

УДК 576.326;591.431

РОЛЬ ПОХІДНИХ ПІРОЛОПРИМІДИНДІОНІВ У РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ГЕМОГЛОБІНУ Й АКТИВНОСТІ ОКРЕМИХ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ КРОВІ ЛЮДЕЙ *IN VITRO*

*К. Дудок¹, Л. Старикович¹, О. Речицький², А. Шкаволяк,³ Н. Сибірня¹

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

²Херсонський державний університет
вул. 40 років Жовтня, 27, Херсон 73002, Україна

³Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
вул. Пекарська, 69, Львів 79010, Україна

Вивчали вплив спірокарбону та піролопохідних піримідиндіонів (речовини № 1, № 2, № 3) на стабільність еритроцитарних мембран, спорідненість гемоглобіну до кисню, каталазну активність, активність сумарної, індукцибельної та ендотеліальної NO-синтази (NOS), вміст нітритів і нітратів у гемолізатах еритроцитів крові здорових донорів *in vitro*. Встановлено, що після одно- і 24-годинної інкубації еритроцитів з розчинами речовин № 1, № 2 і № 3 підвищується стійкість еритроцитів до кислотного гемолітика. Тривалість максимального і тотального гемолізу достовірно зростає. Показано, що спірокарбон і похідні піримідиндіонів підвищують спорідненість гемоглобіну до кисню, про що свідчить зниження параметра P_{50} . За умов експерименту виявлено зниження каталазної активності у гемолізатах еритроцитів. Інкубація еритроцитів із речовиною № 3 призводить до зростання активності індукцибельної NOS, а речовиною № 2 – до зниження активності сумарної NOS і підвищення вмісту нітратів. Вміст нітритів знижується за інкубації з речовиною № 1. Обговорюються механізми дії похідних піролопіримідиндіонів на структуру мембран еритроцитів, активність ферментів антиоксидантного захисту і спорідненість гемоглобіну до кисню.

Ключові слова: спірокарбон, похідні піролопіримідиндіонів, еритроцити, гемоглобін, оксигенація, каталаза, NOS, нітрити, нітрати.

Відомо, що патології різного типу, зокрема, гостра алкогольна інтоксикація, діабет, променева хвороба, онкологічні захворювання тощо, характеризуються токсичним і гіпоксичним генезом, метаболічним ацидозом, тому їхня терапія потребує застосування препаратів, які здатні запобігати дії токсичних метаболітів, підтримувати стабільність і функціональний стан внутрішнього середовища організму та сприяти профілактиці ускладнень [4, 13–15]. З огляду на це, пошуки сполук, які відповідають зазначеним вимогам, є важливою проблемою сучасної медицини і біології.

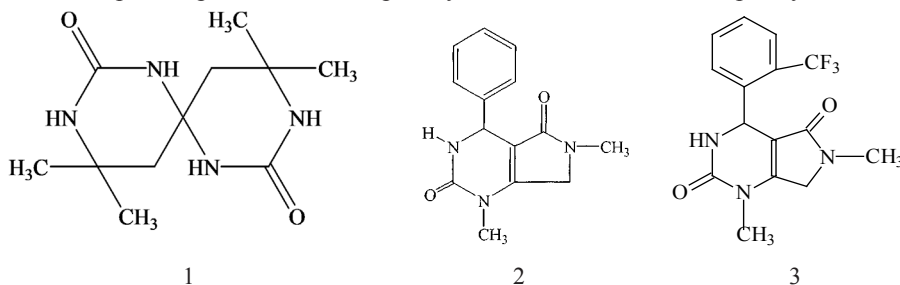
Останнім часом у медичній практиці дедалі ширше застосовуються низькомолекулярні синтетичні сполуки та речовини природного походження, які виконують функції біорегуляторів. Особливість дії цих сполук полягає у тому, що вони, в силу своєї хімічної структури, здатні взаємодіяти з біологічними макромолекулами або безпосередньо з метаболітами, нормалізуючи перебіг метаболічних процесів у тканинах організму.

