



УДК 616.1551- 008: 612.124.4

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІГАНДНИХ ФОРМ ГЕМОГЛОБІНУ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ Й ЗА АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

**К. П. Дудок, В. А. Бурда, М. Я. Люта, А. М. Федорович,
О. І. Білий, Н. В. Єфіменко, О. П. Канюка, Н. О. Сибірна**

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

На моделях хронічної алкогольної інтоксикації та експериментального цукрового діабету в гемолізатах периферичної крові щурів досліджували спорідненість гемоглобіну до кисню, кисневу ємність і вміст лігандних форм. Встановлено, що за алкогольної інтоксикації щурів знижується спорідненість гемоглобіну до кисню та киснева ємність гемоглобіну. За експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету у щурів зростає спорідненість гемоглобіну до кисню за незмінної кисневої ємності. У піддослідних тварин за алкогольної інтоксикації виявлено зростання рівня сульф- і метгемоглобіну, а за умов цукрового діабету – сульф-, мет- і карбоксигемоглобіну. У людей, хворих на алкоголізм, встановлено зростання рівня сульф- і метгемоглобіну, зниження спорідненості гемоглобіну до кисню, порівняно зі здоровими донорами ($32,50 \pm 0,45$ проти $28,60 \pm 0,54$ мм рт. ст., відповідно) за незмінної кисневої ємності. Зважаючи на те, що мінорні лігандні форми роблять внесок у спорідненість тотального гемоглобіну до кисню, було здійснено їхню кількісну характеристику. У роботі представлено спектри поглинання, які характеризують лігандну форму нітрозилгемоглобін, перехід дезокси- і метгемоглобіну в нітрозилгемоглобін. На основі статистичного набору даних зі спектрів поглинання дезоксигемоглобіну та повного переходу його в нітрозилформу (60 аналізів) побудовано зведений спектр поглинання для нітрозилгемоглобіну в обраному інтервалі довжин хвиль. У статті наведено результати порівняльного аналізу характеристичних максимумів електронних спектрів поглинання шести лігандних форм гемоглобіну периферичної крові здорових донорів у діапазоні довжин хвиль 450–750 нм. Проведені дослідження можуть бути передумовою для розробки методики визначення шести лігандних форм гемоглобіну в одній пробі крові.

Ключові слова: гемоглобін, лігандні форми, експериментальний цукровий діабет, алкогольна інтоксикація, нітрозилгемоглобін, спектри поглинання

ВСТУП

Метаболічні порушення, які виникають у живому організмі, часто пов'язані з впливом речовин екзогенного походження та дисбалансом ендogenous метаболітів. Очевидним стає необхідність диференційованого підходу до вивчення механізмів цих порушень і властивостей та ключової участі відповідних складових, якими є біологічні макромолекули. Вони забезпечують оптимальну стійкість складного організму в найрізноманітніших умовах середовища. Серед цих макромолекул особливе місце належить кисеньтранспортному білку – гемоглобіну.

Унікальність молекули гемоглобіну пов'язана з його властивістю забезпечувати молекулярним киснем клітини усіх тканин організму. Крім того, молекула гемоглобіну здатна не лише приєднувати кисень і віддавати його клітинам органів і тканин, а й забезпечувати приєднання та вивільнення CO_2 , а також зв'язування і депонування CO , NO , H_2S , CN^- , які виступають у ролі клітинних месенджерів із різними фізіологічними функціями [14, 28]. У результаті взаємодії гемоглобіну з переліченими сполуками утворюються відповідні лігандні форми: карбоксигемоглобін (HbCO), нітрозилгемоглобін (HbNO), нітрозогемоглобін (SNOHb), сульфгемоглобін (SHb), ціанметгемоглобін (CNMetHb), кожна з яких виконує в організмі специфічну фізіологічну функцію. Деоксигенований – дезоксигемоглобін (RHb) може проявляти антитоксичну функцію. Метгемоглобін (MetHb) здатний інактивувати отрути різного походження (сульфіди, ціаніди, нітрати тощо) як за фізіологічних умов, так і за патологій різної етіології [2, 5]. Здатність RHb приєднувати NO з подальшим утворенням нітрозилгемоглобіну та кількісна характеристика HbNO можуть змінюватися за різних патологічних станів, і скринінг цієї здатності може бути діагностичним показником.

Відомо, що зв'язування гемоглобіну з лігандом супроводжується конформаційними перебудовами молекули загалом. Екзогенні токсичні сполуки та метаболіти, виступаючи у ролі лігандів, можуть призводити до порушення гідрофобності у молекулі гемоглобіну і в оточенні Феруму гему, що призводить до вивільнення активної форми кисню – супероксид-аніон радикала (O^{2-}), переходу Fe^{2+} у Fe^{3+} та накопичення метгемоглобіну [19].

Сполуки екзогенного чи ендogenous походження часто конкурують із киснем за центри зв'язування у гемі. Зв'язуючись із гемоглобіном, вони впливають на його кооперативність, блокуючи тим самим його основну функцію – транспорт кисню, і порушують стабільність структури не лише цього гемопротейну, але й еритроцита. Відомо, що за патологій різної етіології часто спостерігають скорочення тривалості життя еритроцитів через порушення структури їхніх мембран. Такі порушення виявлені як за цукрового діабету, так і за алкогольної інтоксикації [8, 12, 26]. Руйнування еритроцитів супроводжується також іншим важливим фізіологічним процесом – посиленою деградацією гемоглобіну на гем і глобін. Більше того, відбувається деградація вільного гему за участю гем-оксигеназної системи, що призводить до утворення фізіологічно активного метаболіту – молекули CO . У реалізації наступного етапу розпаду гему за участі гем-оксигеназ (HO-x) і NO -синтаз утворюється інший ендogenous метаболіт – оксид азоту (II) (NO). Варто зауважити, що гем і його деривати (білірубін, CO), які утворюються у процесі розпаду гемоглобіну, виконують важливі функції. Зокрема, білірубін має антиоксидантні властивості, а CO є вторинним месенджером внутрішньоклітинної сигналізації [28].

