sub> decrease. In the experiments with pyrrolopyrimidinedione derivatives the average HbO<sub>2</sub> values are in the range of

control. There was carried out an analysis of HbO<sub>2</sub>, MetHb, CNMetHb electron spectra and the electron spectra of the complexes CNMetHb-Coomassi G-250.

It was testified that spirocarbon causes a certain increase of basic stable hemoglobin and decrease of peroxydase activity. The pyrrolopyrimidinedione derivatives result in increasing of methemoglobin peroxydase activity in the tested samples.

**Key words:** hemoglobin, ligand forms, electron spectra, spirocarbon, pyrrolopyrimidinedions derivatives, basic stability, peroxydase.

## ВЛИЯНИЕ СПИРОКАРБОНА И ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛОПИРИМИДИНДИОНОВ НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛИГАНДНЫХ ФОРМ ГЕМОГЛОБИНА *IN VITRO*

Е. П. Дудок<sup>1</sup>, А. Н. Федорович<sup>1</sup>, Т. Г. Дудок<sup>2</sup>, А. Н. Речицкий<sup>3</sup>,  
В. А. Єресько<sup>3</sup>, А. В. Шкаволяк<sup>4</sup>, Н. А. Сибирная<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

<sup>2</sup>Институт физической оптики МОН Украины, ул. Драгоманова, 23, Львов 79005, Украина

<sup>3</sup>Херсонский государственный университет  
ул. 40 лет Октября, 27, Херсон 73002, Украина

<sup>4</sup>Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого  
ул. Пекарская, 69, Львов 79010, Украина

Исследовали влияние спирокарбона и производных пирролопиримидиндионов на динамику лигандных форм гемоглобина (RHb, HbO<sub>2</sub>, HbCO, SHb, MetHb), его щелочестойчивость, пероксидазную активность метгемоглобина, спектрофотометрические характеристики комплексов CNMetHb-Coomassi G-250 крови здоровых доноров.

Показано некоторое снижение содержания HbO<sub>2</sub> в условиях действия спирокарбона. В условиях действия производных пирролопиримидиндионов показатели содержания HbO<sub>2</sub> близки к контролю. Сделан анализ электронных спектров HbO<sub>2</sub>, MetHb, CNMetHb и комплексов CNMetHb-Coomassi G-250.

Установлено, что при действии спирокарбона наблюдается увеличение щелочестойчивой части гемоглобина и снижение его пероксидазной активности. При действии производных пирролопиримидиндионов пероксидазная активность метгемоглобина увеличивается.

**Ключевые слова:** гемоглобин, лигандные формы, электронные спектры, спирокарбон, производные пирролопиримидиндионов, пероксидаза, щелочестойчивость.

Одержано: 29.07.2009