Перспективними у цьому плані можуть бути спіросполуки (продукти конденсації сечовини) та похідні піролопіримідиндіонів, висока біологічна активність яких була раніше виявлена [10–12]. Однак у літературі інформація щодо обґрунтування молекулярних механізмів дії цих препаратів як медіаторів чи модифікаторів біохімічних процесів недостатня.

Речовини, які були використані у наших дослідженнях, належать до групи похідних піролопиримидиндіонів, синтезовані на кафедрі органічної та біологічної хімії Херсонського державного університету [4, 13].

Спірокарбон, формула 1 (речовина № 1) – конденсована гетероциклічна сполука, що містить у кожній із циклічних структур по два атоми Нітрогену та чотири атоми Карбону, один з яких є спільним. За своїми фізичними властивостями ця сполука є водорозчинною, температура плавлення становить +306...307°C [4, 12, 13].

Цикли у складі цієї речовини перебувають у *транс*-конфігурації щодо спільного атома Карбону у зв'язку зі стеричними перешкодами та взаємним відштовхуванням неподілених пар електронів атомів Нітрогену біля спільного атома Карбону:



Речовина № 2 (формула 2) – 1,6-диметил-4-феніл-1,2,3,4,5,7-гексагідропіроло-[3,4-е]-піримидиндіон-2,5(1H), розчинна у гарячій воді, етанолі, ацетоні, хлороформі. Температура плавлення становить +212...213°C. Молекулярна маса цієї сполуки дорівнює 257 [4, 12].

Речовина № 3 (формула 3) – 1,6-диметил-4-(трифлорофеніл)-1,2,3,4,5,7-гексагідропіроло-[3,4-е]-піримидиндіон-2,5(1H) також є безбарвною кристалічною сполукою з температурою плавлення +222...224°C, розчиняється у гарячій воді, етанолі, метанолі, хлороформі. Молекулярна маса – 325 [4, 12].

Розглядаючи хімічну структуру описаних сполук, можна зробити висновок, що вони здатні взаємодіяти з білками як зі зарядженими кластерами молекул, так і з їхніми гідрофобними ядрами, а також з іншими біополімерами та надмолекулярними комплексами.

Раніше було з'ясовано, що деякі похідні піролопиримидиндіонів володіють протимікробною, протитуберкульозною активністю і впливають на систему зсідання крові [4]. Зокрема, спірокарбон впливає на гіпоталамо-гіпофізарну нейроендокринну систему шурів, на ріст, розвиток і продуктивність курей та рослин [10, 13].

З огляду на те, що периферична кров є тією системою, на якій позначаються наслідки впливу тих чи інших захворювань, факторів довкілля, фармакологічних препаратів, актуальним є вивчення структурних особливостей і функції компонентів периферичної крові за дії на них досліджуваних чинників. Унікальними у цьому плані є еритроцити та їхній основний білок – гемоглобін, а також ферменти антиоксидантної системи.

Еритроцити як об'єкт дослідження цікаві тим, що вони відіграють важливу роль у транспорті O_2 , CO_2 та продуктів перетворення NO . Універсальність структури мембран усіх клітин організму дає підстави розглядати плазматичні мембрани еритроцитів певною мірою як модель, що відображає зміни, які відбуваються у мембранах інших типів клітин за дії тих чи інших факторів [2].

Метою нашого дослідження було вивчити вплив синтезованої сполуки гетероциклічного ряду спірокарбону та двох похідних піролопиримидиндіонів на стійкість еритроцитарної мембрани до дії кислотного гемолітика, спорідненість гемоглобіну до кисню, каталазну активність, активність NO -синтази (NOS), вміст нітратів і нітритів у гемолізатах крові.

Матеріали та методи

У досліджах використовували цільну периферичну гепаринізовану кров практично здорових донорів, взяту з ліктьової вени загальноприйнятим методом.