Отже, є певний опосередкований взаємозв'язок між деградацією гему гемоглобіну за участю гем-оксигенази і продукцією NO. У літературі наведено інформацію, згідно з якою за умов гіпоксії у модельних дослідах з культурою ендотеліальних клітин аорти бика виявлено взаємозалежність між індукцією гем-оксигенази та зміною активності індукцибельної NO-синтази. Вважають, що одна з ізоформ гем-оксигенази HOx-2 бере участь у зниженні кількості NO у клітині, способом зв'язування його з власною гем-акцепторною ділянкою – гідрофобним катаболітним центром, призначеним лише для деградації гему, створюючи своєрідне внутрішньоклітинне депо для NO [22, 23, 28].

NO привертає особливу увагу, оскільки цей метаболіт є одним із найважливіших медіаторів дихальної функції крові. В організмі NO продукується групою ізоферментів NO-синтази (NOS), [КФ.1.14.13.39.]: двома конститутивними – нейрональною (nNOS) і ендотеліальною (eNOS) та індукцибельною (iNOS). Ізоформи NOS є діоксигеназами, які використовують кисень і NADPH для перетворення L-аргініну в цитрулін і NO [15]. Оксид азоту виконує різноманітні функції. За одних умов NO виконує протекторну дію, а за інших – сприяє формуванню патологічних процесів [22]. Баланс між фізіологічними, регуляторними та/або цитотоксичними властивостями значною мірою зумовлений локальною концентрацією NO, а також оксидантним статусом тканин, у яких синтезується і реалізує свої ефекти оксид азоту [29].

На особливу увагу заслуговує роль оксиду азоту в системі транспорту газів, спряженості процесів депонування NO за участю гемоглобіну та їхнє узгодження з активністю NO-синтази як у нормі, так і за патологій різної етіології [19, 21, 23, 25].

Беручи до уваги широкий спектр біологічної дії оксиду азоту, його здатність взаємодіяти з гемоглобіном з утворенням HbNO та SNOHb, на увагу заслуговують порівняльні дослідження впливу цього метаболіту на спорідненість гемоглобіну до кисню, кисневу ємність гемоглобіну, співвідношення лігандних форм гемоглобіну. Тому виникає необхідність визначення вмісту нітрозилгемоглобіну в периферичній крові разом з іншими лігандними формами гемоглобіну.

Враховуючи значний доробок авторів у визначенні вмісту п'яти лігандних форм гемоглобіну в одній пробі крові (RHb, HbO₂, HbCO, MetHb, SHb) методом абсорбційної спектроскопії [1, 7, 24], метою роботи було: провести порівняльний аналіз внеску лігандних форм гемоглобіну у процеси оксигенації та кисневу ємність гемоглобіну за алкогольної інтоксикації і за цукрового діабету; аналізувати спектри поглинання нітрозилгемоглобіну, зіставляючи їх зі спектрами поглинання RHb, HbO₂, HbCO, MetHb для розробки методики визначення вмісту шести лігандних форм гемоглобіну в одному зразку крові.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для досліджень використовували гемоглобін периферичної крові здорових донорів, пацієнтів, хворих на алкоголізм, крові щурів за експериментального цукрового діабету (ЕЦД) і крові щурів за хронічної алкогольної інтоксикації (ХАІ).

Для створення експериментальних моделей діабету й алкогольної інтоксикації використовували безпородних білих щурів-самців масою 150–200 г. Тварин утримували у стандартних умовах віварію, забезпечуючи їм вільний доступ до їжі та води. Експерименти проводили згідно з національними "Загальними етичними принципами проведення експериментів на тваринах", ухваленими Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями

“Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовують для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, Франція, 1985). Протокол № 06 – 06 – 2017 засідання комісії з біоетики від 12. 06. 2017 р.

Модель експериментального цукрового діабету (ЕЦД) створювали щурам дочеревинним введенням стрептозотоцину (“Sigma”, США), розчиненого в 10 мМ цитратному буфері (рН 5,5), з розрахунку 60 мг на 1 кг маси тіла. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози у крові, яку визначали через 72 год після введення стрептозотоцину. В експерименті використовували тварин із рівнем глюкози більше 14 мМ.

Для створення моделі експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації відбирали щурів, схильних до вживання алкоголю, використовуючи “двопляшковий метод” [4]. Алкогольну інтоксикацію (AI) викликали введенням за допомогою зонду протягом 14 діб 20%-ного розчину етанолу з розрахунку 6 г/кг маси тіла *per os*.

Щурів усіх дослідних груп декапітували під ефірним наркозом. Як антикоагулянт використовували гепарин (із розрахунку гепарин: цільна кров – 1:100).

У людей кров для досліджень брали з ліктьової вени загальноприйнятим методом. Як антикоагулянт використовували ЕДТА. Пацієнти, хворі на алкоголізм перебували на стаціонарному лікуванні у Львівській обласній клінічній психіатричній лікарні. Гемоглобін для усіх варіантів досліджень виділяли за описаною методикою Драбкіна [20].

Еритроцити відділяли від плазми центрифугуванням при 500 $\times g$ та відмивали від плазми крові ізотонічним розчином NaCl (0,150 М). Процедуру відмивання повторювали 5 разів при 500 $\times g$. Гемоліз еритроцитів проводили 3 мМ К-, Na-фосфатним буфером рН 7,36. Для відділення строми мембран гемолізат центрифугували при 20–800 $\times g$. Виділений гемоглобін використовували для спектроскопічних досліджень.

Концентрацію гемоглобіну визначали за методом Кушаковського у модифікації Н. О. Сибірної [20].

Для запису спектрів поглинання використовували розчини гемоглобіну у формах: RНb, НbO₂, НbСО, MetНb, НbNO. Дезоксигемоглобін отримували з оксигемоглобіну, додаючи натрій гідросульфід (Na₂S₂O₄) з розрахунку 2 мг на 2 мл НbO₂. Метгемоглобін отримували, додаючи до оксигемоглобіну 10%-ний розчин калій гексаціаноферату (K₃[Fe(CN)₆]). Для отримання нітрозилформи гемоглобіну до розчину дезоксигемоглобіну додавали натрій нітрит (NaNO₂) в еквімолярних кількостях. Перехід однієї лігандної форми в іншу контролювали спектрофотометрично на спектрофотометрі Specord M-40 (Німеччина) у діапазоні довжин хвиль 450–750 нм (точність встановлення довжини хвилі – 0,02 нм).

Визначення вмісту п'яти лігандних форм гемоглобіну: дезокси-, окси-, карбокси-, сульф- і метформи (RНb, НbO₂, СОНb, SHb, MetНb) в одній пробі крові проводили за методом [1]. Кисневу ємність визначали за відносним вмістом НbO₂ у пробі. Вміст глікозильованого гемоглобіну визначали за методом описаним у роботі [20].

