

ВМІСТ РІЗНИХ ФОРМ ГЕМОГЛОБІНУ В ЕРИТРОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ БІЛКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

Г. П. КОПИЛЬЧУК, І. М. БУЧКОВСЬКА, М. Г. СКРИПНИК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58000
e-mail: kopilchuk@gmail.com

У роботі досліджено рівень загального гемоглобіну та його основного деривату – оксигемоглобіну в гемолізатах еритроцитів крові щурів за умов аліментарної депривації протеїну. Водночас значна увага приділялася визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну – маркеру порушень вуглеводного обміну в організмі за умов білкової недостатності. З метою дослідження особливостей даних біохімічних показників за умов аліментарної депривації протеїну дослідних тварин протягом 28 днів утримували на напівсинтетичному низькопротеїновому раціоні з урахуванням принципу парного харчування. Гемолізат еритроцитів отримували методом Драбкіна із подальшим видаленням їх ретикулярної стромы. Визначення концентрації загального гемоглобіну проводили гемоглобінціанідним методом, оксигемоглобіну – спектрофотометричним методом шляхом співвідношення молярних коефіцієнтів екстинкції при досягненні максимального рівня оксигенації молекули. Рівень глікозильованого гемоглобіну (HbA_{1c}) в гемолізаті еритроцитів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою. Встановлено, що за умов білкової недостатності в гемолізаті еритроцитів крові щурів відбувається зниження концентрації загального гемоглобіну та оксигемоглобіну в 1,4 рази порівняно з показниками контролю. Слід відмітити, що зниження вмісту гемоглобіну за умов білкової недостатності, з одного боку, може бути пов'язане з порушеннями синтезу поліпептидних ланцюгів глобіну внаслідок дефіциту амінокислот, з іншого, – порушенням синтезу гему. Водночас у дослідній групі тварин спостерігається зниження вмісту основної лігандної форми гемоглобіну – оксигемоглобіну, що може свідчити про порушення процесів зв'язування та віддачі кисню і, як наслідок, зміни спорідненості гемоглобіну до кисню. Водночас нами досліджено, що в гемолізаті еритроцитів крові щурів, які перебували на низькопротеїновій дієті, відбувається двократне підвищення рівня глікозильованого гемоглобіну порівняно із показниками контролю, що розглядається як прогностичний показник метаболічної гіперглікемії, оскільки відображає відсоткову кількість гемоглобіну крові, незворотно з'єднаного із глюкозою). Глікозильований гемоглобін внаслідок міцного зв'язку з киснем важко віддає його тканинам, тому підвищення його вмісту в крові спричинює виникнення тканинної гіпоксії, що пов'язано із недостатнім насиченням киснем базальних мембран

Ключові слова: гемоглобін, оксигемоглобін, глікозильований гемоглобін, гемолізат, еритроцити, низькопротеїновий раціон

Вступ. Гемоглобіни (Hb) – гетерогенна родина залізовмісних функціональних білків еритроцитів, що містять в якості простетичної групи протопорфірин IX (гем). Окрім транспорту кисню, вони виконують низку важливих функцій: зв'язування оксиду азоту та сульфідів, взаємодію з активними метаболітами Оксигену та Нітрогену тощо (Boas and Franceschini, 2011; Осипов и др., 2007). Сьогодні в літературі (Топунов и Петрова, 2001; Дудок, 2010; Shibayama et al., 2014) часто обговорюється питання структурно-функціонального стану молекули гемоглобіну та кількісного співвідношення його лігандних форм, зокрема, дезокси- (RHb), окси- (HbO₂), карбокси- (HbCO), сульфо- (SHb) та метгемоглобіну (MetHb) за умов розвитку патологічних станів різного генезу.

Не викликає сумніву, що за умов білково-енергетичної недостатності (БЕН) актуальним залишається визначення рівня гемоглобіну та його основних дериватів, зокрема

оксигемоглобіну – основного компоненту гемоглобінової системи, оскільки за умов вираженого дефіциту екзогенного надходження протеїну відбувається інтенсифікація окислювальних процесів у тканинах (Копильчук та Бучковська, 2013), що виявляє негативний ефект на ступінь дисоціації HbO₂ і, як наслідок, може спричинювати дисбаланс кисневого гомеостазу та розвиток тканинної гіпоксії (Васильєва, 2005).