Еритроцитарну масу відділяли від плазми шляхом центрифугування при 500 g, використовуючи ізотонічний розчин натрію хлориду (0,155 М). Відмиті еритроцити інкубували з розчинами сполук № 1, № 2 і № 3, приготованих на 0,155 М NaCl, концентрація яких становила відповідно: 1 мг·мл⁻¹ для № 1 та № 2, і 0,5 мг·мл⁻¹ для № 3. Інкубацію проводили у співвідношенні 1 : 3 (еритроцити : розчини речовин) протягом 1 год і 24 год. Стійкість мембран еритроцитів до кислотного гемолітика визначали за методикою Терскова та співавт. [17]. Спорідненість гемоглобіну до кисню вивчали спектрофотометричним методом у модифікації Іванова шляхом побудови кривих оксигенації [5]. Гемоліз еритроцитів для визначення спорідненості гемоглобіну до кисню проводили 3,3 мМ K₂Na-фосфатним буфером рН 7,36.

Каталазну активність визначали за методом Королук та співавт. [9], активність NOS – за методом Сумбаєва та співав. [16], вміст нітратів і нітритів – з використанням модифікованого методу Гріса [8].

Отримані результати опрацьовували статистично, використовуючи *t*-критерій Стьюдента, за допомогою комп'ютерної програми MS Excel.

Результати і їхнє обговорення

У літературі достатньо повно описано структурно-функціональні властивості еритроцитів і гемоглобіну в нормі та за деяких патологічних станів впливів [1, 2, 20, 22]. Однак постійне зростання кількості різноманітних факторів негативного впливу на організм людини і тварин, а також розширений діапазон синтетичних лікарських препаратів потребує більш детального аналізу реакції еритроцитів щодо дії цих факторів.

З огляду на ключову роль еритроцитів у системі крові важливе значення має стабільність фізико-хімічних характеристик їхніх мембран, а також динаміка змін структурно-функціонального стану основного білка червоних кров'яних клітин – гемоглобіну. Ці показники є визначальними при вивченні реакції органів і тканин на дію ендогенних та екзогенних чинників. Варто зауважити, що зі стабільністю мембран еритроцитів пов'язані гліколітичні реакції й ефективність роботи ферментів антиоксидантного захисту, а також киснетранспортної функції гемоглобіну.

Через еритроцитарну мембрану, подібно до мембран інших клітин, здійснюється транспорт білково-пептидних гормонів – шляхом інтерналізації гормонорецепторного комплексу, іонний транспорт тощо. Навіть незначні порушення стабільності мембрани можуть призвести до зростання пасивного транспорту іонів калію і натрію через неї, наслідком чого є зміна осмотичного балансу, окиснення фосфоліпідів, зміна активності мембранної АТФ-ази і зниження тривалості життя еритроцита [11]. Окрім того, склад ліпідного компонента еритроцита і ступінь його окисненості впливає на здатність до асоціації з позаклітинними медіаторами та внутрішніми еритроцитарними білками, у тому числі з гемоглобіном, ферментами гліколізу й антиоксидантної системи.

У попередніх наших дослідженнях, які стосувалися вивчення впливу спірокарбону на стабільність мембран еритроцитів щурів *in vitro*, було встановлено, що ця сполука сприяє стабілізації мембран досліджуваних клітин [3, 12, 15].

Як з'ясувалося, інкубація еритроцитів крові здорових донорів із розчинами спірокарбону та піролопіримідиндіонів призводить до зміни резистентності еритроцитів до кислотного гемолітика (рис. 1, табл. 1).

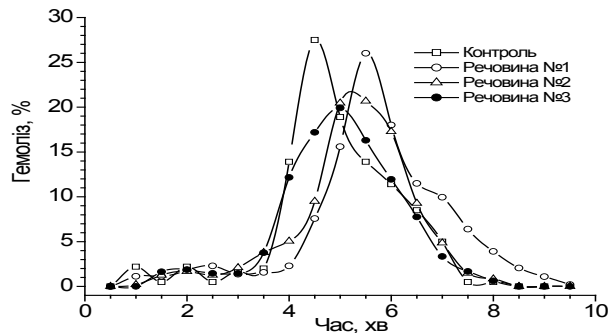


Рис 1. Типові усереднені еритрограми кислотного гемолізу еритроцитів крові здорових донорів до (контроль) та після одноденної інкубації з речовинами № 1, № 2, № 3.

