

ВМІСТ МЕТГЕМОГЛОБІНУ ТА КАРБОКСИГЕМОГЛОБІНУ В ЕРИТРОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ НА ТЛІ АЛІМЕНТАРНОЇ ДЕПРИВАЦІЇ ПРОТЕЇНУ

Г. П. КОПИЛЬЧУК*, І. М. НИКОЛАЙЧУК, Я. С. КЛЮЧНИК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
*e-mail: g.kopilchuk@chnu.edu.ua

У роботі представлені дослідження вмісту загального гемоглобіну та його патологічних дериватів – метгемоглобіну та карбоксигемоглобіну в еритроцитах щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарної депривації протеїну. З метою моделювання низькопротеїнової дієти тварини протягом 28 днів отримували ізоенергетичний раціон, що містив 4,7 % протеїну, 10 % жирів та 85,3 % вуглеводів, розрахований згідно з рекомендаціями American Institute of Nutrition. Моделювання гострого токсичного ураження проводили шляхом введення *per os* дослідним тваринам ацетамінофену з розрахунку 1250 мг/кг маси тварини. Вміст загального гемоглобіну досліджували ацетонціангідриновим методом, принцип якого ґрунтується на взаємодії гемоглобіну з $K_3[Fe(CN)_6]$, внаслідок чого утворюється метгемоглобін. Останній з ацетонціангідрином утворює ціанметгемоглобін (геміглобінціанід). Концентрацію метгемоглобіну в гемолізаті еритроцитів оцінювали спектрофотометричним методом шляхом визначення максимального поглинання при 630 нм. Вміст карбоксигемоглобіну в еритроцитах вимірювали за методом, що базується на визначенні величини його абсорбції при довжинах хвиль 534 і 563 нм.

Встановлено, що за умов токсичного ураження на тлі аліментарної депривації протеїну в дослідних тварин спостерігається зменшення кількості еритроцитів вдовіч порівняно зі значеннями контрольної групи. При цьому і білкова недостатність, і введення токсичних доз ацетамінофену виявляють однозначний вплив на досліджуваній показник. Водночас зменшення кількості еритроцитів супроводжується одночасним зниженням вмісту загального гемоглобіну в гемолізаті еритроцитів щурів, що за умов споживання тваринами низькопротеїнової дієти може бути пов'язане з дефіцитом незамінних амінокислот, які беруть участь у синтезі поліпептидних ланцюгів глобіну.

Максимальне збільшення вмісту метгемоглобіну (в 5 разів порівняно з контролем) в гемолізаті еритроцитів щурів зареєстровано за умов введення токсичних доз ацетамінофену на тлі аліментарної депривації протеїну, що за даних експериментальних умов може бути пов'язане зі зниженням активності метгемоглобінредуктази, внаслідок чого метгемоглобін накопичується в еритроцитах у вигляді тілець Гейнца. Підвищення рівня карбоксигемоглобіну в гемолізаті еритроцитів щурів усіх дослідних груп щурів порівняно з контролем за умов введення токсину на тлі білкової недостатності, ймовірно, вказує на порушення синтезу та/або деградацію гемовмісних протеїнів.

Ключові слова: загальний гемоглобін, метгемоглобін, карбоксигемоглобін, еритроцити, токсичне ураження, аліментарна депривація протеїну

Вступ. У процесах біохімічної адаптації організму важлива роль належить гемоглобіну (Hb), який не лише забезпечує кисеньтранспортну функцію та бере участь в регуляції кислотно-основної рівноваги, а й проявляє квазіферментативні активності пероксидазного, каталазного та монооксигеназного характеру, забезпечуючи детоксикаційні можливості системи еритроциту (Коробов, 2002; Гусейнов и др., 2012). Вказані чинники визначають гомеостатичні механізми, формують адаптаційні зміни в організмі, які часто пов'язані з впливом сполук екзогенного походження та дисбалансом ендогенних метаболітів (Дудок та ін., 2017).

За сучасними уявленнями (Ерстенюк, 2012) екзогенні фактори будь-якої природи (токсини,

лікарські препарати, хімічні засоби, радіаційне випромінювання тощо) на тлі аліментарної нестачі нутрієнтів, порушуючи внутрішньоклітинний гомеостаз, викликають дестабілізацію стійкості фізіологічних реакцій організму. У випадку впливу на організм ксенобіотиків медикаментозного походження, наприклад, ацетамінофену, механізми токсичності, як правило, реалізуються внаслідок пригнічення активності ензимних систем (Korylchuk et al., 2017; Voloshchuk et al., 2016), порушення проникності клітинних мембран (Voloshchuk et al., 2017), активації процесів вільнорадикального окислення (Voloshchuk et al., 2018) та виснаження компонентів системи антиоксидантного значення (Копильчук та ін., 2014).

Серед специфічних проявів шкідливої дії хімічних речовин на організм значне місце належить ураженням системи крові. Сполуки екзогенного чи ендogenous походження досить 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 гемопротеїну, але й еритроциту (Люта та ін., 2013).

Розвиток патологічних станів різної етіології часто супроводжується еритроцитопенією, яка зазвичай пов'язана з функціональними порушеннями під час еритропоезу чи посиленням гемолізом еритроцитів. Руйнування еритроцитів характеризується також іншим важливим фізіологічним процесом – посиленою деградацією гемоглобіну до гему та глобін. Більше того, відбувається деградація вільного гему за участю гемоксигеназної системи, що призводить до утворення фізіологічно активного метаболіту – молекули CO (Єфіменко та ін., 2015).

В організмі молекула Hb, окрім приєднання кисню та CO₂, забезпечує зв'язування і депонування інших низькомолекулярних лігандів – CO, NO, H₂S, CN⁻, які виступають у ролі клітинних месенджерів із різними фізіологічними функціями (Gell, 2018). Внаслідок взаємодії гемоглобіну з переліченими сполуками утворюються відповідні лігандні форми: карбоксигемоглобін (HbCO), нітрозилгемоглобін (HbNO), нітрозогемоглобін (SNOHb), сульфгемоглобін (SHb), ціанометгемоглобін (CNMetHb), кожна з яких виконує в організмі специфічну функцію (Артюхов і др., 2016).