У сучасних наукових джерелах (Martin and Tomlinson, 2014; Ladyzynski et al., 2014; Радченко, 2008; Ильин и др., 2008) широко обговорюється одна із мінорних форм гемоглобінів – глікозильований гемоглобін (HbA_{1c}), кількість якого складає близько 5-10%. Вміст HbA_{1c} вважається маркерним показником порушень вуглеводного обміну (Скибчук та Соломенчук, 2005; Калиман, 2008). Переважно сайтами глікозилювання гемоглобіну є аміногрупи N-кінцевої амінокислоти валіну обох

β -ланцюгів, а також ϵ -аміногрупи деяких залишків лізину α - і β -ланцюгів глобіну (Ladyzynski et al., 2014). Глікозильований гемоглобін має підвищену спорідненість до кисню, і збільшення його рівня може погіршити оксигенацію тканин. Однак, з іншого боку, утворення HbA_{1c} також може бути пристосувальною реакцією організму для збільшення кисневої ємності периферичної крові (Радченко, 2008; Ильин и др., 2008).

Метою даної роботи було дослідження рівня загального, окси- та глікозильованого гемоглобіну в гемолізатах еритроцитів крові щурів за умов низькопротеїнового раціону.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на білих безпородних щурах віком 2,5-3 місяці та масою 100-120 г. Тварин утримували у пластмасових клітках із піщаною підстилкою та вільним доступом до води. Нормування добового раціону проводили з урахуванням принципу парного харчування (Mashiko et al., 2007) Усі маніпуляції здійснювали згідно із «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) і погодженими з положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Дослідні тварини були поділені на групи:

1 – тварини, які утримувалися на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами – група контролю (К) (Reeves et al., 1993);

2 – тварини, які протягом 28 днів до початку експерименту отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон (1/3 загальноприйнятої норми добової потреби протеїну) (НПР).

Цервікальну дислокацію дослідних тварин під легким ефірним наркозом проводили на 28 добу експерименту. Для дослідження використовували цитровану кров, взятую із *vena portae hepatis* загальноприйнятим методом. Еритроцитарну масу відділяли від плазми центрифугуванням при 500 g. Еритроцити відмивали від білків плазми крові ізотонічним розчином NaCl. Відмиті еритроцити гемолізували з подальшим центрифугуванням для видалення їх ретикулярної стромы за методом Драбкіна (Drabkin, 1949).

Визначення концентрації загального гемоглобіну (Hb) проводили гемоглобінціанідним методом з використанням стандартного набору реактивів «Філісіт-Діагностика» (Україна). Вміст гемоглобіну виражали в г/л.

Кількісне визначення лігандної форми гемоглобіну – оксигемоглобіну (HbO₂) проводили спектрофотометричним методом (Логвиненко А.Г, Логвиненко С.И., 1990), що ґрунтується на співвідношенні молярних коефіцієнтів екстинкції (E_{λ}) вибраної аналітичної довжини хвилі ($D'_{\max} = 560 - 580$ нм; $D''_{\max} = 535 - 560$ нм) при досягненні максимального рівня оксигенації молекули. Результати відносного вмісту HbO₂ отримували шляхом розрахунку та виражали у відсотках до кількості гемоглобіну.

Вміст глікозильованого гемоглобіну (HbA_{1c}) в гемолізаті еритроцитів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою з використанням тест-системи «Реагент» (Україна). Стийка форма глікозильованого гемоглобіну містить 1-дезоксигуанозил-1-(N-валіл)-фруктозу. При нагріванні з фосфорною кислотою вуглеводний залишок гідролізується до 5-оксиметил-2-фуральдегіду, що при взаємодії з 2-тіобарбітуратом проявляє забарвлення, інтенсивність якого визначали фотометрично. Вміст HbA_{1c} розраховували за співвідношенням концентрації фруктози та кількості гемоглобіну в гемолізаті й виражали в мкмоль фруктози/г гемоглобіну.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики. Порівняння між двома групами здійснювали за допомогою програми *Microsoft Excel*, використовуючи двовибірковий *t*-критерій Стьюдента для незалежних вибірок. Вірогідними вважали відмінності між групами при $P \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати досліджень показали, що в гемолізаті еритроцитів крові щурів, які перебували на низькопротеїновій дієті, спостерігається зниження концентрації загального гемоглобіну в 1,4 рази порівняно із показниками контрольної групи (рис. 1). Відомо, що усі компоненти гемоглобіну – α - та β -ланцюги, гем синтезуються у збалансованих кількостях. Вірогідно, зниження вмісту гемоглобіну за умов білкової недостатності, з одного боку, може бути пов'язане з порушеннями синтезу поліпептидних ланцюгів глобіну внаслідок дефіциту амінокислот, з іншого, – порушенням синтезу гему.