Таблиця 1

Параметри еритрограм крові здорових донорів до (контроль) та після інкубації зі спірокарбонем (№ 1) та похідними піролопіримідиндіонів (№ 2, № 3), $M \pm m$

| Варіанти дослідів | n | Максимальний гемоліз, | Тотальний гемоліз, | Максимальний гемоліз, |
|--------------------------|----|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| | | хв | хв | % |
| Контроль | 14 | 4,6±0,10 | 6,3±0,56 | 27,5±4,0 |
| Інкубація з № 1 (1 год) | 4 | 5,5±0,46* | 6,7±0,30 | 21,0±1,5 |
| Інкубація з № 1 (24 год) | 6 | 6,0±0,31* | 10,5±0,54* | 13,9±0,6* |
| Інкубація з № 2 (1 год) | 5 | 4,8±0,29 | 7,2±0,75 | 20,0±3,0 |
| Інкубація з № 2 (24 год) | 6 | 6,5±0,25* | 9,5±0,46* | 16,3±0,7* |
| Інкубація з № 3 (1 год) | 5 | 6,2±0,48* | 7,8±0,15* | 21,5±1,5 |
| Інкубація з № 3 (24 год) | 6 | 5,5±0,13* | 9,5±0,42* | 17,3±0,8* |

* – Різниця щодо контролю вірогідна, $P \leq 0,05$.

Результати свідчать, що інкубація еритроцитів упродовж 1 год у присутності речовини № 1 сприяє відтермінуванню часу гемолізу максимальної кількості еритроцитів з одночасним сповільненням тотального гемолізу порівняно з контролем. Інкубація з цією ж речовиною протягом 24 год посилює виявлені зміни, які характеризуються зростанням частки особливо резистентних до гемолітика еритроцитів. Подібні результати спостерігалися і при інкубації еритроцитів з речовинами № 2 і № 3.

Виявлені нами відмінності щодо різної стійкості еритроцитів крові до дії кислотного гемолітика можна пояснити, виходячи з властивостей структури мембрани еритроцита, тривалості життя еритроцита, змінами метаболічних процесів у цих клітинах, спільним і взаємним впливом ендогенних та екзогенних факторів.

Тривалість гемолізу еритроцитів залежить від часу, необхідного для подолання гемолітиком бар'єра мембранної непроникності, швидкості руйнування внутрішньоклітинних структур і часу, протягом якого механічна міцність мембран протистоїть наростаючому осмотичному тиску всередині клітини [11, 15].

Відомо, що механізм регулювання лабільності мембран еритроцитів є багатограним і залежить від багатьох факторів. Контроль за станом структури мембран і функціональним станом еритроцита реалізується через процеси фосфорильовання мембранних білків, що, у свою чергу, визначає форму клітин і їхню здатність до деформації. Значну роль у порушенні стабільності мембрани можуть відігравати не лише клітинні протеїнази й АТФ-ази, але й зміни метаболізму у цих клітинах узагалі. Значною мірою інтенсивність гемолізу еритроцитів також тісно пов'язана з перекисним окисненням ліпідів (ПОЛ) і здебільшого

прямо залежить від накопичення відповідних метаболітів, стану антиоксидантної системи та стабільності іонотранспортувальних систем. [2, 11, 14, 15].

Отже, отримані результати досліджень свідчать, що спірокарбон та похідні піролопіримідиндіонів, хоча суттєво відрізняються за структурою, однак унаслідок наявності гідрофобних угруповань здатні стабілізувати мембранні структури еритроцитів. Не виключено, що ці сполуки можуть блокувати (екранувати) заряджені групи на поверхні мембран еритроцитів або інтеркалюватися між гідрофобними хвостами жирних кислот мембранних ліпідів і впливати на конформаційний стан білково-ліпідних компонентів узагалі.

Оскільки основним білком еритроцитів є гемоглобін, який може асоціювати з еритроцитарною мембраною, важливо було у подальших експериментах вивчити насичення гемоглобіну киснем на цій же дослідній моделі.