У нормі співвідношення окремих лігандних форм гемоглобіну підтримується на певному рівні. Однак, посилене утворення MetHb в еритроцитах може бути спричинене інтенсифікацією генерації супероксидного аніон-радикала (Ansari et al., 2017). Водночас ендogenous продукція CO сприяє утворенню карбоксигемоглобіну. Ендogenous CO – це фактично продукт руйнування гемоглобіну та міоглобіну, а також гемовмісних білків (Ерстенюк, 2012).

Враховуючи вищезазначене, метою роботи стало дослідження вмісту загального гемоглобіну та його лігандних форм (метгемоглобіну і карбоксигемоглобіну) за умов ацетамінофен-індукованого токсичного ураження на тлі аліментарної депривації протеїну.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 110-130 г та віком 2,5-3 місяці. Під час проведення експерименту тварин утримували в пластмасових клітках з вільним доступом до води та піщаною підстилкою. Маніпуляції з тваринами проводили згідно з «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», ухвалених Сьомим національним конгресом з біоетики (Київ, 2019) та урахуванням положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Протягом експерименту тварин утримували на напівсинтетичній дієті AIN-93, розробленій Американським інститутом нутрієнтології (Reeves et al., 1993). Нормування добового раціону проводили з урахуванням принципу парного харчування (Mashiko et al., 2007).

Моделювання гострого токсичного ураження проводили шляхом введення *per os* дослідним тваринам ацетамінофену з розрахунку 1250 мг/кг маси тварини у вигляді суспензії в 2 % розчині крохмального гелю 1 раз на день протягом 2 діб (Стефанов, 2001).

У ході проведення експерименту дослідні тварини були поділені на 4 групи:

1 – щурі, що споживали повноцінний напівсинтетичний раціон (К); 2 – тварини, які протягом 28 днів отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон (НПР); 3 – щурі, яким моделювали токсичне ураження ацетамінофеном (ТУ); 4 – тварини, яким на тлі аліментарної депривації протеїну моделювали токсичне ураження ацетамінофеном (НПР + ТУ).

Цервікальну дислокацію дослідних тварин проводили під легким ефірним наркозом на 29 та 31 доби експерименту.

Для отримання гемолізату до еритроцитарної маси додавали 5-кратний об'єм фізіологічного розчину та 4-5 крапель хлороформу, який забезпечує осадження гемоглобіну. Отриману суміш перемішували та центрифугували 20 хв при 3000 об/хв. Верхню фазу (гемолізат) відбирали і використовували для визначення вмісту гемоглобіну та його дериватів (Топтіков та ін., 2006).

З метою визначення кількості еритроцитів у пробірку з 4 мл 3 % розчину NaCl додавали 0,02 мл цільної крові та ретельно перемішували. Підрахунок кількості еритроцитів здійснювали у лічильній камері Горяєва. Кількість еритроцитів визначали за допомогою світлового мікроскопа (окуляр ×10 або ×15; об'єктив ×8) у 5 великих квадратах, розташованих по діагоналі сітки (Плотнікова та ін., 2002).

Вміст загального гемоглобіну досліджували ацетонціангідриновим методом з використанням набору реактивів «Реагент» (Дніпро, Україна). Принцип методу ґрунтується на взаємодії гемоглобіну з $K_3[Fe(CN)_6]$, внаслідок чого утворюється метгемоглобін. Останній з ацетонціангідрином утворює ціанметгемоглобін (геміглобінціанід). Вміст загального гемоглобіну виражали в г/л.

Концентрацію метгемоглобіну в гемолізаті еритроцитів оцінювали спектрофотометричним методом. Принцип методу полягає в тому, що метгемоглобін має максимальне поглинання при 630 нм, а оксигемоглобін – при 540 нм. В еритроцитах обидва пігменти співіснують, внаслідок чого їх можна виміряти через відповідні поглинання (Naoum et al., 2004).

Вміст карбоксигемоглобіну в гемолізаті еритроцитів вимірювали за методом (Білецька та ін., 2012), що базується на визначенні величини абсорбції карбоксигемоглобіну при довжинах хвиль 534 і 563 нм.

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою програми *Microsoft Excel*. Дослідні групи порівнювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Для цього обчислювали середнє арифметичне, стандартні відхилення та врахували кількість тварин в кожній групі. При цьому рівень значущості, або ймовірність помилки становить $P \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати досліджень показали, що за умов токсичного ураження на тлі аліментарної депривації протеїну в дослідних тварин спостерігається зменшення кількості еритроцитів вдвічі порівняно зі значеннями контрольної групи (рис. 1). Як видно з даного рисунку і білкова недостатність, і введення токсичних доз ацетамінофену виявляють однозначний вплив на досліджуваний показник.

Відомо, що кровотворна система – це динамічна система сукупності популяцій різноманітних клітин, які постійно оновлюються і здатні виконувати вузькоспеціалізовані функції та мають досить обмежений життєвий цикл. Будь-яке відхилення в системі від стану динамічної рівноваги може призвести до тяжких наслідків для всього організму (Oliveira et al., 2010). Вірогідно, у нашому випадку зменшення кількості еритроцитів за умов поєднаної дії двох провокуючих чинників пов'язане з порушенням синтезу даних клітин під час еритропоезу. Необхідно врахувати, що основним регулятором еритропоезу є еритропоетин. Він збільшує кількість еритропоетиночутливих активованих стовбурових клітин у кістковому мозку, які перетворюються у попередники еритроцитів, а згодом – у зрілі еритроцити. Як відомо, близько 85% еритропоетину виробляють нирки і 15% – печінка.