За даними літератури (Schechter, 2008; Vinogradov and Moens, 2008; Wajzman and Mogadkhani, 2011) найважливіше значення в синтезі глобіну належить есенціальним амінокислотам, зокрема, гістидину, лізину та триптофану, відсутність або недостатність яких у харчовому раціоні, супроводжується порушенням гематопоезу, і, як наслідок, зниженням кількості еритроцитів та пригніченням синтезу молекули гемоглобіну.

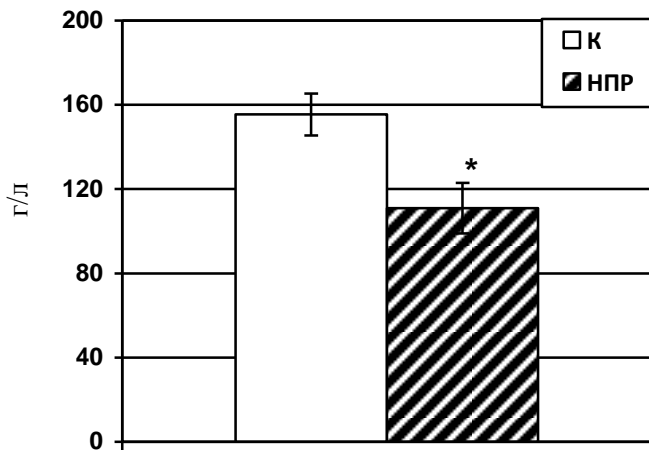


Рис. 1. Вміст загального гемоглобіну в гемолізаті еритроцитів щурів за умов низькопротеїнового раціону

Примітка (тут і надалі): К – тварини, які утримувалися на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами; НПР – тварини, які протягом 4 тижнів до початку експерименту отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон (1/3 загальноприйнятої норми добової потреби протеїну); * – статистично достовірна різниця порівняно з показниками контролю, $P \leq 0,05$.

Fig. 1. The content of total hemoglobin in the hemolysate of the rats erythrocytes on condition of the low-protein ration

Note (here in after): K – animals that were kept on a semisynthetic diet balanced in all nutrients ; НПР – animals that received a semisynthetic low-protein diet (1/3 of the conventional rules of the daily requirement of protein) are within 4 weeks before the experiment; * – statistically significant difference compared to control values, $P \leq 0,05$

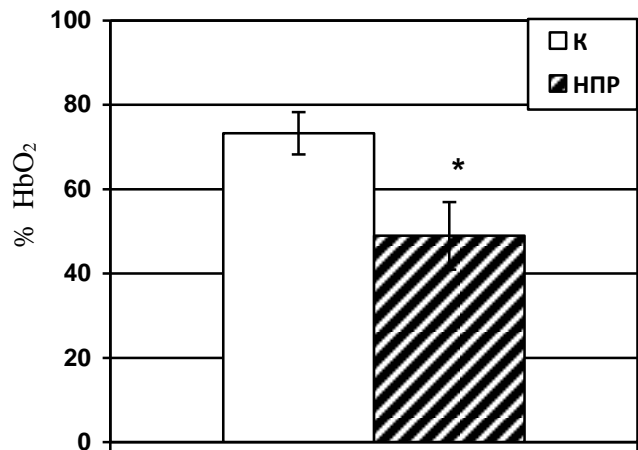


Рис. 2. Вміст оксигемоглобіну в гемолізаті еритроцитів щурів за умов низькопротеїнового раціону

Fig. 2. The content of total oxyhemoglobin in the hemolysate of the rats erythrocytes on condition of the low-protein ration