Спорідненість гемоглобіну до кисню визначали спектрофотометричним методом, будуючи криві оксигенації за методикою, описаною Івановим [11]. Вимірювання проводили на спектрофотометрі СФ-26 за температури 37 °С і рН 7,36. Вміст гемоглобіну у пробах контролювали за величиною поглинання 0,500–0,600 на довжині хвилі 0,541 нм.

Електронні спектри різних лігандних форм гемоглобіну реєстрували за допомогою спектрофотометра Specord M-40 (Німеччина) у діапазоні довжин хвиль 450–750 нм.

Експериментальні дані опрацьовували статистично з використанням програмного пакету Microsoft Office Excel. В усіх випадках достовірними вважали відмінності за умови значення ймовірності P менше 5 % ($P < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Характеризуючи фізико-хімічні властивості й функцію гемоглобіну в нормі та за різних патологічних станів варто зважати на те, що основний білок еритроцитів представлений генетично детермінованою гетерогенною системою: HbA (гемоглобін дорослого організму) та HbF (фетальний гемоглобін плода на пізньому етапі розвитку). Гемоглобін А поділяється на кілька фракцій (HbA₁, HbA₂, HbA₃). Крім того, в еритроциті міститься гемоглобін, модифікований метаболітами алкоголю (ацетальдегідом), глікозильований гемоглобін (HbAc₁), аномальні гемоглобіни [6, 8, 27]. Тому, інтерпретуючи дані досліджень структурно-функціональних характеристик гемоглобіну, необхідно брати до уваги особливості утворення різних лігандних форм, які мають неоднаковий вихідний статус залежно від початкового компонента гетерогенної системи.

Важливим є те, що кожен із далеко не повністю перелічених гемоглобінів виявляє різну спорідненість до кисню чи інших лігандів, роблячи відповідний внесок у тотальне забезпечення органів і тканин киснем [27]. У цьому аспекті важливе значення мають ретельні дослідження кисеньтранспортної функції гемоглобіну, кисневої ємності та вкладу перерозподілу лігандних форм у ці процеси як у нормі, так і за патологій різної етіології.

Ми використали моделі хронічної алкогольної інтоксикації та експериментального цукрового діабету у щурів для визначення спорідненості гемоглобіну до кисню за показником P_{50} , кисневу ємність і вміст п'яти лігандних форм гемоглобіну в досліджуваних гемолізатах периферичної крові (рис. 1, табл. 1).

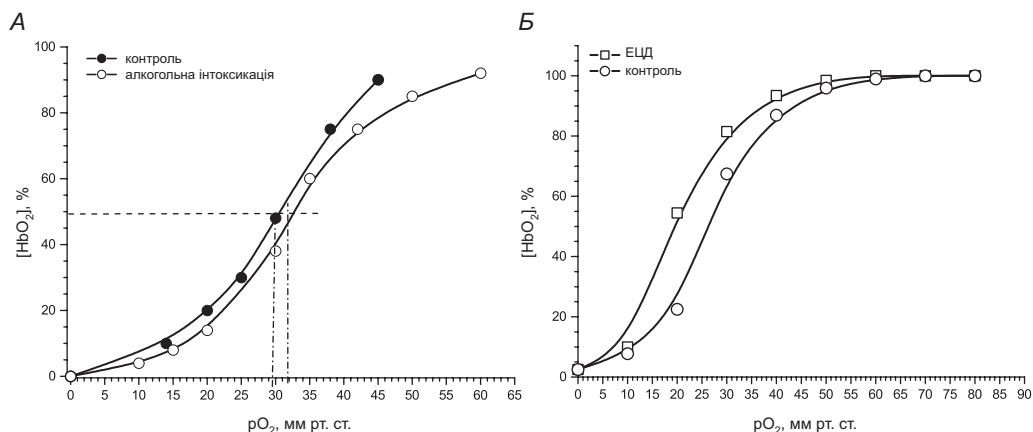


Рис. 1. Типові криві насичення гемоглобіну киснем у контрольних щурів, за тривалої алкогольної інтоксикації (А) та за експериментального цукрового діабету (Б)

Fig. 1. Typical hemoglobin oxygenation curves of rat peripheral blood under chronic alcohol intoxication (A) and under experimental diabetes mellitus (B)

Таблиця 1. Динаміка насичення гемоглобіну щурів киснем і киснева ємність у нормі, за алкогольної інтоксикації та за ЕЦД ($M \pm m$, $n = 8-15$)

Table 1. The dynamics of hemoglobin oxygen saturation in rats, as well as oxygen capacity under the norm, alcohol intoxication and EDM ($M \pm m$, $n = 8-15$)

Варіант досліджу	P_{50} , мм рт. ст.	P_{75} , мм рт. ст.	P_{90} , мм рт. ст.	Киснева ємність, $\text{cm}^3 \text{O}_2/\text{г HbO}_2$
Контроль	27,80±0,35	37,50±0,58	45,00±0,62	1,22±0,054
Алкогольна інтоксикація	31,20±0,86*	44,60±0,50*	57,20±0,68*	1,16±0,052
Цукровий діабет	19,20±1,60*	28,09±1,52*	36,21±1,72*	1,29±0,010

Примітка: * – різниця достовірна щодо контролю, $P \leq 0,05$

Comment: * – probable difference compared with control, $P < 0.05$

Аналіз кривих дисоціації оксигемоглобіну є універсальним підходом щодо вивчення киснево-транспортної функції крові, кисневозв'язуючої здатності гемоглобіну, постачання тканин киснем. На рис. 1 представлені типові криві оксигенації гемоглобіну щурів у нормі, за алкогольної інтоксикації й за експериментального цукрового діабету.

За алкогольної інтоксикації достовірно знижується спорідненість гемоглобіну до кисню за різних значень парціального тиску (P_{50} , P_{75} , P_{90}). Також спостерігають зниження кисневої ємності гемоглобіну (рис. 1, А, табл. 1).