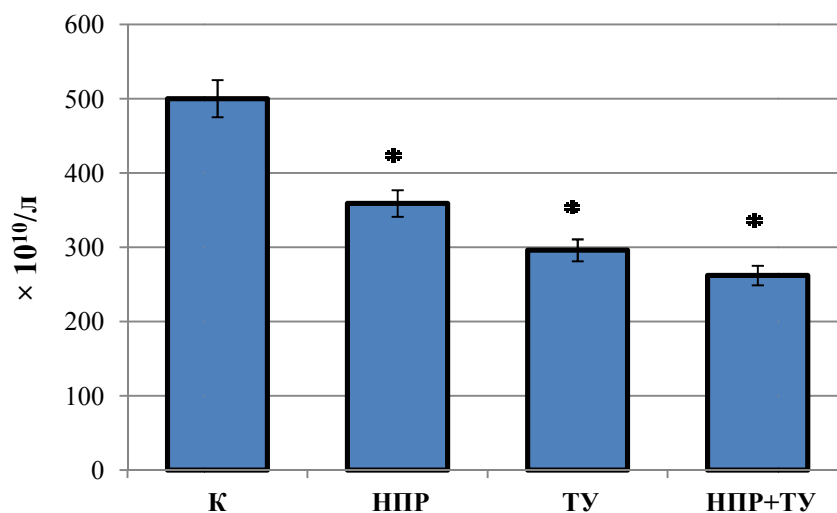


Рис. 1. Кількість еритроцитів у крові щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарної депривації протеїну

Fig. 1. The amount of red blood cells in the rats' blood under the conditions of toxic damage after of alimentary protein deprivation

Примітка: К – контроль; НПР – щурі, які перебували на низькопротеїновому раціоні; ТУ – щурі з модельованим токсичним ураженням; НПР+ТУ – щурі, яким на тлі аліментарної депривації протеїну моделювали токсичне ураження; * – статистично достовірна різниця порівняно з контролем, $P \leq 0,05$.

Note (hereinafter): C – animals that received a full semi-synthetic diet; LPD – animals that consumed a diet, where the protein content was 1/3 of the generally accepted norm; TD – animals that simulated acute toxic damage; LPD+TD – animals that were simulated toxic damage against the background of nutritional protein deficiency; * – statistically significant difference compared with the control, $P \leq 0.05$.

Враховуючи те, що в попередніх дослідженнях за умов введення токсичних доз ацетамінофену на тлі попереднього утримання тварин на низькопротеїновій дієті, відбуваються патологічні зміни у морфології нирок, підтверджені гістологічними зрізами (Копильчук и др., 2015), ймовірно, пригнічується утворення еритропоєтину клітинами нирок внаслідок поглиблення порушень детоксикаційної функції печінки з подальшим накопиченням метаболіту ацетамінофену – N-ацетил-p-бензохіноніміну, який утворюється за участю цитохрому P-450, що можна розглядати як один із факторів зменшення кількості еритроцитів.

При передозуванні ацетамінофену даний метаболіт здатний утворювати ковалентні зв'язки з макромолекулами клітинних білків, ініціюючи некроз тканин та дисфункцію органів. Такі зміни мають підтвердження в клінічних дослідженнях за умов перебігу хронічної ниркової недостатності, оскільки у 95–98 % хворих відбувається зниження вмісту еритропоєтину в крові. Навіть незначні коливання концентрації даного гормону в крові супроводжуються суттєвими змінами швидкості еритропоезу (Осиков и др., 2009).

Поряд із визначенням кількості еритроцитів у контролі стану еритроцитарної системи важливе значення має аналіз концентрації гемоглобіну.

Під час еритропоезу попередники еритроцитів в процесі дозрівання втрачають ядро та накопичують гемоглобін, який в подальшому

забезпечує виконання еритроцитами своїх функцій. Тому синтез гемоглобіну та еритроцитів є взаємозалежними процесами (Schechter, 2008).

Так, нами встановлено зниження вмісту загального гемоглобіну в гемолізаті еритроцитів усіх дослідних груп щурів порівняно з контролем (рис. 2). З даного рисунку видно, що істотніший вплив на зміни досліджуваного показника виявляє введення токсину незалежно від режимів споживання білка дослідними тваринами. Надходженням надмірної кількості даного препарату в організм супроводжується порушенням його ефективної детоксикації в печінці з утворенням високореакційного метаболіту – N-ацетилбензохіноніміну, що кон'югує з глутатионом. Коли запас глутатиону в печінці виснажується, що підтверджується попередніми роботами в розрізі даної наукової тематики (Копильчук та ін., 2014), N-ацетилбензохінонімін зв'язується з ліпідами мембран гепатоцитів, викликаючи некроз клітин. Що стосується еритроцитів, то внаслідок пошкодження мембран надмірна кількість даного метаболіту призводить до появи в їх цитоплазмі тілець Гейнца, які утворюються шляхом окислення та інактивації тіолових груп глобіну з подальшою денатурацією молекули гемоглобіну. При цьому ступінь окислення заліза гемоглобіну може змінюватися, що супроводжується утворенням метгемоглобіну (Cheah et al., 2013).

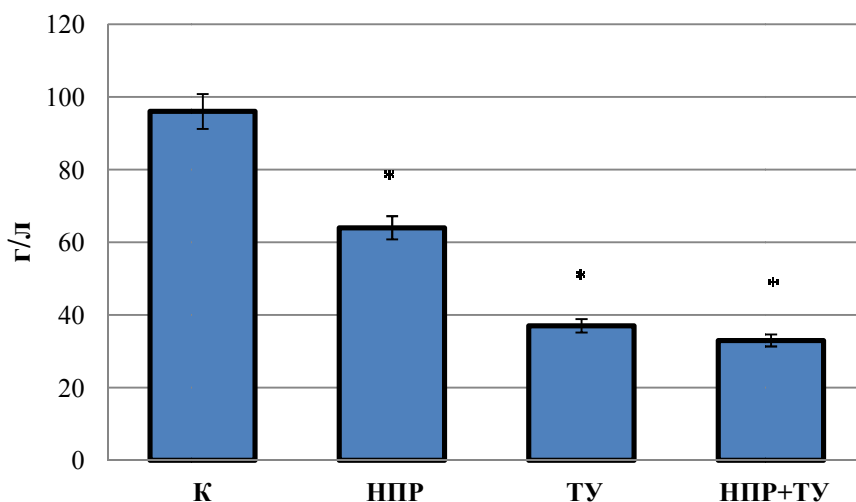


Рис. 2. Концентрація загального гемоглобіну в гемолізаті еритроцитів щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарної депривації протеїну