Слід відмітити, що гістидин виступає зв'язуючою ланкою між глобіном та гемом (Дудок та ін., 2002; Nabil, 2008), оскільки займає певне координаційне положення іона Fe^{2+} в складі феропротопорфірину – проксимальний залишок His F8 та дистальний His E7, який знаходиться поблизу кисеньзв'язуючої ділянки гему, але не має з нею безпосереднього зв'язку (Zhao et al., 2014). Окрім того, синтез поліпептидних ланцюгів глобіну відбувається тільки при наявності гему, який відразу ж зв'язується з білком (Clark and Thein, 2004). Дані літератури (Jones et al., 2012; Jackya et al., 2012) засвідчують, що субстратами для синтезу порфіринового циклу гему є гліцин та сукциніл-КоА – інтермедіат циклу трикарбонових кислот. Можна припустити, що зниження вмісту загального гемоглобіну за умов перебування тварин на низькопротеїновому раціоні безпосередньо пов'язано із порушенням синтезу гему, оскільки пул сукциніл-КоА в організмі, окрім його утворення із α -кетоглутарату, поповнюється шляхом метаболічних перетворень метіоніну, ізолейцину та валіну. Окрім того, гем після звільнення з гемоглобіну повторно не використовується для ресинтезу нової молекули

білка, а його порфіриновий цикл перетворюється в жовчеві пігменти, які виводяться з організму.

Унікальною особливістю гемоглобіну є його здатність зворотньо зв'язувати O_2 внаслідок позитивної кооперативної взаємодії між субодинами, яка проявляється в збільшенні спорідненості Hb із кожною наступною молекулою кисню (Артюхов и др., 2004; Космачевская и Топунов А.Ф., 2009; Люта та ін., 2013).

В ході експериментальних досліджень нами виявлено, що в гемолізаті еритроцитів крові щурів, які протягом 28 днів зазнавали білково-енергетичної недостатності, спостерігається зниження вмісту оксигемоглобіну в 1,5 рази порівняно з показниками контролю. Відомо, що координаційні властивості гему визначають здатність молекули гемоглобіну до приєднання молекулярного кисню завдяки утворенню зв'язків між іоном Fe^{2+} і амінокислотними залишками поліпептидних ланцюгів глобіну. Ймовірно, недостатність білка в харчовому раціоні призводить не тільки до деформації структурно-просторової організації гемоглобіну, а й до порушення функціонування кисеньзв'язуючої ділянки.

За даними літератури (Васильєва, 2005; Дудок та ін., 2010) близько 7-10% гемоглобіну зв'язано з мембраною еритроцита. У свою чергу, модифікація структури компонентів еритроцитарних мембран є причиною їхньої функціональної дестабілізації, з якою пов'язана система транспорту іонів (Cl⁻, H⁺) та газів (O₂, CO₂). У нашому випадку зниження рівня оксигемоглобіну може бути пов'язано не лише зі зменшенням концентрації загального Hb, але й порушенням процесів зв'язування та віддачі гемоглобіном кисню, а також зміною співвідношення вмісту окремих лігандних форм гемоглобіну, наприклад окси- та карбоксигемоглобіну (Boas and Franceschini, 2011).

Відомо (Ryter and Tyrrrell, 2000; Люта та ін., 2013), що конформаційні порушення в оточенні гему, зміна його гідрофобності, поява аніонів у цьому просторі призводить до відщеплення Оксигену у формі супероксидного аніона і переходу Fe²⁺ → Fe³⁺. Можна припустити, що утворений супероксид при взаємодії з NO, надмірна кількість якого продукується за умов білкової недостатності (Копильчук и Бучковская, 2014) може призводити до утворення більш токсичного продукту – пероксинітриду (ONOO⁻).

Дані літератури (Зинчук, 2003) засвідчують, що гемопротейни є прямими мішенями дії пероксинітриду. При взаємодії ONOO⁻ з оксигемоглобіном відбувається утворення метформи гемопротейнів, пошкодження порфіринового кільця з подальшою деградацією гему, що супроводжується окисненням заліза та нітрування залишків тирозину. Нітрування гемоглобіну призводить до зміни конформації білка, внаслідок якої гем виходить із гідрофобної кишені, й, отже, підвищується ймовірність його вивільнення та руйнування (Осипов, 2007; Блюм та ін., 2009). Вірогідно, виявлене нами зменшення вмісту оксигемоглобіну – основного деривату Hb може бути наслідком модифікації глобінового компонента, а також порушення зв'язку гему з глобіном, що супроводжується змінами спорідненості гемоглобіну до кисню (Рогаткин, 2012).

