



УДК 616.155.16:577.112.385

ВПЛИВ L-АРГІНІНУ І L-NAME НА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ГЕМОГЛОБІНУ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Н. В. Єфіменко, К. П. Дудок, Н. О. Сибірна

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: nataliya_yefimenko@mail.ru*

За експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації (ЕХАІ) у щурів виявлено перерозподіл лігандних форм гемоглобіну в периферичній крові, зокрема: зниження вмісту оксигемоглобіну, зростання вмісту метгемоглобіну на фоні зниження концентрації тотального гемоглобіну. Встановлено, що за умов ЕХАІ підвищується концентрація лужнотійкого гемоглобіну, а також знижується спорідненість гемоглобіну крові щурів до кисню. Споживання тваринами з ЕХАІ *per os* субстрату NOS – L-аргініну призводить до достовірного зниження вмісту метгемоглобіну у крові щурів. Споживання щурами неспецифічного інгібітора NOS – L-NAME призводить до підвищення спорідненості гемоглобіну периферичної крові до кисню як за ЕХАІ, так і у контролі. Натомість споживання щурами контрольної групи L-аргініну призводить до зниження спорідненості гемоглобіну до кисню подібно як за ЕХАІ. Охарактеризовано спектри поглинання RНb і HbFe²⁺NO крові щурів у межах смуги Соре та в ультрафіолетовій ділянці. Встановлено, що швидкість нітрування гемоглобіну *in vitro* за споживання L-аргініну зростає порівняно з ЕХАІ. У групах тварин, які споживали L-NAME, спостерігається сповільнення нітрування гемоглобіну як у контролі, так і за умов ЕХАІ.

Ключові слова: експериментальна хронічна алкогольна інтоксикація (ЕХАІ), гемоглобін, лігандні форми гемоглобіну, спорідненість гемоглобіну до кисню, неселективний інгібітор NOS – L-NAME, L-аргінін.

ВСТУП

Алкоголь є одним із ксенобіотиків, який, потрапляючи в організм, діє як потужний фактор, що викликає широкий спектр метаболічних порушень. Відомо, що алкогольна інтоксикація насамперед супроводжується гіпоксичною гіпоксією, яка не тільки зумовлена порушенням функції дихання, але й, очевидно, пов'язана зі зміною структурно-функціональних особливостей кисеньтранспорного білка – гемоглобіну [4, 16, 17, 26, 32]. За алкогольної інтоксикації втрачається рівновага реакцій прооксидантно-антиоксидантної системи, активуються процеси вільнорадикального

окиснення, змінюється структура еритроцитарних мембран, спостерігаються зміни спорідненості гемоглобіну до кисню та співвідношення його лігандних форм, відбуваються зміни в обміні вітамінів, коферментів тощо [3, 7, 13, 17, 23, 26, 32].

У розвитку модифікацій біологічних макроструктур особлива роль належить метаболіту алкоголю – ацетальдегіду (АцА), який, завдяки наявності карбонільної групи, має високу реакційну активність і вступає у неферментативні ковалентні взаємодії з аміно- й сульфгідрильними групами білків тощо [10, 22, 26, 32].

Оскільки метаболічні порушення за алкогольної інтоксикації досить істотні, то актуальними для сучасної біології та медицини слугують комплексні дослідження біохімічних механізмів, які є основою цієї патології.

В останні роки публікується дедалі більше робіт, які стосуються ролі оксиду азоту (нітрогену монооксиду – NO) як поліфункціонального регулятора структурно-метаболічних процесів в організмі [6, 12–20, 25, 27]. NO – медіатор, який бере участь у багатьох фізіологічних і патофізіологічних процесах. Це унікальний за природою і механізмом дії вторинний месенджер, який уже в наномолярних концентраціях виявляє високі біологічні ефекти [21, 29, 30].

У нормі в організмі людини NO утворюється з амінокислоти аргініну в результаті реакції, що каталізується ізоформами ферменту NO-синтази (NOS) [9, 18, 19, 29]. Утім, у патологічних процесах, які супроводжуються гіпоксією чи ішемією, активність NO-синтазного шляху може знижуватися. Натомість підвищується активність нітритредуктазних систем, які забезпечують утворення NO у реакціях відновлення стабільних метаболітів оксиду азоту – таких як NO_2^- та NO_3^- . Таким чином, коротко цикл оксиду азоту можна зобразити як: $\text{L-Arg} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{NO}_2^-/\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}$ [9, 24].

Алкогольна інтоксикація супроводжується гіпоксією, яка в основному пов'язана з фізико-хімічним станом і функцією гемоглобіну (Hb). У процесі зв'язування й віддачі кисню за різної моделі алкогольної інтоксикації особлива роль належить дезоксигемоглобіну (RHb). Гемоглобін у дезоксиформі може взаємодіяти з такими лігандами як O_2 , CO, NO, H_2S з утворенням окси-, карбокси-, нітрито- та сульфгемоглобіну, відповідно [10, 20, 25, 29, 31]. Різні ліганди характеризуються неоднаковою спорідненістю до гемоглобіну. Утворені лігандні форми гемоглобіну можуть переходити одна в одну. Ці процеси пов'язані з особливістю електронної структури Fe^{2+} у гемі Hb і його здатністю утворювати комплексні сполуки при взаємодії з лігандами, переходити з високоспінового у низькоспіновий стан, не змінюючи при цьому своєї валентності. Утім, спіновий стан атома феруму в комплексах визначається типом ліганду. Отже, заміна одного ліганду іншим у молекулі гемоглобіну не лише призводить до перебудови взаємодій гем–ліганд, але й впливає на зміну конформації гемопротейну загалом і, як наслідок, його функції [3, 31]. Крім того, завдяки специфічній електронній будові гему Hb лігандні форми цього гемопротейну беруть участь у реакціях окиснення – відновлення. З літератури відомо, що у реакціях відновлення нітрит/нітрат-аніонів до оксиду азоту бере участь RHb [3, 6, 12, 17]. Взаємодія іона NO_2^- з RHb призводить до окиснення Fe^{2+} гему Hb з утворенням метгемоглобіну (MetHb). У ході цієї реакції іони NO_2^- відновлюються до NO.