За умов ЕЦД спостерігають інше явище – достовірно зростає спорідненість гемоглобіну до кисню, достатньо високою є киснева ємність (табл. 1). За ЕЦД виявлено також підвищення вмісту глікозильованого гемоглобіну з 4,53±0,05 % у контролі до 8,81±0,41 %. Отже, за досліджуваної патології, очевидно, суттєвий внесок у підвищення спорідненості гемоглобіну до кисню робить модифікований (глікозильований) гемоглобін. Процеси модифікації гемоглобіну та зв'язування з відповідними лігандами залежать від того, у якій вихідній лігандній формі він перебуває в цей момент. Тому важливе значення має контроль вмісту різних лігандних форм гемоглобіну в нормі, за патологічних станів, у процесі лікування і реабілітації.

Ми визначили співвідношення вмісту лігандних форм гемоглобіну в периферичній крові щурів на моделях алкогольної інтоксикації та експериментального цукрового діабету (табл. 2).

Виявлені достовірні зміни у співвідношенні лігандних форм гемоглобіну за двох типів патології. З'ясовано, що за алкогольної інтоксикації щурів знижується порівняно з контролем вміст HbO_2 , натомість достовірно зростає вміст міночних компонентів – SHb, MetHb. За ЕЦД також спостерігають відносно зростання вмісту SHb, HbCO і MetHb, але вміст HbO_2 зберігається на рівні контролю. Отже, хоча природа обох типів патологій різна, однак у обох випадках спостерігають закономірність у зростанні відносної кількості міночних лігандних форм. Міночні лігандні форми по-різному впливають на спорідненість тотального гемоглобіну до кисню. Так, зростання вмісту метгемоглобіну у крові призводить до зростання спорідненості гемоглобіну до кисню. Водночас ми виявили невідповідність між зниженням спорідненості гемоглобіну до кисню за алкогольної інтоксикації і значним підвищенням вмісту метгемоглобіну у периферичній крові щурів. Очевидно, що за цієї патології основний внесок у процеси зв'язування гемоглобіну з киснем роблять зміни в білковому оточенні гему, викликані метаболітами алкоголю [6].

Таблиця 2. Співвідношення лігандних форм гемоглобіну у крові щурів у нормі, за алкогольної інтоксикації та за ЕЦД ($M \pm m$, $n = 6-10$)

Table 2. The ratio of hemoglobin ligand forms in rat peripheral blood under the norm, alcohol intoxication and EDM ($M \pm m$, $n = 6-10$)

Варіант	Лігандні форми гемоглобіну, %				
	RHb	HbO ₂	HbCO	SHb	MetHb
Контроль	0,10±0,01	95,77±0,52	2,59±0,19	0,59±0,28	0,17±0,03
Алкогольна інтоксикація	0,10±0,05	87,10±0,60*	2,60±1,00	5,40±0,40*	4,70±0,20*
ЕЦД	0	94,44±4,52	3,50±0,13*	1,56±0,26*	1,37±0,01*

Примітки: * – різниця достовірна щодо контролю, $P \leq 0,05$

Comment: * – probable difference compared with control, $P < 0.05$

Крім модельних дослідів на щурах, було визначено спорідненість гемоглобіну до кисню, кисневу ємність гемоглобіну, вміст п'яти лігандних форм у гемолізатах периферичної крові здорових донорів і донорів, хворих на алкоголізм. Встановлено, що у хворих пацієнтів, як і у модельних дослідях зі щурами, нижчі спорідненість гемоглобіну до кисню та киснева ємність гемоглобіну, порівняно зі здоровими донорами, а також відмінні кількісні співвідношення його п'яти лігандних форм. Зокрема, зростає вміст COHb, MetHb, з'являється SHb (рис. 2, табл. 3, 4).

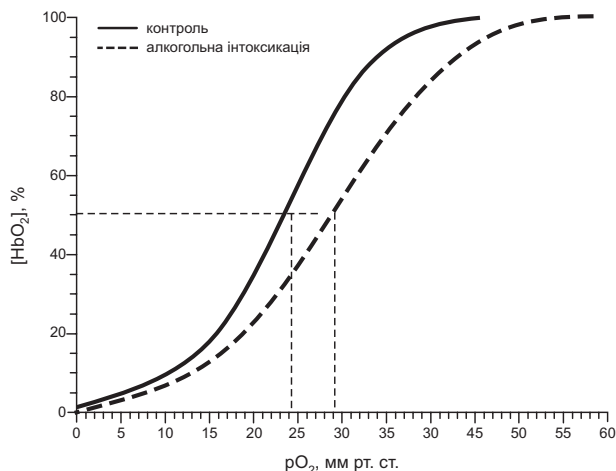


Рис. 2. Типові криві насичення киснем гемоглобіну крові здорових донорів і донорів, хворих на алкоголізм

Fig. 2. Typical curves of hemoglobin oxygen saturation of peripheral blood in healthy donors and alcoholics

Отримані результати є важливими, оскільки дають підстави вважати, що спричинена алкогольною інтоксикацією чи цукровим діабетом зміна спорідненості гемоглобіну до кисню детермінується не лише конформаційним станом (порушенням строгої просторової організації) самого білка, амінокислотним складом ділянки молекули, яка оточує гем, ступенем його дисоціації на димери і гем-гемової взаємодії (кооперативний ефект), а й порушенням динамічної рівноваги дезоксигемоглобін ↔ оксигемоглобін, зростанням кількості мінорних лігандних форм (табл. 4). Такі зміни можуть бути спричинені метаболітами, які супроводжують досліджувані нами типи патологій [3].

Таблиця 3. Ступінь насичення гемоглобіну киснем крові здорових донорів і пацієнтів, хворих на алкоголізм ($M \pm m$, $n = 10$)

Table 3. The level of hemoglobin oxygen saturation in healthy donors and alcoholics ($M \pm m$, $n = 10$)

Варіант досліджу	P_{50} мм рт. ст. $M \pm m$	Киснева ємність, $см^3 O_2/г HbO_2$
Гемолізати крові здорових донорів	28,60±0,54*	1,25±0,02
Гемолізати крові пацієнтів, хворих на алкоголізм	30,50±0,45*	1,23±0,01

Примітка: * – різниця достовірна щодо контролю, $P \leq 0,05$

Comment: * – probable difference compared with control, $P < 0.05$

Таблиця 4. Вміст лігандних форм гемоглобіну в гемолізатах еритроцитів периферичної крові здорових донорів і пацієнтів, хворих на алкоголізм ($M \pm m$; $n = (10-16)$, %)

Table 4. The content of hemoglobin ligand forms in erythrocyte hemolyzates of peripheral blood in healthy donors and alcoholics ($M \pm m$; $n = (10-16)$, %)

Варіант	Лігандні форми				
	RHb	HbO ₂	COHb	SHb	MetHb
Контроль	0,46±0,03	94,18±0,42	4,27±0,48	0,73±0,42	0,36±0,15
Хворі на алкоголізм	0	90,51±1,49	5,80±1,50	2,08±0,38*	3,49±0,25*

Примітка: * – різниця достовірна щодо контролю, $P \leq 0,05$

Comment: * – probable difference compared with control, $P < 0.05$

Окрім досліджуваних нами раніше п'яти лігандних форм гемоглобіну, на увагу заслуговує шоста лігандна форма – HbNO, яка утворюється у реакціях з NO (нітрозилювання по Fe²⁺ у гемовій групі), а також SNOHb – за нітрозування по β-93-цистеїну [25].