Відомо, що більшість білків організму, зокрема, гемоглобін, трансферин, колаген тощо, підлягають процесу неферментативного глікозилювання (Вельков, 2008; Калиман, 2008). Глікозилювання гемоглобіну продовжується протягом усього життя еритроцита і триває в середньому 120 днів. У межах цього терміну найбільший прогностичним вважається рівень HbA_{1c} за останні 30 днів, коли формується приблизно 50% даного протеїну. У сучасній

літературі (Радченко, 2008; Скрипник, 2012) рівень глікозилюваного гемоглобіну розглядають як інтегрований показник компенсації вуглеводного обміну, оскільки він відображає відсоткову кількість гемоглобіну крові, незворотно з'єднаного з глюкозою.

У наших дослідженнях встановлено двократно підвищення рівня глікозилюваного гемоглобіну в гемолізаті крові щурів, які споживали низькопротеїновий раціон, порівняно зі значеннями контрольної групи тварин. Вірогідно, зростання даного показника за умов білкової недостатності, відбувається внаслідок порушення толерантності до глюкози, що супроводжується розвитком метаболічної гіперглікемії (Goldstein et al., 2004; Ильин и др., 2008). Глікозилюваний гемоглобін внаслідок міцного зв'язку з киснем важко віддає його тканинам, тому підвищення його вмісту в крові спричинює виникнення тканинної гіпоксії, що пов'язано із недостатнім насиченням киснем базальних мембран (Скибчук та Соломенчук, 2005). Таким чином, зростання рівня глікозилюваного гемоглобіну з одночасним зниженням його оксоформи свідчить про порушення кисеньтранспортної функції в цілому, що, в свою чергу, може призвести до порушення рівноваги між процесами вільнорадикального окислення й антиоксидантного захисту в організмі.

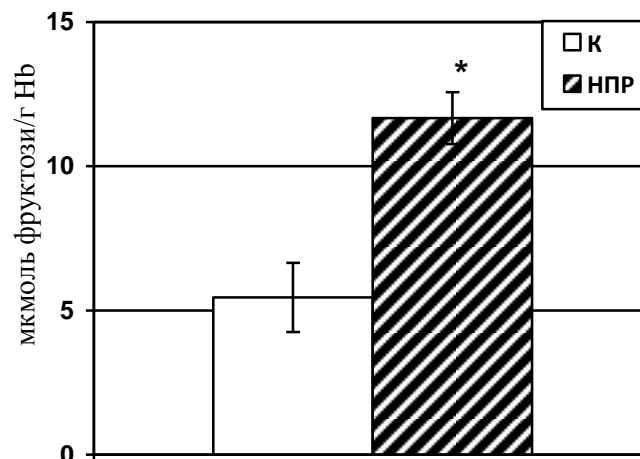


Рис. 3. Вміст глікозилюваного гемоглобіну в гемолізаті еритроцитів щурів за умов низькопротеїнового раціону.

Fig. 3. The content of total glycosylated hemoglobin in the hemolysate of the rats erythrocytes on condition of the low-protein ration.

Висновки. Отже, за умов білкової недостатності в гемолізаті крові щурів відбувається зниження загального та оксигемоглобіну з одночасним підвищенням його глікозильованої форми.

Список літератури:

1. Артюхов В.Г., Калаева Е.А., Путинцева О.В. Динамика оксигенации нативного и УФ-модифицированного гемоглобина человека в присутствии оксида азота // Физиология человека. – 2004. – Т. 30, № 2. С. 110–116.
2. Блюм Я.Б., Красиленко Ю.А., Ємець А.І. Нітрування тирозину як регуляторна посттрансляційна модифікація протеїнів // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, № 5. – С. 5 – 15.
3. Васильева Е.М. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, № 2. – С. 119 – 126.
4. Дудок К.П., Влох І.Й., Влох Р.О. Структурно-функціональний стан еритроцитів, вміст лігандних форм гемоглобіну і молекул середньої маси у крові людей, хворих на шизофренію // Біологічні студії. – 2010. – Т 4, № 1. – С. 15 – 26.
5. Зинчук В.В. Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина // Успехи физиол. наук. – 2003. – Т. 34, № 2. – С. 33 – 45.
6. Ильин А.В., Арбузова М.И., Князева А.П. Гликированный гемоглобин как ключевой параметр при мониторинге больных сахарным диабетом. Оптимальная организация исследований // Сахарный диабет. – 2008. – № 2. – С. 60 – 64.
7. Калиман В.П. Роль гликированного гемоглобина и альбумина в диагностике гипергликемических состояний // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2008. – № 1. – С. 53 – 55.
8. Копильчук Г.П., Бучковська І.М. NO-синтазна активність у клітинах печінки щурів за умов різної забезпеченості протеїном // Біологічні системи. – 2013. – Т. 5, № 2. – С. 147 – 151.
9. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Гемоглобины – разнообразие структуры и функций: обзор // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 6. – С. 627 – 653.
10. Логвиненко А.Г., Логвиненко С.И. Спектрофотометрический метод определения оксигемоглобина в крови // Лаб. дело. – 1990. – №3. – С.42 – 43.
11. Люта М., Федорович А., Бурда В. та ін. Вплив агматину на фізико-хімічні властивості гемоглобіну щурів за експериментального цукрового діабету // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2011. – Вип. 55. – С. 39 – 46.
12. Люта М., Ференц І., Бурда В. та ін. Кисеньтранспортна функція гемоглобіну при введенні агматину за експериментального цукрового діабету // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2013. – Вип. 62. – С. 46 – 54.
13. Осипов А.Н., Борисенко Г.Г., Владимиров Ю.А. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов // Успехи биол. хим. – 2007. – Т. 47. – С. 259 – 292.
14. Радченко О.М. Глікозильований гемоглобін – метаболічний маркер пошкодження // Проблеми ендокринної патології. – 2008. – № 1. – С. 104 – 107.
15. Рогаткин Д.А. Физические основы оптической оксиметрии // Медицинская физика. – 2012. – № 2. – С. 97 – 114.
16. Скибчук В.А., Соломенчук Т.М. Глікозильований гемоглобін – фактор підвищеного ризику мікро- і макросудинних ускладнень у хворих на цукровий діабет // Український медичний часопис. – 2005. – № 5(49) – С. 81 – 88.
17. Скрипник Н.В. Діагностичне значення глікованого гемоглобіну в клінічній практиці // Клінічна та експериментальна патологія. – 2012. – Т. 12, № 2(40). – С. 142 – 147.
18. Топунов А.Ф., Петрова Н.Э. Гемоглобины: эволюция, распространение и гетерогенность // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 199 – 228.
19. Boas D.A., Franceschini M.A. Haemoglobin oxygen saturation as a biomarker: the problem and a solution // Phil. Trans. R. Soc. – 2011. – Vol. 369. – P. 4407 – 4424.
20. Chung J., Chen C., Paw B.H. Heme metabolism and erythropoiesis // Current Opinion in Hematology. – 2012. – Vol. 19, № 3. – P. 156 – 162.
21. Clark B.E., Thein S.L. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders // Clin. Lab. Haem. – 2004. – № 26. – P. 159 – 176.
22. Drabkin D.A simplified technique for largescale crystallization myoglobin and haemoglobin in the crystalline // Arch. Biochem. – 1949. – Vol. 21. – P. 224 – 226.
23. Goldstein D.E., Little R.R., Lorenz R.A. et al. Tests of glycemia in diabetes // Diabetes Care. – 2004. – Vol. 27, № 7. – P. 1761 – 1773.
24. Jones E.M., Balakrishnan G., Spiro T.G. Heme Reactivity is Uncoupled from Quaternary Structure in Gel-encapsulated Hemoglobin: A Resonance Raman Spectroscopic Study // J Am Chem Soc. – 2012. – Vol. 134, № 7. – P. 3461 – 3471.
25. Ladyzynski P., Foltynski P., Bak M. et al. Validation of a hemoglobin A 1c model in patients with type 1 and type 2 diabetes and its use to go beyond the averaged relationship of hemoglobin A 1c and mean glucose level // J Transl Med. – 2014. – Vol. 12, № 1. – P. 328 – 336.
26. Martin J., Tomlinson P. Hepatic complications in poorly controlled type 1 diabetes mellitus: a case report // N. Z. Med J. – 2014 – Vol. 127. – P. 95 – 97.
27. Mashiko S., Ishihara A., Iwaasa H. et al. Pair-Feeding Study Reveals That a Y5 Antagonist Causes Weight Loss in Diet-Induced Obese Mice by Modulating Food Intake and Energy Expenditure // Molecular pharmacology. – 2007. – Vol. 71, № 2. – P. 602-608.
28. Nabil G.M. A Biophysical Study on Hemoglobin Molecule Irradiated by near Ultraviolet Waves // Global Veterinaria. – 2008. – № 2(4). – P. 165 – 168.
29. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of