Fig. 2. The concentration of total hemoglobin in rats' blood under the conditions of toxic damage after of alimentary protein deprivation

Як показано попередніми дослідженнями (Копильчук та ін., 2014) зниження концентрації загального гемоглобіну в гемолізаті еритроцитів щурів за умов споживання тваринами низькопротеїнової дієти може бути пов'язане з дефіцитом незамінних амінокислот, які беруть участь у синтезі поліпептидних ланцюгів глобіну.

Зокрема, при нестачі гістидину порушується зв'язування глобіну з гемом. Окрім того, амінокислоти є джерелом С та N, які необхідні для утворення гему. Гліцин та сукциніл-КоА задіяні в біосинтезі порфіринів і є попередниками в утворенні пірольних кілець.

Гемоглобін – єдиний переносник кисню до тканин, що знаходиться всередині еритроцитів. Враховуючи те, що період життя еритроцитів становить 120 днів, після чого вони руйнуються під час проходження вузькими капілярами селезінки, кісткового мозку та печінки, то в крові завжди міститься незначна кількість вільного гемоглобіну (Артюхов и др., 2016). Гемоглобін, що утворився за умов фізіологічного (як результат нормального процесу відмирання еритроцитів) чи патологічного (передчасного) гемолізу, зв'язує білок плазми крові гаптоглобін. У нормі гаптоглобін-гемоглобіновий комплекс з циркулюючої крові захоплюється ретикулоендотеліальними клітинами печінки та утилізується ними, внаслідок чого гемоглобін розпадається на ферум та глобін, а гаптоглобін знову надходить у кров. Це фізіологічний процес, в ході якого печінка повертає організму амінокислоти глобіну та залізо гему.

Попередніми дослідженнями показано, що за умов як нестачі харчового протеїну, так і надходження в організм токсину спостерігається явище диспротеїнемії зі зміною співвідношень

протеїнових фракцій плазми крові (Копильчук та ін., 2015). Враховуючи те, що гаптоглобін складає 1/4 всіх $\alpha 2$ -глобулінів, зниження вмісту даного протеїну внаслідок руйнування гепатоцитів може супроводжуватися порушенням утворення гаптоглобін-гемоглобінового комплексу, який попереджує втрати організмом заліза, захищаючи нирки та печінку від гемосидерозу – надлишкового відкладання гемосидерину в тканинах організму. Так, попередньо встановлено (Волощук, 2016), що в білок-дефіцитних тварин за токсичним ураженням відбувається накопичення гемосидерину в дрібнодисперсній формі з розвитком гемосидерозу 3 ступеня.

Досить часто в ролі скринінгових маркерів розвитку захворювань проводять визначення патологічних форм гемоглобіну – метгемоглобіну та карбоксигемоглобіну як показників цитопатичної гіпоксії (Tani et al., 2017; McArdle et al., 2016).

Тканинна гіпоксія виникає внаслідок порушення здатності тканин використовувати доставлений кисень. Причинами цитопатичної гіпоксії є фактори, що знижують ефективність утилізації кисню клітинами тканин і/або сполучення процесів окислення та фосфорилування. Зниження ефективності засвоєння кисню клітинами найбільш часто є результатом пригнічення активності ферментів біологічного окислення та пошкодження мембран клітин.

Результати досліджень засвідчують максимальне збільшення вмісту метгемоглобіну (в 5 разів порівняно з контролем) в гемолізаті еритроцитів щурів за умов введення токсичних доз ацетамінофену на тлі аліментарної депривації протеїну (рис. 3).

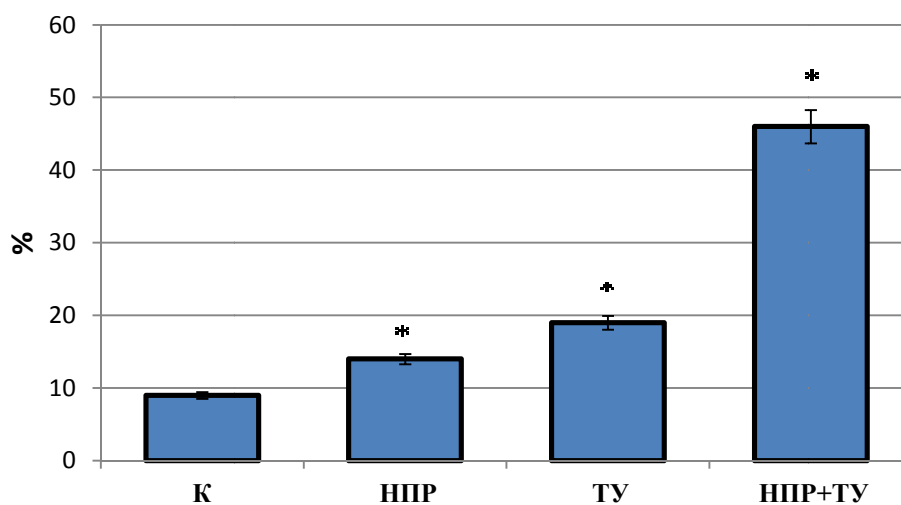


Рис. 3. Вміст метгемоглобіну в гемолізаті еритроцитів щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарної депривації протеїну

Fig. 3. The methemoglobin content in rats' blood under the conditions of toxic damage after of alimentary protein deprivation of alimentary protein deprivation

Метгемоглобін утворюється внаслідок окислення гемоглобіну з утворенням супероксид-аніону, який служить первинним месенджером вільнорадикальних процесів та не тільки здійснює пошкоджуючий вплив на клітинні мембрани, а й ініціює появу інших цитотоксичних форм кисню. Внаслідок цього в організмі розвивається так звана гемічна гіпоксія, що супроводжується порушенням транспорту кисню гемоглобіном (Nascimento et al., 2008).