Біологічна функція NO-похідних Hb досить широка: транспорт NO, його депонування, елімінація тощо. Вони також беруть участь у генезі багатьох патологічних станів. SNOHb діє як "алостерично контрольований буфер", який обмінює свою NO-групу з тіолами середовища, в тому числі з глутатіоном, і тим самим змінює кровоплин як вазодилататор, виконуючи роль критичного фактора постачання O₂. Є своєрідна O₂-залежна рівновага між MetHb і SNOHb та HbNO. Так, HbNO знижує спорідненість гемоглобіну до кисню, а MetHb і SNOHb підвищують її [4, 19, 22]. У цьому зв'язку виникає необхідність контролю за вмістом HbNO у периферичній крові хворих і здорових донорів.

Одним із етапів кількісного визначення нітрозилгемоглобіну є дослідження характеристичних максимумів його спектрів поглинання для порівняння їх із такими ж для інших лігандних форм.

Нами проведено порівняльні дослідження спектрів поглинання HbO₂, RHb, MetHb і HbNO у діапазоні довжин хвиль 450–750 нм (рис. 3–6).

Вихідною формою для подальших досліджень слугувала дезоксиформа гемоглобіну. Власні дослідження та дані літератури свідчать, що дезоксиформа гемоглобіну за дії монооксиду азоту, на відміну від інших лігандних форм, повністю переходить у нітрозилформу *in vitro* [7].

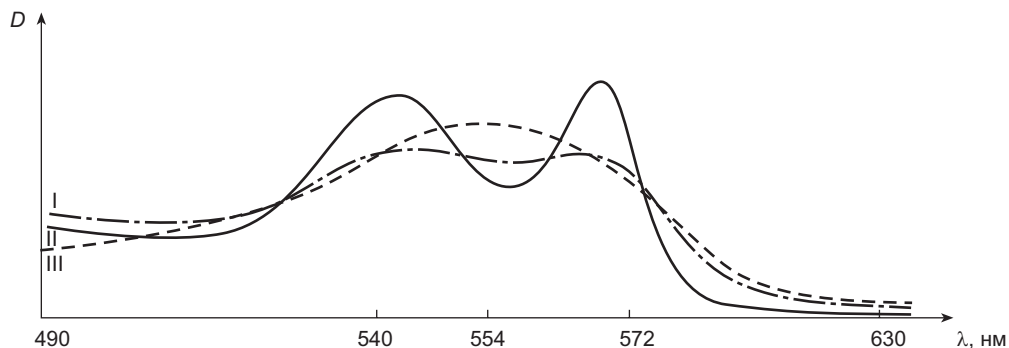


Рис. 3. Типові спектри поглинання окремих лігандних форм гемоглобіну периферичної крові здорових донорів: спектр I – HbNO; спектр II – HbO₂; спектр III – RHb [7].
Характеристичні максимуми поглинання: HbNO – дві широкі смуги з вираженими максимумами поглинання при 544,8 і 572,2 нм; HbO₂ – дві смуги при 541,4 і 576,6 нм; RHb – смуга з максимумом при 554,9 нм

Fig. 3. Typical absorption spectra of separate hemoglobin ligand forms of peripheral blood in healthy donors: spectrum I – HbNO; spectrum II – HbO₂; spectrum III – RHb [7].
Characteristic absorption peaks: HbNO – two broad bands with marked absorption peaks at 544.8 and 572.2 nm; HbO₂ – two bands at 541.4 and 576.6 nm; RHb – a band with the peaks at 554.9 nm

Взаємодіючи з відновленим гемоглобіном RHb, NO утворює стійкі HbNO-комплекси. У цьому аспекті оптимальним підходом для обчислення вмісту HbNO в розчині є бінарна система RHb → HbNO (див. табл. 5).

Одержані спектри HbNO нормували за максимумом значення оптичної густини смуги дезоксигемоглобіну. На основі статистичного набору даних зі спектрів поглинання дезоксигемоглобіну та повного переходу його в нітрозилформу (60 аналізів) нами отримано зведений спектр поглинання для нітрозилгемоглобіну в дослідженому інтервалі довжин хвиль (рис. 4).

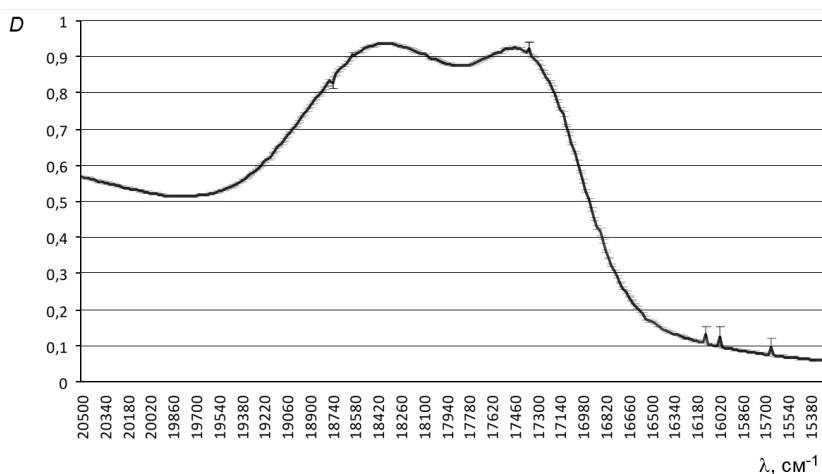


Рис. 4. Зведений спектр поглинання нітрозилгемоглобіну, нормований за максимумом спектра дезоксигемоглобіну