NO вступає у взаємодію з Fe^{2+} гему RHb, унаслідок чого утворюється нітрозилгемоглобін (NOHb). Відмінності спектрів поглинання RHb і NOHb дають змогу аналізувати хід цих реакцій. Спектри поглинання RHb характеризуються інтенсивною смугою у видимій ділянці при 555–560 нм, тоді як для NOHb спостерігаються у цій же ділянці дві смуги з максимумами при 545 і 572 нм [6].

Виходячи з даних літератури про те, що спорідненість NO до Hb у 1000 разів вища, ніж до O₂ [9], а також зважаючи на те, що константа рівноваги реакції комплексоутворення NO з гемами Hb має величину 3×10¹⁰ моль⁻¹×л, можна вважати, що гемоглобін виконує роль “пастки” для NO. Варто зазначити, що NO може взаємодіяти не лише з Fe²⁺ гему гемоглобіну, утворюючи HbFe²⁺NO, але й з SH-групами залишків β-93 цистеїну глобіну, внаслідок чого утворюється S-нітрозогемоглобін (SNO-Hb) з характерним спектром поглинання широкою смугою при 320–360 нм. Однак комплекс NO з Fe²⁺ гему є більш стійким, ніж у сполучі з білком [6, 29].

Вважають, що є O₂-залежна рівновага між SNO-Hb і HbFe²⁺NO. SNO-Hb може виконувати роль критичного фактора постачання O₂, оскільки діє як “алостерично контрольований оксидом азоту буфер”, який обмінює свою NO-групу з тіолами середовища, у тому числі з глутатіоном, впливаючи таким чином на кровоплин як вазодилататор [20, 29].

З огляду на те, що вплив NO в організмі опосередковується взаємодією з іонами феруму гему, SH-групами білків, низькомолекулярними лігандами, можна вважати, що система L-аргінін/NO бере участь у комплексному формуванні киснево-транспортної функції крові, впливаючи на основні властивості клітин еритроcyту як у нормі, так і за умов різного типу патологій [29].

Підвищення потужності NO-продукуючих систем сприяє формуванню адаптації різних систем організму до патологічних змін, викликаних ендо- чи екзогенними чинниками. Однак відомо, що у разі надлишкової продукції NO ця молекула втрачає захисні властивості, а це супроводжується вазодепресивною та цитотоксичною дією. Тому організм, що перебуває на стадії адаптації до дії стресового чинника, за якого продукція азот монооксиду прогресивно наростає, “знешкоджує” NO зв’язуванням у депо. Ефективність депонування NO збільшується у разі тривалої підтримки високого рівня NO у плазмі крові та, навпаки, зменшується за умов NO-дефіцитних станів [29].

Підсумовуючи сказане, актуальними є дослідження фізико-хімічних і функціональних властивостей гемоглобіну на моделі експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації (EXAI) та можливих способів корекції порушень, викликаних цією патологією, введенням основного субстрату NOS – L-аргініну або неселективного інгібітора NOS – L-NAME.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на безпородних білих щурах із початковою масою 200–250 г, попередньо відібраних за допомогою “двопляшкового методу” для виявлення їхньої схильності до етанолу [5]. Надалі для досліджень використовували тварин, які надавали перевагу розчинів етанолу. 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 використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, Франція, 1986). Усі тварини отримували стандартний раціон віварію та вільний доступ до води.

Тварини були поділені на шість груп: перша – контроль (К), друга – контрольні тварини, які споживали L-аргінін (К + L-аргінін), третя – контрольні тварини, які споживали L-NAME (К + L-NAME), четверта – тварини з експериментальною хронічною

алкогольною інтоксикацією (EXAI), п'ята – тварини з EXAI, які споживали L-аргінін (EXAI + L-аргінін), шоста – тварини з EXAI, які споживали L-NAME (EXAI + L-NAME).

Модель EXAI у щурів створювали щоденним введенням протягом 14 днів 20% розчину етанолу *per os* із розрахунку 6 г на 1 кг маси тіла за допомогою зонда. Контрольним щурам (К) вводили еквівалентний за калорійністю розчин глюкози у дозі 10,2 г/кг, для збереження енергетичної цінності раціону.

Групи контрольних і алкоголізованих щурів з моменту індукції алкогольної інтоксикації з питною водою споживали розчин основного субстрату NOS – L-аргініну ("Reanal", Угорщина) з концентрацією 1,25 г/л, у розрахунку 125 мг/кг маси тіла тварини; інші тварини споживали розчин неселективного інгібітора NOS – L-NAME ("Sigma", США) з концентрацією 70 мг/л, у розрахунку 7 мг/кг маси тварини. Використовували розчини тварини отримували щоденно упродовж 14 днів. Кров для аналізів відбирали на наступний день після припинення навантаження розчином етанолу після декапітації під ефірним наркозом.

Загальну концентрацію гемоглобіну периферичної крові щурів визначали за допомогою реактиву Драбкіна [8, 28]. Визначення п'яти лігандних форм гемоглобіну: дезокси-, окси-, карбокси-, сульф- і метформи (RHb, HbO₂, COHb, SHb, MetHb) у гемолізатах цільної крові проводили методом абсорбційної спектроскопії [2, 31]. Вміст лужностабільного гемоглобіну (HbF) у гемолізатах цільної крові визначали за модифікованим методом Зінгера [28].

Спорідненість гемоглобіну до кисню вивчали спектрофотометричним методом у модифікації Іванова за допомогою побудови кривих оксигенації [11]. Гемоліз еритроцитів проводили 3,3 мМ К, Na-фосфатним буфером рН 7,36. Використовували гемолізати, очищені від низькомолекулярних сполук (2,3-дифосфогліцерату тощо) методом гель-фільтрації на колонках із сефадексом G-25. Для спектроскопічних досліджень гемоглобін виділяли за методикою Драбкіна [8].