Основну роль у відновленні метгемоглобіну відіграє NADH-залежна метгемоглобінредуктаза. Цей фермент здатний переносити електрони від NADH через цитохром b₅ на метгемоглобін, що забезпечує перехід заліза з тривалентного стану в двовалентний. Вірогідно, максимальне підвищення даного показника за умов одночасної дії двох негативних чинників, з одного боку, можна пояснити недостатнім надходженням амінокислот в організм, внаслідок чого відбувається порушення структури цитохрому b₅. Зокрема, в його будові виявлено гідрофільні та гідрофобні ділянки, які підтримують стабільність молекули. Ці ділянки сформовані залишками аланіну, ізолейцину, лейцину, фенілаланіну та гемом. Приєднання гемму до апопротеїну забезпечують два залишки молекул гістидину. В формуванні молекули цитохрому b₅ значну роль виконує залишок тирозину, який разом із залишками фенілаланіну та гістидину забезпечують утворення Ван дер Вальсових зв'язків між апопротеїном і гемом (Эрстенюк, 2012; Дудок та ін., 2017).

При утворенні метгемоглобіну одночасно може відбуватися окислення глобіну, який випадає в осад у вигляді тілець Гейнца; також можливий гемоліз із появою в крові характерних еритроцитів із напівкруглим дефектом зовнішнього краю. Внаслідок цього гем втрачає здатність зв'язуватися з киснем і транспортувати кисень до тканин, що призводить до розвитку ціанозу.

Отже, збільшення вмісту метгемоглобіну за даних експериментальних умов може бути пов'язане зі зниженням активності метгемоглобінредуктази, внаслідок чого метгемоглобін накопичується в еритроцитах у вигляді тілець Гейнца.

Щодо рівня карбоксигемоглобіну, то в гемолізаті еритроцитів щурів усіх дослідних груп спостерігається підвищення даного показника порівняно з контролем з найвищими значеннями за умов введення токсину на тлі білкової недостатності (рис. 4). Ймовірно, підвищення карбоксигемоглобіну вказує на порушення синтезу та/або деградацію гемовмісних протеїнів (цитохромів, міоглобіну тощо), внаслідок чого відбувається посилене руйнування гемму та утворюється ендogenous монооксид карбону, що є характерним явищем за умов обмеженого надходження протеїну з харчовим раціоном. З іншого боку, токсичне ураження супроводжується інтенсифікацією процесів пероксидного окислення ліпідів мембран, що також сприяє посиленій продукції ендogenous CO (McArdle, 2016).

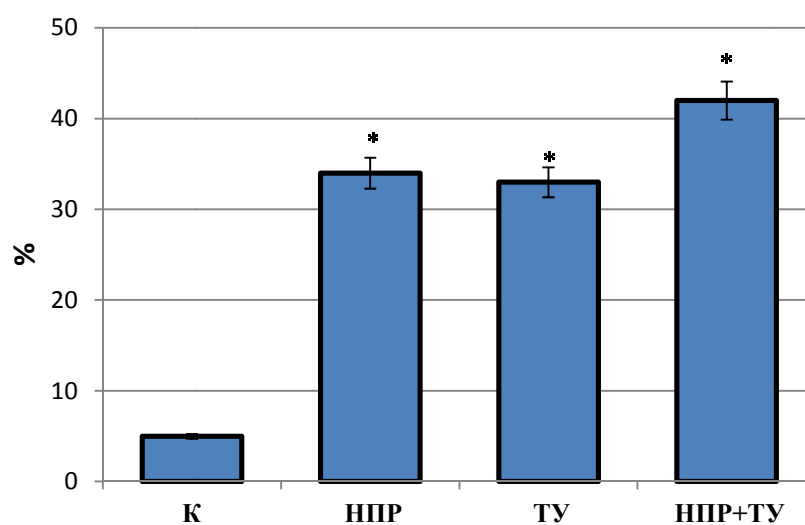


Рис. 4. Вміст карбоксигемоглобіну в гемолізаті еритроцитів щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарної депривації протеїну

Fig. 4. The carboxyhemoglobin content in rats' blood under the conditions of toxic damage after of alimentary protein deprivation of alimentary protein deprivation

Так, швидкість приєднання СО до гемоглобіну приблизно в 10 разів вища за швидкість приєднання кисню. Тому СО легко розчиняється в плазмі крові, проникає в еритроцити та вступає в необоротний зв'язок з гемоглобіном, внаслідок чого утворюється комплекс, який не здатний приєднувати і переносити кисень. За даних умов розвивається цитопатична гіпоксія. (McArdle et al., 2016).

Висновки. Отже, за умов токсичного ураження на тлі аліментарної депривації протеїну відбувається зменшення кількості еритроцитів та вмісту загального гемоглобіну з одночасним підвищенням концентрації його патологічних форм – метгемоглобіну та карбоксигемоглобіну, що можна розглядати як маркери цитопатичної гіпоксії.