Fig. 4. A combined nitrosylhemoglobin absorption spectra

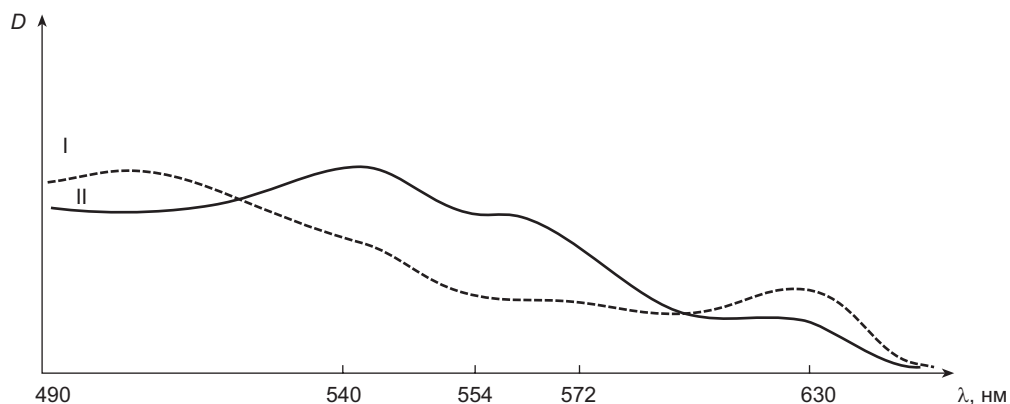


Рис. 5. Типові спектри поглинання, які характеризують перехід метгемоглобіну в нітрозилгемоглобін. Спектр I – MetHb, з характеристичними максимумами поглинання при 499,9 і 629,9 нм; спектр II – спектр поглинання розчину MetHb після реакції з NO (утворення HbNO), – широка смуга з вираженим максимумом при 538–540 і 629,9 нм

Fig. 5. Typical absorption spectra characteristic of methemoglobin transition into nitrosyl-hemoglobin. Spectrum I – MetHb, with characteristic absorption peaks at 499.9 and 629.9 nm; spectrum II – the absorption spectrum of MetHb solution following the reaction with NO (HbNO formation), a broad band with marked peaks 538–540 and 629.9 nm

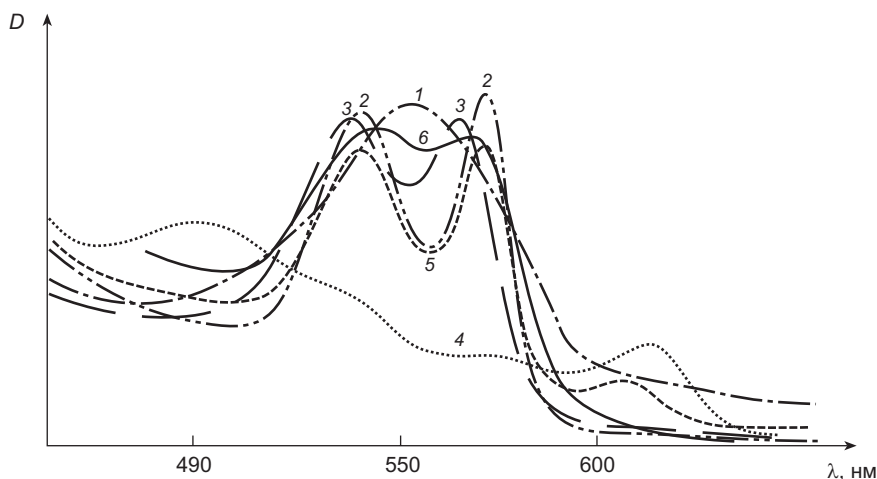
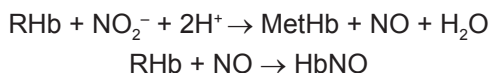


Рис. 6. Типові спектри поглинання шести лігандних форм гемоглобіну периферичної крові здорових донорів: 1 – RbHb; 2 – HbO₂; 3 – HbCO; 4 – MetHb; 5 – SHb; 6 – HbNO

Fig. 6. Typical absorption spectra of six peripheral blood hemoglobin ligand forms: 1 – RbHb; 2 – HbO₂; 3 – HbCO; 4 – MetHb; 5 – SHb; 6 – HbNO

Отримані результати щодо спектральних характеристик HbNO планується додати до одержаних раніше (рис. 6) п'яти лігандних форм гемоглобіну [1] для побудови алгоритму розрахунку вмісту шести лігандних форм в одній пробі гемолізату периферичної крові.

Вважають, що під час взаємодії іонів NO_2^- з дезоксигемоглобіном відбувається окисно-відновна реакція, в ході якої RHb окиснюється в MetHb , а іони NO_2^- відновлюються до NO , котрі вступають у реакції з утворенням HbNO за схемою:



Важливим у цій реакції є те, що відновлений NO реагує не лише з RHb , але й з MetHb (Fe^{3+}) з утворенням нітрозилформи [17, 19]. Ми отримали електронні абсорбційні спектри, які свідчать про перехід MetHb у HbNO (рис. 5).

Зниження максимумів поглинання при 630 нм і 500 нм, характерних для MetHb , та підвищення поглинання у ділянках смуг 538–572 нм, характерних для HbNO , свідчать про часткове відновлення заліза гему гемоглобіну (Fe^{3+} до Fe^{2+}). Є інформація про утворення MetHb при взаємодії HbO_2 за умов підвищення концентрації NO [16]. Можна вважати, що NO і NO_2^- -іони виявляють щодо MetHb окисно-відновні властивості.

Зважаючи на те, що NO є одним із найважливіших медіаторів дихальної функції крові, вивчення взаємодії гемоглобіну з NO є актуальним. Важливим є ще й те, що NO конкурує з киснем за зв'язування з гемоглобіном, маючи набагато більшу спорідненість (у 1000 разів) до Fe^{2+} гему, ніж O_2 [21].