Для аналізів, які стосувалися нітрузування гемоглобіну, виділений оксигемоглобін у спектрофотометричній кюветі переводили у дезоксиформу, додаючи натрій гідросульфід (Na₂S₂O₄) з розрахунку 0,83 мг на 1 мл HbO₂. Ступінь повної деоксигенації HbO₂ контролювали спектрофотометрично за співвідношенням поглинання при $\lambda = 554,3 / 541$ нм. У спектрофотометричну кювету до 3 мл розчину дезоксигемоглобіну додавали 0,15 мл 6 мМ NaNO₂. Утворення нітрозогемоглобіну фіксували на двохвильовому спектрофотометрі UV-VIS "Specord M-40" (Germany) у діапазоні довжин хвиль 210–450 нм [20].

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми аналізу Microsoft Excel і методу оцінки достовірності за *t*-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

У наших попередніх дослідженнях, проведених на моделі EXAI, виявлено зниження концентрації тотального гемоглобіну на 21 % щодо контролю. Споживання тваринами L-NAME без індукції EXAI призводило до зниження вмісту цього дицального гемопротейну на 14,3 %, а у крові алкоголізованих щурів – на 10 %. Водночас вміст тотального гемоглобіну за споживання L-аргініну контрольними тваринами у крові залишався в межах значень, характерних для контролю, а за впливу EXAI зростав на 80 %.

Для характеристики здатності постачання гемоглобіном кисню органам і тканинам за умов патології аналіз вмісту тотального Hb є недостатнім. У цьому плані

важливим є співвідношення його лігандних форм. Проведено визначення часток лігандних форм гемоглобіну в гемолізатах еритроцитів периферичної крові щурів (табл. 1). Встановлено, що за умов EXAI знижується частка HbO₂ порівняно з контрольними варіантами на 5 %. Споживання контрольними тваринами L-аргініну чи L-NAME не супроводжувалося достовірними змінами співвідношення лігандних форм гемоглобіну. Однак виявлено, що споживання L-аргініну щурами з EXAI викликає підвищення частки HbO₂ до контрольних значень. Споживання розчину L-NAME щурами з EXAI не супроводжувалося суттєвими змінами у перерозподілі лігандних форм гемоглобіну. Проте за умов EXAI та у варіантах зі споживанням L-аргініну чи L-NAME контрольними й алкоголізованими щурами частка SHb у крові знижується у 2,1–2,5 разу (табл. 1). Частка MetHb у крові тварин як за умов EXAI, так і у варіантах EXAI + L-NAME зростала щодо контролю в 3,5 разу та у 2 рази відповідно.

Споживання L-аргініну мало різноспрямовану дію: при споживанні L-аргініну контрольними щурами спостерігали підвищення частки MetHb щодо контролю на 47 %, а під час споживання L-аргініну тваринами з EXAI відбувалося зниження його кількості до значень контролю (табл.1).

Таблиця 1. Співвідношення лігандних форм гемоглобіну у крові щурів у контролі, за умов EXAI та за споживання L-аргініну і L-NAME (% , n= 4–7)

Table 1. Ratio of hemoglobin ligand forms in blood of rats in control group and under EXAI treated with L-arginine and L-NAME (% , n= 4–7)

Групи тварин	Лігандні форми				
	RHb	HbO ₂	COHb	SHb	MetHb
Контроль	0,1	90,00±1,73	4,56±0,51	2,59±0,93	2,77±0,93
Контроль + L-аргінін	0,1	89,70±1,33	5,13±2,04	1,00±0,16*	4,08±0,36*
Контроль + L-NAME	0,1	91,70±3,06	4,08±0,40	1,06±0,10*	3,11±0,42
EXAI	0,1	85,20±2,27*	3,82±0,86	1,04±0,04*	9,78±3,40*
EXAI + L-аргінін	0,1	92,60±2,51**	4,04±1,10	1,05±0,18	2,13±0,24**
EXAI + L-NAME	0,1	88,70±0,75**	3,85±0,93	1,22±0,11**	5,90±0,17**

Примітка (тут і в табл 2,3): * – різниця вірогідна, порівняно з показниками в контролі, P<0,05; ** – різниця вірогідна, порівняно з показниками у групі з EXAI, P<0,05.

Comment (in Table 2, 3): * – difference comparing to control group is significant, P <0.05; ** – significant changes relative to group with EXAI, P <0.05.

Важлива роль у процесах зв'язування та віддачі кисню органам і тканинам належить пулу лужностійкого гемоглобіну (HbF). Відомо, що цей гемоглобін має підвищену спорідненість до кисню [28].

Результатами досліджень вмісту HbF встановлено, що за умов EXAI частка його у гемолізатах крові щурів збільшується в 1,4 разу (рис. 1). У варіантах K + L-аргінін чи K + L-NAME не було виявлено достовірної різниці щодо вмісту HbF порівняно з контролем. У разі споживання алкоголізованими щурами L-NAME теж не спостерігали достовірних змін вмісту HbF щодо тварин з EXAI. У групі тварин з EXAI споживання L-аргініну викликало зниження вмісту HbF в 1,3 разу щодо показників у крові алкоголізованих тварин (рис. 1).