Список літератури:

1. Артюхов В. Г., Калаева Е. А., Путинцева О. В., Полюбезьева А. И. Модификация структурно-функциональных свойств гемоглобина человека, индуцированная нитроглицерином, в условиях различного кислородного режима. *Биомедицинская химия*. 2016; 62(3): 251–258. DOI: 10.18097/PBMC20166203251.
2. Білецька Л. П., Бондарчук Т. І., Гринчишин Н. М., Кобилінська Л. І., Мазур О. Є., Макаренко Т. М., Панасюк Н. Б., Федевич Ю. М., Хаврона О. П. Методичні вказівки для практичних занять з клінічної біохімії. Львів: Львівський нац. мед. ун-т. 2012. 139 с.
3. Волощук О. Н., Копильчук Г. П. Оценка феррокинетических показателей при токсическом гепатите в условиях алиментарной депривации протеина. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2016; № 10 (134). – С. 54–57.
4. Гусейнов Т. М., Яхьяева Ф. Р., Гулиева Р. Т. Влияние селена на устойчивость гемоглобина к фотоокислительным процессам. *Укр. біохім. журн.* 2012; 84(2): 53–60.
5. Дудок К. П., Бурда В. А., Люта М. Я., Федорович А. М., Білий О. І., Єфіменко Н. В., Канюка О. П., Сибірна Н. О. Фізико-хімічні властивості лігандних форм гемоглобіну за експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету й за алкогольної інтоксикації. *Biol. Stud.* 2017; 11(2): 23–36. DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1102.527>.
6. Єфіменко Н. В., Дудок К. П., Сибірна Н. О. Вплив L-аргініну і L-NAME на функціональні та фізико-хімічні властивості гемоглобіну за експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації. *Biol. Stud.* 2015; 9(2): 85–98. DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.0902.430>.
7. Копильчук Г. П., Бучковська І. М. Стан глутатіонової системи клітин печінки щурів за низькопротеїнового раціону та гострого гепатотоксичного ураження. *Ukr. Biochem. J.* 2014; 86(5), Suppl. 1: 165–166.
8. Копильчук Г. П., Бучковська І. М., Ніколаєв Р. О. Вміст білкових фракцій плазми крові за умов білкової недостатності. *Біологічні системи*. 2015; 7(3): 16–20.
9. Копильчук Г. П., Бучковська І. М., Скрипник М. Г. Вміст різних форм гемоглобіну в еритроцитах щурів за умов білкової недостатності. *Біологічні системи*. 2014; 6(2): 153–158.
10. Копильчук Г. П., Волощук О. Н., Бучковская И. М., Давыденко И. С. Морфологическая характеристика почек крыс в условиях ацетаминофен-индуцированной нефротоксичности на фоне алиментарной депривации протеина. *Morphologia*. 2015; 9(3): 28–30.
11. Коробов В. Квазіферментативні активності гемоглобіну в динаміці адаптації до гіпоксії. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна*. 2002; 29: 39–43.
12. Люта М., Ференц І., Бурда В., Федорович А., Дудок К., Сибірна Н. Кисеньтранспортна функція гемоглобіну при введенні агматину за експериментального цукрового діабету. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна*. 2013; 62: 46–54.
13. Осиков М. В., Ахматов К. В., Кривохижина Л. В., Ахматов В. Ю. Анализ гематологических эффектов эритропоетина у больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на диализе. *Вестник ЮУрГУ*. 2009; 19(20): 79–82.
14. Плотнікова К. С., Панібратцева С. Г., Островська Ж. Г. Практикум з клінічних лабораторних досліджень. К.: Здоров'я. 2002. 240 с.
15. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Київ: Авіцена, 2001. 527 с.
16. Топтіков В. А., Дьяченко Л. Ф. Электрофоретичне дослідження білків і ферментів крові людини і тварин. Одеса: Одеський нац. ун-т. 2006. 123 с.
17. Эрстеник А. М. Лигандные формы гемоглобина в динамике кадмиевой интоксикации. *Микроэлементы в медицине*. 2012; 13(2): 8–13.
18. Ansari F. A., Ali S. N., Mahmood R. Taurine mitigates nitrite-induced methemoglobin formation and oxidative damage in human erythrocytes. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017; 24(23): 19086–19097. doi: 10.1007/s11356-017-9512-5.
19. Cheah C. Y., Lew T. E., Seymour J. F., Burbury K. Rasburicase Causing Severe Oxidative Hemolysis and Methemoglobinemia in a Patient with Previously Unrecognized Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Acta Haematologica*. 2013; 130 (4): 254–259. doi: 10.1159/000351048.
20. Gell D. A. Structure and function of haemoglobins. *Blood Cells Mol Dis.* 2018;70: 13–42. doi: 10.1016/j.bcmd.2017.10.006.
21. Kopylchuk H. P., Nykolaichuk I. M., Zhuretska O. M. Rat liver arginase system under acetaminophen-induced toxic injury and protein deprivation. *Ukr. Biochem. J.* 2017; 89(2): 92–98. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj89.02.092>.
22. Mashiko S., Ishihara A., Iwaasa H., Sano H., Ito J., Gomori A., Oda Z., Moriya R., Matsushita H., Jitsuoka M., Okamoto O., MacNeil D.J., Van der Ploeg L.H., Fukami T., Kanatani A. A pair-feeding study reveals that a Y5 antagonist causes weight loss in diet-induced obese mice by modulating food intake