У літературі існують досить обмежені відомості про методи одночасного визначення HbNO з іншими лігандними формами. Зокрема, у роботі [13] описано електрохімічний вибіркового вимірювання HbNO та SNOHb . Перспективним було би визначення шести лігандних форм гемоглобіну в одному зразку крові. Складність тут полягає у тому, що спектральні характеристики нітрозилгемоглобіну близькі до таких для оксигемоглобіну, карбоксигемоглобіну [9, 10, 16, 18]. Розроблена нами методика визначення вмісту лігандних форм гемоглобіну в одному зразку гемолізатів периферичної крові дає змогу визначити лише п'ять форм [1]. Важливими параметрами під час дослідження вмісту кількох лігандних форм гемоглобіну в одному зразку є характеристичні максимуми спектрів поглинання та ізобестичні точки. Ми порівняли спектри поглинання п'яти лігандних форм гемоглобіну зі спектром поглинання нітрозилгемоглобіну (рис. 5). На основі отриманих спектрів поглинання ми порівняли характеристичні максимуми шести лігандних форм гемоглобіну: RHb , HbO_2 , HbCO , MetHb , SHb і HbNO та діапазон їхніх відносних зміщень (табл. 5).

Аналізуючи положення смуг спектрів поглинання і їхніх максимумів, можна зробити висновок про складність одночасного визначення окремих складових багатокомпонентної системи. Для нітрозилгемоглобіну характерні дві широкі смуги, максимуми яких розміщені у діапазоні 544–544,7 нм і 572,5–572,7 нм [7, 9]. У цих діапазонах розміщені смуги для оксигемоглобіну і карбоксигемоглобіну з незначним зміщенням характеристичних максимумів (2–5,5 нм), що ускладнює урахування внеску поглинання кожної з лігандних форм навіть за повного переходу однієї лігандної форми в іншу.

Дослідження вмісту нітрозилгемоглобіну в периферичній крові за різного типу патологій можуть мати практичне значення і становлять теоретичний інтерес. Розроблений нами методичний підхід може бути використаний для експрес-аналізу з одночасним визначенням шести лігандних форм гемоглобіну в одному зразку крові.

Таблиця 5. Характеристичні параметри спектрів поглинання шести лігандних форм гемоглобіну в діапазоні 450–700 нм

Table 5. Characteristic parameters of absorption spectra of six hemoglobin ligand forms in 450–700 nm wavelength range

Лігандна форма	Максимуми абсорбції, нм	Зміщення максимумів поглинання лігандних форм одних щодо інших, нм					
		RHb	HbO ₂	HbCO	SHb	MetHb	HbNO
RHb	554,4	–	- 12,7; + 22,0	-15,5; +15,1	-65,6	-54,4; +75,6	+10,0; -18,0
HbO ₂ -смуга β-смуга	541,7; 576,4	-12,7; +22,0	–	-2,8; +6,9	-78,3; -43,6	-9,3; +53,6	-2,3; +4
HbCO-смуга β-смуга	538,9; 569,5	-15,5; +15,0	-2,3; +6,9	–		-38,0; +60,5	-6,0; -2,9
*SHb	620	+65,6	+78,3; +43,6	+81,9; +50,5	– –	-10,0	+76,0; +12,4
MetHb,	500; 630	-54,4; +75,6	-41,7; -46,4	+38,9; -61,5	-10,0	– –	+44,0; -42,4
HbNO-смуга β-смуга	544,4; 572,4	-10,0; +18,0*	+2,0; +4,0	+5,5; +2,9	-76,0; -48,0	-44,0; -12,4	– –

Примітки: "+" – батохромний ефект; "-" – гіпсхромний ефект

* – під час аналізу використано лише один характеристичний максимум – 620 нм, оскільки не було повного переведення HbO₂ в SHb

Comments: "+" – bathochrome effect; "-" – hypsochrome effect

* – we have used only one characteristic peak of 620 nm since the transition of HbO₂ into SHb was not complete

1. Bilij O.I., Dudok K.P., Lukjanec' V.M. **Determination of hemoglobin and its ligand forms in whole blood by absorption spectroscopy.** Lviv: LNU, 1998. 12 p. (In Ukrainian).
2. Bohnhorst B., Hartmann H., Lange M. Severe methemoglobinemia caused by continuous lidocaine infusion in a term neonate. **Eur. J. Paediatr. Neurol**, 2017; 21(3): 576–579.
3. Bonitenko Yu. Yu., Livanov Ye. Yu., Bonitenko Ye. Yu., Kalmanson M. L. **Acute poisoning with alcohol and its agents.** St. Petersburg: Lan' 2000, 112 p. (In Russian).
4. Buhmera A., Pichb A., Schmidta M., Haghikiac A., Tsikasa D. Evidence by chromatography and mass spectrometry that inorganic nitrite induces S-glutathionylation of hemoglobin in human red blood cells. **Journal of Chromatography B**, 2016; 1019: 72–82.
5. Burov Yu.V., Vedernikova N. N. **Neurochemical and Pharmacological Journal of Alcoholism.** Moscow: Medicine, 1985: 239 p. (In Russian).
6. Charchenko O.I., Chaika V.O., Gavrish L.I., Ostapchenko L.I., Rizun O.V. Ethanol metabolism in different rats organs under the experimental alcohol intoxication. **Physics of the Alive**, 2008; 16(1): 111–115. (In Ukrainian).
7. Dudok K., Kaniuka O., Fedorovych A., Burda V., Sybirna N. NO-dependent changing of the ligand form of hemoglobin in peripheral blood of people. **Visnyk of the Lviv University. Biology Series**, 2016; 73: 130–136. (In Ukrainian).
8. Dudok K. P., Moroz O.M., Dudok T., Vlokh I., Vlokh R. Spectroscopic study of haemoglobin ligands forms and erythrocyte membrane dynamics at alcohol intoxication of white rats. **Ukr. J. Phys. Opt**, 2004; 5(1): 32–35. (In Ukrainian).