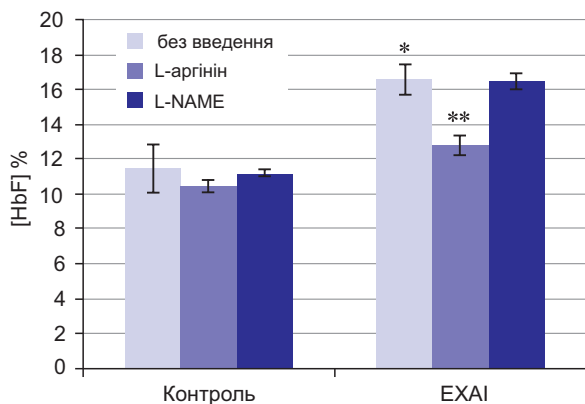


Рис. 1. Вплив L-аргініну та L-NAME на вміст лужнотійкого гемоглобіну в еритроцитах крові щурів у контролі та за умов EXAI ($M \pm m$, $n = 6$)

Fig. 1. Effect of L-arginine and L-NAME on content of alkaline-resistant hemoglobin in rat blood erythrocytes in control group and under EXAI ($M \pm m$, $n = 6$)

Відомо, що спорідненість гемоглобіну до кисню узалежнена від сполуки 2,3-дифосфогліцерату (2,3-ДФГ) [7]. Тому визначення спорідненості гемоглобіну до кисню у гемолізатах еритроцитів щурів ми проводили у попередньо очищених зразках від 2,3-ДФГ (рис. 2, табл. 2).

Таблиця 2. Вплив L-аргініну та L-NAME на спорідненість гемоглобіну до кисню за умов EXAI у різних досліджуваних групах щурів ($M \pm m$, $n=6$)

Table 2. Effect of L-arginine and L-NAME on the affinity of hemoglobin for oxygen under EXAI in different rat research groups ($M \pm m$, $n = 6$)

Варіанти досліду	P_{50} , мм рт. ст.
Контроль	30,00±0,63
Контроль + L-аргінін	33,75±1,64*
Контроль + L-NAME	26,92±1,16*
EXAI	34,00±1,05*
EXAI + L-аргінін	29,92±0,80**
EXAI + L-NAME	20,42±0,80**

Результати, представлені на рис. 2, вказують на те, що за умов EXAI спостерігається зниження спорідненості гемоглобіну до кисню порівняно з контролем, про що свідчить параметр P_{50} (парціальний тиск кисню, за якого гемоглобін насичений на 50 %) (табл. 2, рис. 2, А). Одержані нами результати можна пояснити тим, що за алкогольної інтоксикації утворюються відповідні АцА-аддукти гемоглобіну [4]. Такі комплекси є стабільними і характеризуються зниженою спорідненістю до кисню. Отже, афінність гемоглобіну до кисню за умов EXAI настільки змінюється, що навіть зростання вмісту HbF і MetHb не впливає на підвищення спорідненості гемоглобіну до кисню.

У варіантах досліду K + L-аргінін спостерігали достовірне зниження спорідненості гемоглобіну до кисню на 12,5 % порівняно з варіантами контролю. У досліді K + L-NAME спостерігали протилежний результат.

Виявилося, що у зразках K + L-NAME зростає спорідненість гемоглобіну крові до кисню на 10 % щодо властивостей гемоглобіну контрольних щурів, а у тварин

групи EXAI + L-NAME – на 40 % проти гемоглобіну щурів з EXAI, про що свідчить показник P_{50} (рис. 2, Б, В; табл. 2).

У наших дослідженнях виявлено, що споживання L-аргініну щурами з EXAI призводить до підвищення спорідненості гемоглобіну до кисню на 12 % щодо показників для гемоглобіну алкоголізованих щурів.

Аналізуючи результати спорідненості гемоглобіну до кисню за умов EXAI при споживанні L-аргініну, можна припустити, що екзогенне введення субстрату NOS індукує низку реакцій, які ведуть до утворення NO *de novo*. Ця сполука, взаємодіючи з молекулою гемоглобіну, може екранувати місця взаємодії інтермедіатів метаболізму етанолу з білком, що призводить до порушення його характерної конформації та, як наслідок, спорідненості до кисню. Виявлений ефект зниження спорідненості гемоглобіну до кисню у варіантах К + L-аргінін, на нашу думку, може бути обумовлений зміною конформації білка, яка спричинена безпосередньою взаємодією L-аргініну з деякими боковими радикалами амінокислотних залишків молекули. Крім того, підвищення спорідненості гемоглобіну до кисню у варіантах EXAI + L-аргінін порівняно з варіантами EXAI свідчить про те, що L-аргінін і ацетальдегід, очевидно, виступають конкурентами у реакції з білком.

Подальше вивчення фізико-хімічної характеристики Hb у досліджуваних групах щурів проводили методом абсорбційної спектроскопії.

Особливістю Hb та його лігандних форм є відмінності їхніх

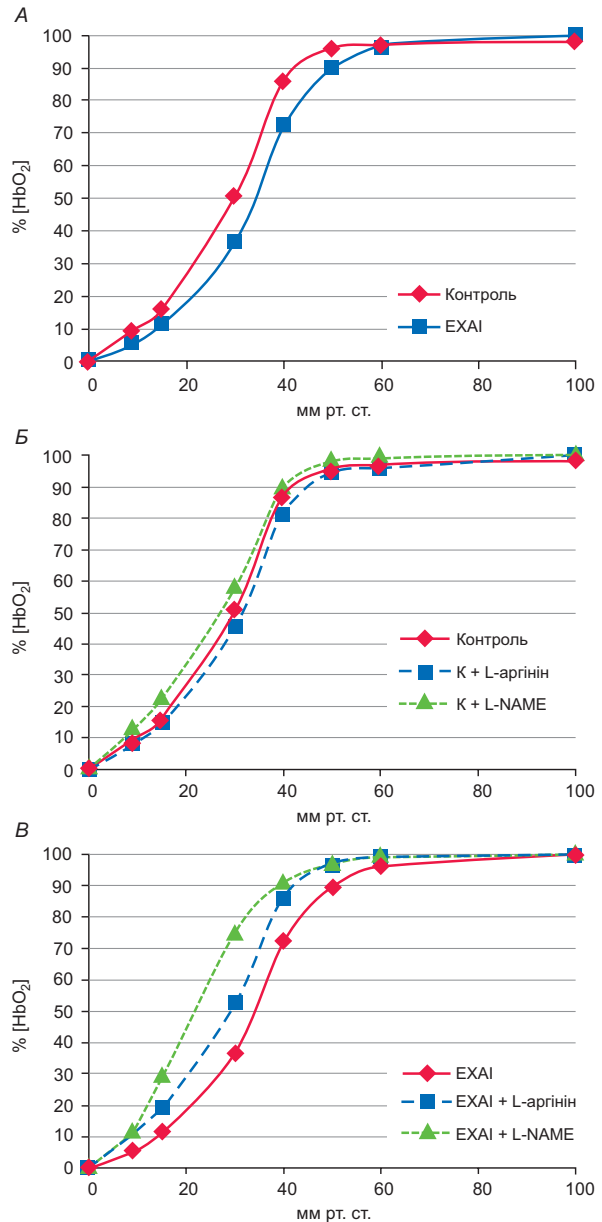


Рис. 2. Типові криві дисоціації оксигемоглобіну крові щурів у нормі, за умов алкогольної інтоксикації (А), за споживання L – аргініну і L – NAME (Б, В)