- the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet // The journal of nutrition. – 1993. – № 5. – P. 1939-1951.
30. Ryter S.W., Tyrrell R.M. The heme synthesis and degradation pathway: role in oxidant sensitivity // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – № 8. – P. 289 – 309.
 31. Schechter A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine // Blood. – 2008. – Vol. 112, № 10. – P. 3927 – 3938.
 32. Shibayama N., Sugiyama K., Tame J. et al. Capturing the Hemoglobin Allosteric Transition in a Single Crystal Form // J. Am. Chem. Soc. – 2014. – Vol. 136, № 13. – P. 5097 – 5105.
 33. Vinogradov S.N., Moens L. Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage and sensing // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283. – P. 8773 – 8777.
 34. Wajcman H., Moradkhani K. Abnormal haemoglobins: detection and characterization // Indian J Med Res. – 2011. – Vol. 134. – P. 538 – 546.
 35. Zhao J., Serrano V., Franzen S. A Model for the Flexibility of the Distal Histidine in Dehaloperoxidase-Hemoglobin A Based on X-ray Crystal Structures of the Carbon Monoxide Adduct // Biochemistry. – 2014. – Vol. 53, № 15. – P. 2474 – 2482.

THE LEVEL OF DIFFERENT FORMS OF HEMOGLOBIN IN THE HEMOLISAT OF THE ERYTHROCYTES OF RATS BLOOD ON CONDITION OF THE LACK OF PROTEIN

G. P. Kopylchuk, I. M. Buchkovska, M. G. Skrypnyk

In this work has been researched the general level of hemoglobin and its main derivative - oxyhemoglobin in hemolysates of the rats' erythrocytes under conditions of nutritional deprivation of protein. At the same time considerable attention was paid to the determination of glycosylated hemoglobin content - marker of disruptions of carbohydrate metabolism in the body under conditions of protein deficiency. In order to study the characteristics of these biochemical indicators under conditions of nutritional protein deprivation experimental animals were kept for 28 days on a semi-synthetic low-protein diet on the principle of pair food. Hemolysate of erythrocytes was obtained by Drabkin method with subsequent removal of the reticular stroma. Determination of total hemoglobin was made by a hemoglobincyanide method, oxyhemoglobin - by a spectrophotometric method by means of the molar extinction coefficient at achieving the maximum level of oxygenation of the molecule. The level of glycosylated hemoglobin in red blood cells' hemolysate was determined by reaction with the thiobarbituric acid. It was found out that under conditions of protein deficiency in rats' blood hemolysate is a decrease in the concentration of total hemoglobin and oxyhemoglobin 1,4 times compared to the control indicators. It should be noted that the decrease of hemoglobin under conditions of protein deficiency on the one hand, it may be due to impaired synthesis of globin polypeptide chains due to a deficiency of aminoacids, on the other hand - a disruption of heme synthesis. At the same time in the experimental group of animals has been observed the decrease of main ligand form of hemoglobin - oxyhemoglobin, which may indicate the disruption of binding and kickback of oxygen and the resulting changes in the affinity of hemoglobin for oxygen. At the same time we studied that hemolysate of red blood cells of rats who were on a low-protein diet has double increase in glycosylated hemoglobin compared to control indicators, which is considered as a prognostic indicator of metabolic hyperglycemia, because it reflects percentage of hemoglobin, irrevocably connected to glucose. Glycosylated hemoglobin due to a strong relationship with oxygen gives it hard to tissues, so increasing of its content in the blood causes the occurrence of tissue hypoxia, which is related to insufficient oxygenation of basal membrans.

Keywords: hemoglobin, oxyhemoglobin, glycosylated hemoglobin, hemolysate, erythrocytes, low-protein ration

Одержано редколегією 23.12.2014