На рис. 2 показані типові криві оксигенації гемоглобіну в умовах експерименту.

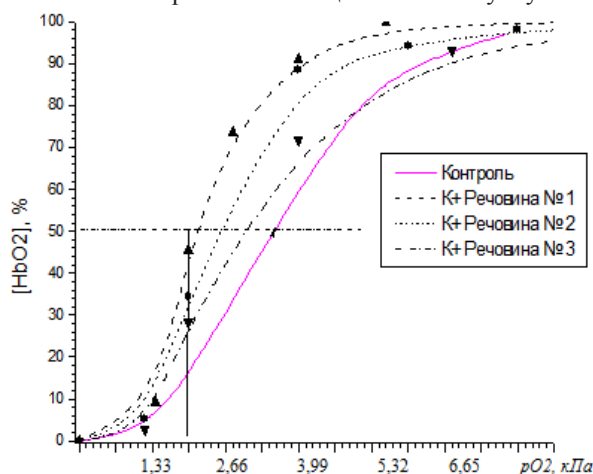


Рис. 2. Типові криві насичення киснем гемоглобіну крові здорових донорів у контролі та за дії досліджуваних речовин *in vitro*: Контроль (К) – гемолізати еритроцитів здорових донорів; К + Речовина № 1 – гемолізати еритроцитів здорових донорів після інкубації з речовиною № 1; К + Речовина № 2 – гемолізати еритроцитів здорових донорів після інкубації з речовиною № 2; К + Речовина № 3 – гемолізати еритроцитів здорових донорів після інкубації з речовиною № 3.

Результати досліджень показали, що після інкубації еритроцитів з речовинами № 1, № 2 та № 3 в усіх варіантах дослідження спорідненість гемоглобіну до кисню достовірно зростає порівняно з контролем відповідно на 30, 26 та 21% (табл. 2)

Таблиця 2

Показники значень парціального тиску кисню (pO_2 , кПа) за різного ступеня насичення гемоглобіну киснем ($[HbO_2]$, %) в умовах дії спірокарбону та похідних піролопіримідиндіонів *in vitro* ($M \pm m$)

| Варіанти досліджу | n | Ступінь насичення гемоглобіну киснем, % | | |
|-------------------|---|---|------------|------------|
| | | 50 | 75 | 90 |
| Контроль | 9 | 3,67±0,12 | 5,12±0,10 | 6,12±0,11 |
| Речовина № 1 | 5 | 2,55±0,11* | 3,06±0,07* | 4,02±0,10* |
| Речовина № 2 | 5 | 2,72±0,07* | 3,32±0,08* | 4,65±0,04* |
| Речовина № 3 | 5 | 2,93±0,07* | 4,26±0,09* | 5,85±0,05 |

* – Різниця щодо контролю вірогідна $P \leq 0,05$.

Відомо, що процес приєднання і віддачі гемоглобіном кисню є найважливішою фізіологічною функцією цього гемопротеїну. Особливим є те, що нормальне постачання органів і тканин киснем пов'язане з конформаційним станом молекули гемоглобіну.

У процесі оксигенації молекула гемоглобіну перебуває у рівновазі між двома конформаційними станами – розслабленим і напруженим ($R \leftrightarrow T$), високою і низькою спорідненістю до кисню і, перш за все, залежить від природи ліганда та регулюється відповідними метаболітами [18, 22].

З'ясовано, що в еритроциті йде активний метаболізм глюкози. Особливість гліколізу еритроцитів людини полягає у специфічних реакціях (шунта Rapoport-Luebering), у процесі яких синтезується 2,3-дифосфогліцерат (2,3-ДФГ), який, разом з АТФ, відіграє функцію основного регулятора спорідненості гемоглобіну до кисню.

Водночас, порушення іонного транспорту, динамічної рівноваги зв'язаного з мембраною АТФ, зв'язування 2,3-ДФГ іонами металів і зниження зв'язування його з гемоглобіном може призвести до зростання спорідненості останнього до кисню.