Fig. 2. Typical dissociation curves of rat blood oxyhemoglobin under EXAI (A) and treatment with L-arginine and L-NAME (B, B)

спектрів поглинання в ультрафіолетовому і видимому діапазоні довжин хвиль. Спектри поглинання лігандних форм HbO_2 , COHb і NOHb характеризуються інтенсивною смугою в діапазоні довжин хвиль 405–420 нм (γ -смугою Soret) та двома менш інтенсивними смугами з максимумами при 576 нм (α -смугою) і при 540–541 нм (β -смугою). Ці спектри є аналогічними, але точне положення максимумів смуг трохи змінюється залежно від природи ліганда.

Водночас крива спектра поглинання RHb має одну широку смугу з максимумом при 555–560 нм та інтенсивну смугу Soret з максимумом при 420 нм (рис. 3).

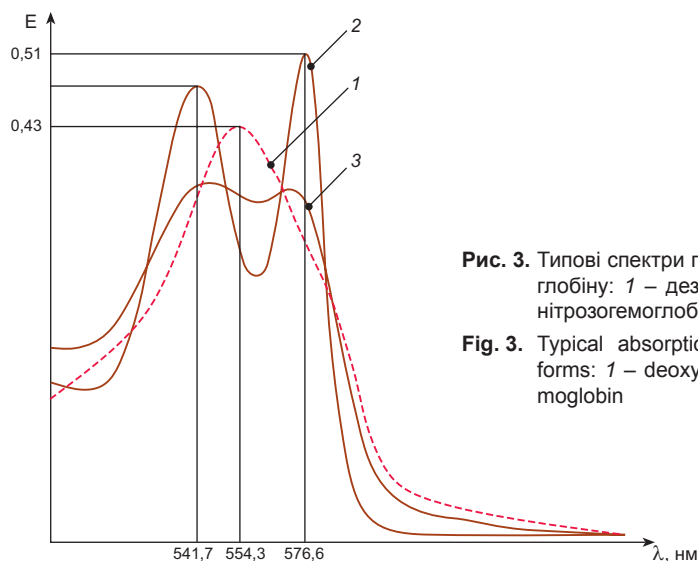


Рис. 3. Типові спектри поглинання лігандних форм гемоглобіну: 1 – дезоксиформа; 2 – оксиформа; 3 – нітрозогемоглобін

Fig. 3. Typical absorption spectra of hemoglobin ligand forms: 1 – deoxyform; 2 – oxyform; 3 – nitroso-hemoglobin

Електронний спектр HbO_2 щурів з EXAI характеризувався батохромним ефектом смуги Soret (зсув на 3,4 нм у довгохвильову ділянку) порівняно з HbO_2 контрольних щурів. Крім цього, спостерігали гіпохромний ефект для гемоглобіну алкохолізованих щурів в ультрафіолетовій ділянці спектра (274,6–275,2 нм) (рис. 4).

Отримані результати співзвучні з даними літератури, які стверджують, що додавання до гемолізату еритроцитів етанолу робить спектр поглинання RHb у зоні смуги Soret більш звуженим, чітко окресленим, підвищується її інтенсивність і спостерігається зсув у довгохвильову ділянку [1–4].

Спектри поглинання HbO_2 у варіантах дослідів за споживання L-аргініну або L-NAME не відрізнялися між собою.

Оскільки нами були виявлені зміни спорідненості гемоглобіну до кисню, вмісту HbF й MetHb за споживання L-аргініну, то з метою дослідження участі NO у цих процесах були проведені експерименти щодо екзогенного нітрування зразків Hb у системі *in vitro* за допомогою NaNO_2 (рис. 5). Швидкість переходу однієї лігандної форми в іншу фіксували спектрофотометрично (табл. 3).

Відмічено, що за споживання інгібітора NO -синтази щурами з EXAI знижується інтенсивність нітрозилування білкової частини гемоглобіну. Із результатів випливає, що час переходу RHb у HbNO за умов EXAI зростав у 2,2 рази, а у варіантах зі споживанням L-аргініну тваринами з EXAI швидкість нітрузування RHb зростала в

1,4 разу (табл. 3). Споживання щурами неселективного інгібітора L-NAME призвело до значного сповільнення переходу RНb у НbNO в контрольній групі тварин і у тварин з EXAI (табл. 3).