9. Frank B. Jensen Nitric oxide formation from nitrite in zebrafish. **Journal of Experimental Biology**, 2007; 210: 3387–3394.
10. Hille R., Olson J.S., Palmer G. Spectral transitions of nitrosyl hemes during ligand-binding to hemoglobin. **J. Biol. Chem**, 1979; 254: 2110–2120.
11. Ivanov G. Modification of spectrophotometric method for determining the oxygen hemoglobin dissociation curves. **Bull. Exp. Biol. and Medicine**, 1975; 11: 122–125. (In Russian).
12. Lyuta M., Ferents I., Burda V., Fedorovych A., Dudok K., Sybirna N. Oxygen transport function of hemoglobin under the admission agmatine in experimental diabetes mellitus. **Visnyk of the Lviv University. Biology Series**, 2013; 62: 46–54. (In Ukrainian).
13. Palmerini C. A., Arienti G., Palombari R. Electrochemical assay for determining nitrosyl derivatives of human hemoglobin: nitrosylhemoglobin and S-nitrosylhemoglobin. **Anal Biochem**, 2004; 330(2): 306–10.
14. Perutz M.F. Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. **Ann. Rev. Biochem**, 1979; 48: 327–386.
15. Reutov V.P., Gozhenko A.I., Okhotin V.E. et al. Role of nitrogen oxide in myocardium work adjusting. Cycle of nitrogen oxide and NO-synthetase systems in myocardium. **Actual Problems of Transport Medicine**, 2007; 4(10): 89–112. (In Russian).
16. Ruban M.K. Vashanov G.A. Lavrinenko I. A. Structurally functional changes nitrosylating haemoglobin, induced by oxygenation. **Proceedings Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy**, 2010; 1: 56–61. (In Russian).
17. Salgado M.T., Cao Z., Nagababu E. et al. Red blood cell membrane-facilitated release of nitrite-derived nitric oxide bioactivity. **Biochemistry**, 2015; 54(44): 6712–23.
18. Salhany J.M. Kinetics of reaction of nitrite with deoxy hemoglobin after rapid deoxygenation or predeoxygenation by dithionite measured in solution and bound to the cytoplasmic domain of band 3 (SLC4A1). **Biochemistry**, 2008; 47(22): 6059–72.
19. Stepuro T.L., Zinchuk V.V. Nitric oxide effect on the hemoglobin-oxygen affinity. **Journ. Physiol. & Pharmacol**, 2006; 57(1): 29–38.
20. Sybirna N.O., Burda V.A., Chajka Ya.P. **Methods of blood system research**. Lviv: LNU, 2006. 100 p. (In Ukrainian).
21. Sybirna N.O., Lyuta M.Y., Burda V.A., Fedorovych A M. The influence of aminoguanidine on the physical and chemical properties of hemoglobin under type 1 diabetes mellitus. **The Animal Biology**, 2005; 7(1–2): 194–199.
22. Sybirna N. O., Lyuta M. Ya., Klymyshyn N.I. Molecular mechanisms of nitric oxide deposition in erythrocytes. **Studia Biologica**, 2010; 4(1): 143–60. (In Ukrainian).
23. Uretii S.I., Kotsuruba A.V., Kopyak B.S. Reducing resistance to acid hemolysis by iron-contained drug increases the level of hemoglobin in the erythrocytes of aging animals. **Fiziol. Zh**, 2016; 62(4): 31–40. (In Ukrainian).
24. Vlokh I., Dudok T., Fedorovich A., and Vlokh R. Optical Spectra of Hemoglobin Taken form Alcohol Dependent Humans **Ukr. J. Phys. Opt**, 2005; 6(4): 142–145. (In Ukrainian).
25. Xu X., Cho M., Spencer N.Y. et al. Measurements of nitric oxide on the heme iron and β -93 thiol of human hemoglobin during cycles of oxygenation and deoxygenation. **PNAS USA**, 2003; 100(20): 11304–11308.
26. Yefimenko N.V., Dudok K.P., Sybirna N.O. L-arginine and l-name effects on functional and physicochemical properties of hemoglobin in conditions of experimental chronic alcohol intoxication. **Studia Biologica**, 2015; 9(2): 85–98. (In Ukrainian).
27. Yonetani T., Zhou Y., Chen X., Tsuneshige A. Electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies of alpha-Nitrosyl hemoglobin. A novel oxygen carrier having no-assisted allosteric functions. **J. Biol Chem**, 1998; 273(32): 20323–33.
28. Zhukova A.G., Sazontova T.G. Hem-oxygenase: function, regulation, biological role. **Hypoxia Medical Journ**, 2004; 12(3–4): 30–43. (In Ukrainian).
29. Zubachyk V.M., Yarychkivska N.V. The role of nitric oxide in periodontal tissue homeostasis (review of the references). **Bukov. Med. Herald**, 2016; 20(2)(78): 194–198. (In Ukrainian).

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF HEMOGLOBIN LIGAND FORMS UNDER EXPERIMENTAL STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES AND ALCOHOL INTOXICATION

K. P. Dudok, V. A. Burda, M. Ya. Liuta, A. M. Fedorovych, O. I. Bilyi, N. V. Yefimenko, O. P. Kaniuka, N. O. Sybirna

*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: dudok.kp@gmail.com*

The study of hemoglobin affinity to oxygen, oxygen capacity and the content of ligand forms has been conducted in hemolyzates of rat peripheral blood at chronic alcohol intoxication models and experimental diabetes mellitus. The findings revealed that at alcohol intoxication both hemoglobin affinity to oxygen and hemoglobin oxygen capacity validly decrease, whereas at experimental streptozotocin-induced diabetes hemoglobin the affinity to oxygen increases and oxygen capacity is quite high. The results of study demonstrated that sulf- and methemoglobin levels rise under alcohol intoxication and sulf-, met- and carboxyhemoglobin levels rise under experimental diabetes mellitus. We have also undertaken study of hemoglobin affinity to oxygen, oxygen capacity and the ratio of hemoglobin ligand forms in alcoholics and healthy donors. A valid increase in sulf- and methemoglobin and a decrease in hemoglobin affinity to oxygen in alcoholics (32.50 ± 0.45 versus 28.60 ± 0.54 mm Hg in the control group) with insignificant changes in oxygen capacity were revealed. Since minor ligand forms contribute to the affinity of total hemoglobin to oxygen, their quantitative characteristics are essential. Thus, data on absorption spectra which characterize nitrosyl-hemoglobin ligand form and transition of deoxy- and methemoglobin into nitrosyl-hemoglobin have been collected. A combined absorption spectrum of nitrosyl-hemoglobin has been built based on the statistical data set deoxyhemoglobin and its full transition into nitrosyl-hemoglobin (60 analyses) in the examined wavelength range. The article provides the results of the comparative analysis of electronic absorption spectra characteristic peaks of six hemoglobin ligand forms taken from peripheral blood in healthy donors in 450–750 nm wavelength range. The studies can be a pre-requisite for the development of methods for determining six hemoglobin ligand forms in a single blood sample.

Keywords: experimental diabetes mellitus, alcohol intoxication, hemoglobin, ligand forms, nitrosyl-hemoglobin, absorption spectra

Одержано: 08.06.2017