Можливим є й інший механізм зміни спорідненості гемоглобіну до кисню, який безпосередньо пов'язаний зі структурними змінами еритроцитарної мембрани і стосується обмеженості білка смуги 3 брати участь у формуванні гліколітичного метаболону. Різні білки еритроцита, у тому числі дезоксиформа гемоглобіну, фосфофруктокіназа, альдолаза, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, є конкурентами за зв'язування з білком смуги 3. У разі зростання кількості дезоксиформи гемоглобіну він набуває переваги у конкуренції з фосфофруктокіназою за можливість виступати «кором», на якому збирається метаболон. Унаслідок цього інтенсивність гліколітичних процесів знижується, і, відповідно, зменшується кількість 2,3-ДФГ, що призводить до підвищення спорідненості гемоглобіну до кисню. Криві оксигенації у цьому випадку будуть зміщуватися вліво [1, 2, 18]. Такі міркування можуть бути аргументами при обґрунтуванні результатів, отриманих у наших дослідженнях.

Можна також припустити, що, проникаючи в еритроцит, досліджувані нами сполуки унаслідок власної гідрофобності можуть взаємодіяти з поверхневими гідрофобними кластерами α -спіральных ділянок гемоглобіну, формуючи слабкі нековалентні (водневі, гідрофобні, Ван-дер-Ваальсові) зв'язки з білковою глобулою, впливаючи на його статично сформовану внутрішню гідрофобність, що може зсувати динамічну рівновагу у бік напруженої конформації. Таке припущення можна зробити, виходячи з даних літератури, де описано факти взаємодії сполук із двома конденсованими гідрофобними ядрами і трьома роз'єднаними у просторі, з імуноглобулінами та міоглобіном [1, 6, 7]. Не виключено, що у випадку гемоглобіну дія подібних за хімічною структурою сполук до тих, які використовували ми, може призвести до окисної модифікації гемоглобіну, зміни конформації цього гемопротеїну, здатності до транспорту кисню.

На процес переходу гемоглобіну з напруженого стану в розслаблений і навпаки впливають сполуки, які здатні взаємодіяти не лише з глобіновим компонентом, але й із простетичною групою цього гемопротеїну, що може бути зафіксовано спектроскопометрично [1, 18, 22]. Однак на ідентичних моделях дослідів, проведених нами раніше, які стосувалися спектроскопічних аналізів лігандних форм гемоглобіну, ми не виявили відмінностей у характеристичних спектрах поглинання світла у видимій ділянці [20].

Зниження парціального тиску кисню, при якому відбувається півнасичення та повне насичення гемоглобіну киснем (табл. 2), може непрямо свідчити про низький рівень ефективності антиоксидантної системи, тому в подальшому нами проведені дослідження

каталазної активності та ще одного важливого регуляторного білка – NOS у гемолізатах еритроцитів, виділених з використанням градисолу G [7].

Показано, що інкубування еритроцитів із досліджуваними речовинами призводить до достовірного зниження каталазної активності у системах з речовинами № 1 і № 2 (табл. 3).

Таблиця 3

Каталазна активність у гемолізатах еритроцитів людей у контролі та за дії досліджуваних речовин [нмоль·(хв·мг)⁻¹, M±m]

| Варіанти досліджу | n | Каталазна активність |
|-------------------|---|----------------------|
| Контроль | 8 | 82,18±6,88 |
| Речовина 1 | 8 | 51,61±5,50* |
| Речовина 2 | 5 | 51,72±5,32* |
| Речовина 3 | 4 | 67,21±7,32 |

* – Різниця вірогідна щодо контролю $P \leq 0,05$.

Спостережуваний ефект можна пояснити тим, що сполуки № 1 і № 2 є більш гідрофобними порівняно з трифлуоропохідним (№ 3), і їхня взаємодія з мембранними структурами сприятиме посиленню гідрофобності останніх, що призведе до зміни конформаційного стану молекули каталази і, як наслідок, до зниження активності цього фермента. Таке зниження каталазної активності суттєво впливає на роботу антиоксидантної системи в цілому і може призводити до модифікаційних змін структури гемоглобіну в напрямку зростання спорідненості гемоглобіну до кисню.