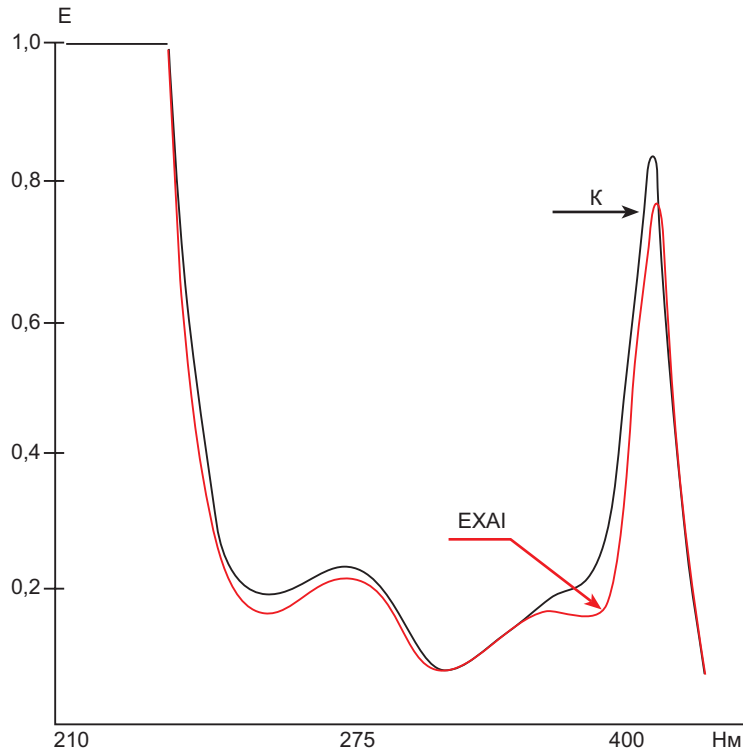


Рис. 4. Електронні абсорбційні спектри оксигемоглобіну крові щурів у контролі та за умов EXAI

Fig. 4. Electronic absorption spectra of oxyhemoglobin in blood of rats in control group and under EXAI

Таблиця 3. Вплив L-аргініну та L-NAME на швидкість нітрузування дезоксигемоглобіну щурів у контролі та за EXAI ($M \pm m$, $n = 6$)

Table 3. L-arginine and L-NAME effects on deoxyhemoglobin nitrosation rates in control group and under EXAI ($M \pm m$, $n = 6$)

Варіанти	Без додаткових факторів	L-аргінін	L-NAME
Контроль, хв	$10 \pm 2,1$	$10,25 \pm 1,5$	$20 \pm 1,43^*$
EXAI, хв	$22 \pm 1,9^*$	$16 \pm 1,2^{**}$	$27 \pm 1,2^{**}$

Спектри поглинання, які характеризують перехід RНb в NOHb, свідчать про те, що нітрування гемоглобіну крові щурів *in vitro* супроводжується незначним гіперхромним ефектом і зсувом максимуму в ділянці поглинання ароматичних амінокислот із 274,9 нм у контролі до 274,6 нм – за умов EXAI. Таку ж картину спостерігали і для гемоглобіну щурів у варіантах з EXAI за споживання L-аргініну. Максимум смуги поглинання ділянки ароматичних амінокислот збігався. У варіантах із L-NAME на

тлі EXAI спостерігали незначний зсув максимуму поглинання у ділянці поглинання ароматичних амінокислот у короткохвильову ділянку щодо контролю (рис. 5).

Суттєві зміни спектрів поглинання переходу RНb в HbFe²⁺NO виявлені у видимій ділянці 410–420 нм (рис. 5). Електронний спектр HbFe²⁺NO у варіантах з EXAI характеризується гіперхромним ефектом у межах смуги Sore, максимум якого перебуває при довжині хвилі 417,7 нм.

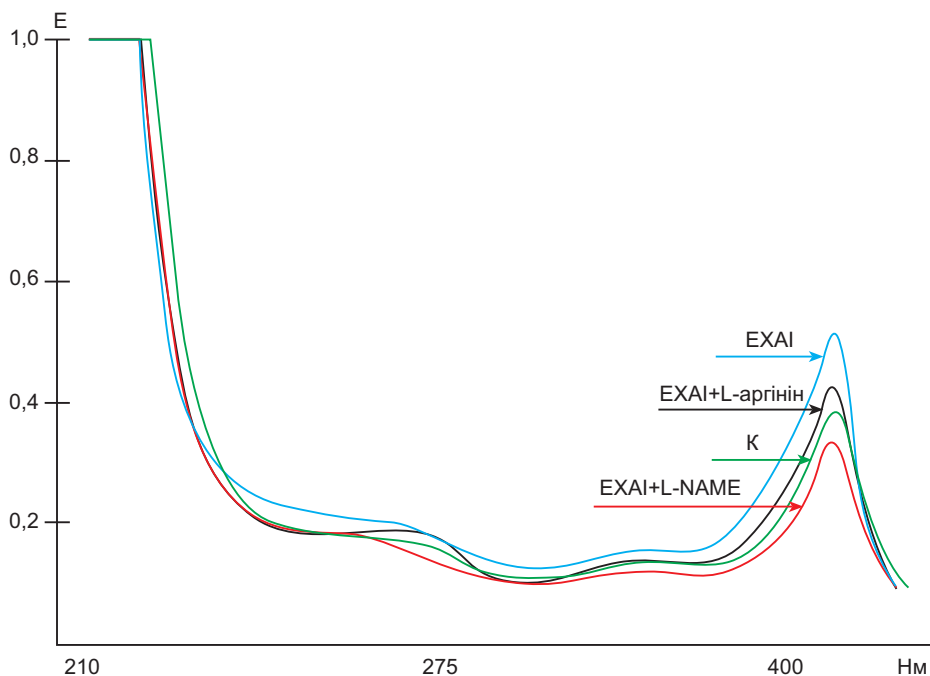


Рис. 5. Типові електронні спектри NOHb, отримані при екзогенному нітруванні зразків гемоглобіну в системі *in vitro* за допомогою NaNO₂ у контролі, за умов EXAI та у разі введення L-аргініну чи L-NAME

Fig. 5. Typical electronic NOHb spectra obtained during exogenous nitration of hemoglobin samples *in vitro* by means of NaNO₂ in control group, under ECAI and when treated with L-arginine or L-NAME

Після споживання L-аргініну щурами з EXAI спостерігається у цій же ділянці спектра (смуга Sore) зниження інтенсивності поглинання HbFe²⁺NO порівняно з гемоглобіном тварин з EXAI, яким не вводили L-аргінін. Зниження інтенсивності смуги спектра поглинання за споживання інгібітора NO-синтази щурами з EXAI свідчить про надмірне сповільнення інтенсивності реакції нітрузування гемоглобіну. Спектри поглинання гемоглобіну контрольної групи щурів, які споживали L-аргінін або L-NAME, не відрізнялися між собою в усіх серіях дослідів.