- and energy expenditure. *Mol Pharmacol.* 2007; 71(2): 602-608. DOI: 10.1124 / mol.106.029991.
23. McArdle A. J., Webbe J., Sim K., Parrish G., Hoggart C., Wang Y., Kroll J. S., Godambe S., Cunnington A. J. Determinants of Carboxyhemoglobin Levels and Relationship with Sepsis in a Retrospective Cohort of Preterm Neonates. *PLOS ONE.* 2016. Vol. 11 (8). P. 1–3. doi: 10.1371/journal.pone.0161784.
 24. Naoum P. C., Radispiel J., Moraes M. S. Spectrometric measurement of methemoglobin without interference of chemical or enzymatic reagents. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2004; 26(1): 19–22.
 25. Nascimento T. S., Pereira R. O. L., Mello H. L. D., Costa J. Methemoglobinemia: from Diagnosis to Treatment. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 2008; 58(6): 651–664. DOI: 10.1590/s0034-70942008000600011.
 26. Oliveira S., Saldanha C. An overview about erythrocyte membrane. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2010; 44: 63–74. DOI: 10.3233/CH-2010-1253.
 27. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. Jr. 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. *J Nutr.* 1993; 123(11): 1939–1951. DOI: 10.1093 / Jn / 123.11.1939.
 28. Schechter A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood.* 2008; 112(10): 3927–3938. doi: 10.1182/blood-2008-04-078188.
 29. Tani A., Yamazaki J., Nakamura K., Takiguchi M., Inaba M. Case Report: Congenital methemoglobinemia in a cat with the reduced NADH-cytochrome b₅ reductase 3 activity and missense mutations in CYB5R3. *Japanese Journal of Veterinary Research.* 2017; 65(4): 201–206. DOI: 10.14943/jjvr.65.4.201
 30. Voloshchuk O. M., Kopylchuk G. P., Y.I. Mishyna Y. I. Activity of the mitochondrial isoenzymes of endogenous aldehydes catabolism under the conditions of acetaminophen-induced hepatitis. *Ukr. Biochem. J.* 2018; 90(1): P. 42–47.
 31. Voloshchuk O. N., Kopylchuk G. P. Activity of liver mitochondrial Krebs cycle NAD⁺-dependent dehydrogenases in rats with hepatitis induced by acetaminophen under conditions of alimentary protein deficiency. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* 2016; 10(3): 283–286. DOI: 10.1134/S1990750816030173.
 32. Voloshchuk O. N., Kopylchuk G. P. Cellular Immunity State of Protein-deficient Rats with the Toxic Liver Injury. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry.* 2017; 13(2): 19–25.
- References:**
1. Artyukhov V. G., Kalaeva E. A., Putintseva O. V., Polyubez'eva A. I. The modification of structural and functional properties of human hemoglobin induced by nitroglycerin under different oxygen regime conditions. *Biomed Khim.* 2016; 62(3): 251–258. doi: 10.18097/PBMC20166203251. (in Russian).
 2. Biletska L. P., Bondarchuk T. I., Hrynchysyn N. M., Kobylinska L. I., Mazur O. Ye., Makarenko T. M., Panasiuk N. B., Fedevych Yu. M., Khavrona O. P. Metodychni vkazivky dlia praktychnykh zaniat z klinichnoi biokhimii. Lviv: Lvivskyi nats. med. un-t. 2012. 139 s. (in Ukrainian).
 3. Voloshchuk O. N., Kopylchuk G. P. An assessment of the ferrokinetic indices in rats with toxic hepatitis under the conditions of alimentary deprivation of protein. *Eksp Klin Gastroenterol.* 2016; (10): 54–57.
 4. Huseynov T. M., Yahyayeva F. R., Guliyeva R. T. The effect of selenium hemoglobin an resistant for photooxidative processes. *Ukr. Biochem. J.* 2012; 84(2): 53–60. (in Russian).
 5. Dudok K. P., Burda V. A., Liuta M. Ya., Fedorovych A. M., Bilyi O. I., Yefimenko N. V., Kaniuka O. P., Sybirna N. O. Physicochemical properties of hemoglobin ligand forms under experimental streptozotocin-induced diabetes and alcohol intoxication. *Biol. Stud.* 2017; 11(2): 23–36. DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1102.527>. (in Ukrainian).
 6. 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).
 7. Kopylchuk H. P., Buchkovska I. M. The state of the glutathione system of liver cells of rats for low-protein diet and acute hepatotoxic injury. *Ukr. Biochem. J.* 2014; 86(5 Suppl 1): 165-166. (in Ukrainian).
 8. Kopylchuk H. P., Buchkovska I. M., Nikolaev R. O. Content of protein fractions of blood plasma in animals under the conditions of protein deficiency. *Biological systems.* 2015; 7(3): 16–20.
 9. Kopylchuk G. P., Buchkovska I. M., Skrypnyk M. G. The level of different forms of hemoglobin in the hemolysate of the erythrocytes of rats blood on condition of the lack of protein. *Biological systems.* 2014; 6(2): 153–158.
 10. Kopylchuk G. P., Voloshchuk O. N., Buchkovskaia I. M., Davydenko I. S. Morphologic characteristic of the rat kidney after acetaminophen-induced nephrotoxicity on the background of alimentary deprivation of protein. *Morphologia.* 2015; 9(3): 28–30. (in Russian).
 11. Korobov V. Quasienzymic activity of hemoglobins in dynamic adaptation to hypoxia. *Visnyk of Lviv Univ. Biology Series.* 2002; 29: 39–43. (in Ukrainian).
 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. Osikov M. V., Ahmatov K. V., Krivohizhina L. V., Ahmatov V. Yu. Analiz gematologicheskikh effektov eritropoetina u bolnykh hronicheskoy pochechnoy nedostatochnostyu, nahodyaschihsya na dialize. *Vestnik YuUrGU.* 2009; 19(20): 79–82. (in Russian).
 14. Plotnikova K. S., Panibrattseva S. H., Ostrovska Zh. H. Praktikum z klinichnykh laboratornykh doslidzhen. K.: Zdorovia. 2002. 240 s. (in Ukrainian).
 15. Stefanov O. V. Preclinical studies of drugs. Kyiv: Avicenna, 2001. 527 s. (in Ukrainian).