У ході аналізу ділянки спектра поглинання, яка може свідчити про нітрозилування глобіну по цистеїну в 93 положенні β-ланцюгів (340–370 нм), відзначено, що інтенсивність смуги у цій зоні за умов EXAI була вищою порівняно зі смугою гемоглобіну контрольних тварин. Під час споживання щурами L-аргініну на тлі EXAI спостерігали наближення характеристичних значень спектра поглинання гемоглобіну в досліджуваній зоні до таких, як у контролі.

ВИСНОВОК

Узагальнюючи результати наших досліджень і дані літератури стосовно впливу алкоголю на кисеньтранспортну функцію гемоглобіну, можна зробити висновок про те, що процес інтоксикації за умов EXAI призводить до зростання у кровоплинні старіючих клітин, збагачених такими формами гемоглобіну, які легко піддаються модифікації як продуктами вільнорадикальних процесів, так і безпосередньо етанолом та його метаболітами. За умов EXAI зростає концентрація лужнотійкого гемоглобіну і метгемоглобіну на фоні зниження концентрації тотального гемоглобіну. За EXAI спостерігалось зниження спорідненості гемоглобіну до кисню, що може бути наслідком як підвищення вмісту $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$, так і зміни конформації глобінового компонента й електронної структури гему. Зафіксовані зміни в електронному спектрі гемоглобіну у діапазоні хвиль видимої ділянки є наслідком перерозподілу електронної густини в системі спряжених зв'язків порфіринового макроциклу й атома феруму.

Встановлено коригуючий вплив неселективного інгібітора NOS – L-NAME на вміст метгемоглобіну в крові щурів і спорідненість гемоглобіну до кисню. Однак вагоміші відмінності у варіантах з EXAI спостерігалися за споживання L-аргініну, які супроводжувалися збільшенням вмісту HbO_2 і зменшенням концентрацій MetHb та HbF. Отже, результати проведених досліджень свідчать, що за хронічної алкогольної інтоксикації L-аргінин виступає як позитивний фактор, який забезпечує стабілізацію постачання органів і тканин киснем за цієї патології.

1. *Artjuhov V.G. Haemoproteins: regularities of photochemical transformations in a different microenvironment.* Voronezh: VNU, 1995. 280 p. (In Russian).
2. *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).
3. *Blumenfeld L.A. Hemoglobin and reversible joining of oxygen.* Moscow: Sov. Science, 1957. 139 p. (In Russian).
4. *Bozhko G.H., Voloshin P.V.* The influence of ethanol on proteins of tissues and blood serum of humans and animals. **Biology Bulletin Reviews**, 1989; 108, 1(4): 52–65. (In Russian).
5. *Burov Ju. V., Vedernikova N.N. Neurochemistry and pharmacology of alcoholism.* Moscow, Medicina, 1985. 239 p. (In Russian).
6. *Chudinova E.S. Hemoglobin as an indicator of the reactivity of NO donors and reductase in the model NO-generating systems in vitro.* Moscow: Institute of Problems of Chemical Physics, 2007. 22 p. (In Russian).
7. *Chuvilin A.N., Serebrennikova G.A., Evstigneeva R.P.* Allosteric regulators of reversible oxygenation of hemoglobin. **Bioorg. Khim**, 1990; 16(9): 1157–1176. (In Russian).
8. *Drabkin D.L.* The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other specimens. **The Journal of Biological Chemistry**, 1946; 164(2): 703–723.
9. *Drel V.R.* Main mechanisms of the initiation and development of diabetic complications: the role of nitrate stress. **Studia Biologica**, 2010; 4(2): 141–158. (In Ukrainian).
10. *Dudok K., Dudok T., Vlokh I.* et al. Optical spectra of hemoglobin taken from alcohol dependent humans. **Ukr. J. Phys. Opt**, 2005; 6(4): 142–145.
11. *Ivanov Yu.G.* Modification of the spectrophotometric method of determining oxygen dissociation curves of haemoglobin. **Bulletin of Exper. Biology and Medicine**, 1975, 79(11): 122–123. (In Russian).

12. Jachnik A.I., Gumenjuk M.I., Chopchik A.D. Physiological aspects of nitric oxide in disorders of pulmonary circulation and the role of L-arginine in the correction of its synthesis. **Ukr. Pulmonol. Journal**, 2008; 1: 40–44. (In Ukrainian).
13. Kajimura M., Fukuda R., Bateman R.M. et al. Interactions of Multiple Gas-Transducing Systems: Hallmarks and Uncertainties of CO, NO, and H₂S Gas Biology. **Antioxid. Redox Signal**, 2010; 15, 13(2): 157–192.
14. Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N., Gladwin M.T. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, 2006; 26(4): 697–705.
15. Kit Z.M. Arginine – nitric oxide vasodilation indexes and their correction in patients with hypertension and different weight. **Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry Journal**, 2013; 4(64): 7–11. (In Ukrainian).
16. Knjaskova I.I. Current approaches to anaemia diagnostics. **Medicines Ukraine**, 2010; 7(143): 52–56. (In Ukrainian).
17. Korobov V.M. The role of nitric oxide in the gases transport regulation. **Ukr. Biochem. Journal**, 2001; 73(4): 13–18. (In Ukrainian).
18. Kostenko V.A., Yelinska A.N., Liashenko L.I. et al. Role of salivary glands in mechanisms of nitric oxide autoregulation in mammals and their impairments. **Actual Problems of Modern Medicine**, 2013; 13, 2(42): 10–14. (In Ukrainian).
19. Kravchenko N.A., Yarmish N.V. Regulation of endothelial NO-synthase expression and dysfunction of vessel endothelium at cardiovascular pathology. **Cytology and Genetics**, 2008; 42(4): 69–81. (In Russian).
20. Lyuta M., Fedorovych A., Burda V. et al. The effects of agmatine on physicochemical properties of rat hemoglobin under experimental diabetes mellitus. **Visnyk of the Lviv University. Series Biology**, 2011; 55: 39–46. (In Ukrainian).
21. Malkoch A.V., Maidannik V.G., Kurbanova E.G. The physiological role of nitric oxide in organism (part 1). **Nephrology and Dialysis**, 2000; 2(12): 69–75. (In Russian).
22. Parkhomenko Yu.M., Donchenko G.V., Pylypchuk S.Yu. et al. Characteristic metabolic disturbances in the rat tissues caused by long-term use of alcohol. **Ukr. Biochem. Journal**, 2007; 79(3): 62–68. (In Russian).
23. 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.
24. 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).
25. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Gubkina S.A. et al. Interaction between albumin-bound dinitrosyl iron complexes and reactive oxygen species. **Biofizika**, 2007; 52(3): 534–538. (In Russian).
26. Starykovych L.S., Dudok K.P., Sybirna N.O. et al. Influence of spirocarbon on physical, chemical and biochemical properties of rat erythrocytes under normal conditions and during alcoholic intoxication. **Medical Chemistry**, 2009; 11(1): 58–62. (In Ukrainian).
27. Strutynskiy R.B., Kotsuruba A.V., Rovenets R.A. et al. Biochemical mechanisms of K_{ATP} channels opener flocalin (medical form) cardioprotective action at ischemia-reperfusion of myocard. **Fiziologichnyj Zhurnal**, 2013; 59(4): 16–27. (In Ukrainian).
28. Sybirna N.O., Burda V.A., Chajka Ya.P. **Methods of blood system research**. Lviv: LNU, 2006. 100 p. (In Ukrainian).
29. Sybirna N.O., Lyuta M.Ya., Klymyshyn N.I. Molecular mechanisms of nitric oxide deposition in erythrocytes. **Studia Biologica**, 2010; 4(1): 143–160. (In Ukrainian).
30. Sybirna N., Vovk O., Burda V. et al. Influence of L-arginine and inhibitors of NO-syntase on platelet antioxidant system in streptozotocin diabetic rats. **Visnyk of the Lviv University. Series Biology**, 2004; 38: 50–56. (In Ukrainian).

31. *Veliky M.M., Bilyi O.I., Dudok K.P.* Determination of hemoglobin derivatives in blood by method of optical density ratio. **Light and Optics in Biomedicine**, 2001; 4515: 199–201.
32. *Vlokh I., Nechiporenko I., Hul A.* et al. Optical marking of alcohol induced hemoglobin modification. **Ukr. J. Opt**, 2009; 10(1): 1–21.

L-ARGININE AND L-NAME EFFECTS ON FUNCTIONAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF HEMOGLOBIN IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

N. V. Yefimenko, K. P. Dudok, N. O. Sybirna

*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: nataliya_yefimenko@mail.ru*

It has been revealed that different ligand forms of hemoglobin in the peripheral blood of rats are redistributed under the experimental chronic alcohol intoxication (ECAI), including a reduction of oxyhemoglobin and growth of methemoglobin against the background of total hemoglobin reduction. Also it has been found that under ECAI the concentration of alkaline resistant hemoglobin is rising, whereas the affinity of rat hemoglobin for oxygen is falling. The *per os* consumption of NOS substrate (L-arginine) under ECAI causes a significant decrease in methemoglobin content in the blood of rats. As for the consumption of NOS-unspecific inhibitor (L-NAME), it leads to an increase in the affinity of rat peripheral blood hemoglobin for oxygen both under ECAI and in control group. The consumption of L-arginine by rats of control group decreases the affinity of hemoglobin to oxygen similar to ECAI. The absorption spectra of RHb and HbFe²⁺ NO of rat's blood were characterized at Soret band and in the ultraviolet region. It was found that rate of nitration of hemoglobin *in vitro* under L-arginine consumption increases comparing with ECAI. In the groups of animals consumed L-NAME nitration of hemoglobin was slowed in control and in the group with ECAI.

Keywords: experimental chronic alcohol intoxication (ECAI), hemoglobin, ligand forms of hemoglobin, hemoglobin affinity for oxygen, NOS-unspecific inhibitor – L-NAME, L-arginine.

ВЛИЯНИЕ L-АРГИНИНА И L-NAME НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЕМОГЛОБИНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Н. В. Ефименко, К. П. Дудок, Н. А. Сибирная

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: nataliya_yefimenko@mail.ru*

В условиях экспериментальной хронической алкогольной интоксикации (ЭХАИ) у крыс выявлено перераспределение лигандных форм гемоглобина в периферической крови, в частности: снижение содержания оксигемоглобина, рост содержания метгемоглобина на фоне снижения концентрации тотального гемоглобина. Установлено, что в условиях ЭХАИ повышается концентрация щелочно-

устойчивого гемоглобина, а также снижается сродство гемоглобина крови крыс к кислороду. Потребление животными с ЭХАИ *per os* субстрата NOS – L-аргинина приводит к достоверному снижению содержания метгемоглобина в крови крыс. Потребление крысами неспецифического ингибитора NOS – L-NAME приводит к повышению сродства гемоглобина периферической крови к кислороду как при ЭХАИ, так и в контроле. Потребление крысами контрольной группы L-аргинина приводит к снижению сродства гемоглобина к кислороду, как и в условиях ЭХАИ. Описаны спектры поглощения RНb і HbFe²⁺NO крови крыс в области полосы Sore и в ультрафиолетовой области. Установлено, что скорость нитрования гемоглобина *in vitro* при потреблении L-аргинина возрастает по сравнению с ЭХАИ. В группе животных с L-NAME наблюдается замедление нитрования гемоглобина как в контроле, так и при ЭХАИ.

Ключевые слова: экспериментальная хроническая алкогольная интоксикация (ЭХАИ), гемоглобин, лигандные формы гемоглобина, сродство гемоглобина к кислороду, неспецифический ингибитор NOS – L-NAME, L-аргинин.

Одержано: 11.06.2015