16. Toptikov V. A., Diachenko L. F. Elektroforetychne doslidzhennia bilkiv i fermentiv krovi liudyny i tvaryn. Odesa: Odeskyi nats. un-t. 2006. 123 s. (in Ukrainian).
17. Erstenyuk A.M. Ligand forms of hemoglobin in the dynamics of cadmium intoxication. *Mikroelementy v meditsine*. 2012; 13(2): 8–13. (in Russian).
18. Ansari F. A., Ali S. N., Mahmood R. Taurine mitigates nitrite-induced methemoglobin formation and oxidative damage in human erythrocytes. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017; 24(23): 19086–19097. doi: 10.1007/s11356-017-9512-5.
19. Cheah C. Y., Lew T. E., Seymour J. F., Burbury K. Rasburicase Causing Severe Oxidative Hemolysis and Methemoglobinemia in a Patient with Previously Unrecognized Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Acta Haematologica*. 2013; 130 (4): 254–259. doi: 10.1159/000351048.
20. Gell D. A. Structure and function of haemoglobins. *Blood Cells Mol Dis*. 2018;70: 13–42. doi: 10.1016/j.bcmd.2017.10.006.
21. Kopylchuk H. P., Nykolaichuk I. M., Zhuretska O. M. Rat liver arginase system under acetaminophen-induced toxic injury and protein deprivation. *Ukr. Biochem. J.* 2017; 89(2): 92–98. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj89.02.092>.
22. Mashiko S., Ishihara A., Iwaasa H., Sano H., Ito J., Gomori A., Oda Z., Moriya R., Matsushita H., Jitsuoka M., Okamoto O., MacNeil D.J., Van der Ploeg L.H., Fukami T., Kanatani A. A pair-feeding study reveals that a Y5 antagonist causes weight loss in diet-induced obese mice by modulating food intake and energy expenditure. *Mol Pharmacol*. 2007; 71(2): 602–608. DOI: 10.1124/mol.106.029991.
23. McArdle A. J., Webbe J., Sim K., Parrish G., Hoggart C., Wang Y., Kroll J. S., Godambe S., Cunnington A. J. Determinants of Carboxyhemoglobin Levels and Relationship with Sepsis in a Retrospective Cohort of Preterm Neonates. *PLOS ONE*. 2016. Vol. 11 (8). P. 1–3. doi: 10.1371/journal.pone.0161784.
24. Naoum P. C., Radispiel J., Moraes M. S. Spectrometric measurement of methemoglobin without interference of chemical or enzymatic reagents. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2004; 26(1): 19–22.
25. Nascimento T. S., Pereira R. O. L., Mello H. L. D., Costa J. Methemoglobinemia: from Diagnosis to Treatment. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 2008; 58(6): 651–664. DOI: 10.1590/s0034-70942008000600011.
26. Oliveira S., Saldanha C. An overview about erythrocyte membrane. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2010. Vol. 44 (1). P. 63–74. DOI: 10.3233/CH-2010-1253.
27. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. Jr. 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. *J Nutr.* 1993; 123(11): 1939–1951. DOI: 10.1093/Jn/123.11.1939.
28. Schechter A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*. 2008; 112(10): 3927–3938. doi: 10.1182/blood-2008-04-078188.
29. Tani A., Yamazaki J., Nakamura K., Takiguchi M., Inaba M. Case Report: Congenital methemoglobinemia in a cat with the reduced NADH-cytochrome b₅ reductase 3 activity and missense mutations in CYB5R3. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 2017; 65(4): 201–206. DOI: 10.14943/jjvr.65.4.201
30. Voloshchuk O. M., Kopylchuk G. P., Y.I. Mishyna Y. I. Activity of the mitochondrial isoenzymes of endogenous aldehydes catabolism under the conditions of acetaminophen-induced hepatitis. *Ukr. Biochem. J.* 2018; 90(1): P. 42–47.
31. Voloshchuk O. N., Kopylchuk G. P. Activity of liver mitochondrial Krebs cycle NAD⁺-dependent dehydrogenases in rats with hepatitis induced by acetaminophen under conditions of alimentary protein deficiency. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2016; 10(3): 283–286. DOI: 10.1134/S1990750816030173.
32. Voloshchuk O. N., Kopylchuk G. P. Cellular Immunity State of Protein-deficient Rats with the Toxic Liver Injury. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2017; 13(2): 19–25. (in Russian).

THE CONTENT OF METHEMOGLOBIN AND CARBOXYGEMOGLOBIN IN RATS RED BLOOD CELL UNDER THE TOXIC DAMAGE AFTER ALIMENTARY PROTEIN DEPRIVATION

H. P. Kopylchuk, I. M. Nykolaichuk, Ya. S. Kliuchnyk

The study of the content of total hemoglobin and its pathological derivatives methemoglobin and carboxyhemoglobin in rats' red blood cell under the toxic damage and alimentary protein deprivation are presented. In order to simulate the low-protein diet of animals for 28 days were kept, an isoenergy diet containing 4.7% protein, 10% fats and 85.3% carbohydrates, which was calculated according to the American Institute of Nutrition recommendations. The simulation of acute toxic damage was performed by per os acetaminophen-administration to experimental animals at doses of 1250 mg/kg of animal body weight. The total hemoglobin content was investigated by the acetonecyanhydrin method based on the interaction of hemoglobin with K3 [Fe (CN) 6], which leads to methemoglobin formation. This compound with acetone cyanhydrin forms cyanmethemoglobin (hemoglobin cyanide). The methemoglobin concentration in erythrocytes' hemolysate was evaluated by spectrophotometric method by determining the maximum absorption at $\lambda = 630$ nm. The carboxyhemoglobin content in erythrocytes was measured by a method based on the determination of absorption value at $\lambda = 534$ and 563 nm.

It was found that in experimental animals the 2-fold decrease in erythrocytes counts compared with the values of the control group was observed under the toxic damage after alimentary protein deprivation. In this case, both protein deficiency and the administration of acetaminophen toxic doses have a clear effect on the studied indicator. At the same time, a decrease of erythrocyte counts is accompanied by a simultaneous decrease of total hemoglobin content in rat erythrocyte hemolysate. In animals consuming a low protein diet, this may be due to a deficiency of essential amino acids involved in the synthesis of globin's polypeptide chains.

The maximal increase of methemoglobin content (5-fold compared with control) in rats' erythrocyte hemolysate was recorded under the administration of acetaminophen toxic doses after alimentary protein deprivation. In these experimental conditions this may be associated with a decrease of methemoglobin reductase activity, which causes methemoglobin accumulates in erythrocytes in the form of Heinz bodies.

An increase of the carboxyhemoglobin level in rats' erythrocyte hemolysate of all the experimental groups compared with the control under the conditions of toxin administration after protein deficiency, probably indicates impaired synthesis and/or degradation of heme-containing proteins.

Keywords: hemoglobin, methemoglobin, carboxyhemoglobin, erythrocytes, toxic injury, alimentary deprivation of protein

Отримано редколегією 28.10.2019