Ефективність роботи антиоксидантної системи значною мірою залежить від сумарної активності NOS і співвідношення її окремих ізоформ. Тому в наших подальших дослідженнях оцінено вплив тестованих речовин на NO-синтазу активність у гемолізатах еритроцитів.

Інкубування еритроцитів із речовинами № 1 і № 3 статистично достовірних змін сумарної NOS порівняно з контролем не викликає, але виявлено зниження її активності за інкубації зі сполукою № 2 (табл. 4).

Таблиця 4

Активність NOS в еритроцитах людей у різних варіантах досліджу [нмоль·(хв·мг)⁻¹, M±m]

| Варіанти досліджу | Контроль, n=8 | Речовина №1, n=6 | Речовина №2, n=6 | Речовина №3, n=4 |
|-------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Сумарна NOS | 4,94±0,72 | 4,91±0,40 | 3,04±0,40* | 4,59±0,81 |
| Індуцибельна NOS | 3,14±0,35 | 2,35±0,45 | 3,17±1,08 | 5,09±0,95, * |
| Ендотеліальна NOS | 2,43±0,63 | 2,23±0,17 | – | – |

* – Різниця вірогідна щодо контролю $P \leq 0,05$.

Вплив досліджуваних речовин на активність ізоформ NOS є неоднозначним. Виявлено, що спірокарбон не впливає не лише на сумарну активність досліджуваного ферменту, але й на співвідношення його окремих ізоформ. Відомо, що сумарна активність NOS у більшості клітин складається з активностей таких ізоформ: індуцибельної (незалежної від іонів кальцію у середовищі), нейрональної, ендотеліальної та мітохондріальної форм, які є кальційзалежними. В еритроцитах доведено існування двох ізоформ: індуцибельної та ендотеліальної [19, 21].

Ендотеліальна форма ферменту активується кальційзв'язувальним білком – кальмодуліном унаслідок взаємодії з гідрофобним доменом цього білка. Сформований потрібний комплекс кальцій – кальмодулін – фермент і реалізує специфічну ферментативну реакцію.

Після інкубації еритроцитів із похідними піролопиримидиндіонів активність індукцибельної форми практично дорівнює сумарній активності NOS і є незалежною від присутності іонів Ca^{2+} , оскільки у середовищі інкубації присутній EDTA. У цьому випадку і ендотеліальна форма як кальційзалежна не визначається (табл. 4).

Оскільки дослідження проводилися у модельній системі і вплив на процеси синтезу даного ферменту є виключений, варто припустити, що речовини № 2 та № 3 безпосередньо впливають на кальмодулін-зв'язувальний домен NOS, що робить цей фермент незалежним від присутності іонів металу в середовищі. Можна також припустити, що дія досліджуваних речовин може бути і опосередкованою – через вплив на гідروفобну ділянку кальційзв'язувального білка – кальмодуліну, що збільшує його спорідненість до ферменту і стабілізує активний комплекс, який не дисоціює за відсутності іонів Ca^{2+} у середовищі.

У зв'язку з тим, що утворення нітратів і нітритів тісно пов'язане з NO-синтазою активністю, нами проведено дослідження вмісту цих аніонів у гемолізатах крові (табл. 5).

Таблиця 5

Вміст нітратів і нітритів у гемолізатах еритроцитів
за дії тестованих речовин [$\text{нмоль} \cdot 10^{-2} \cdot (\text{мг білка})^{-1} \text{ M} \pm \text{m}$, n=5]

| Варіанти досліджу | Контроль | Речовина №1 | Речовина №2 | Речовина №3 |
|-------------------|-----------|-------------|-------------|-------------|
| Нітрати | 8,32±1,91 | 13,90±4,53 | 16,79±3,25* | 18,30±5,25 |
| Нітрити | 1,68±0,49 | 0,57±0,08* | 0,92±0,18 | 1,36±0,42 |

* – Різниця вірогідна щодо контролю $P \leq 0,05$.

Аналіз результатів свідчить, що за дії речовини № 2 спостерігається певна неузгодженість між вмістом нітратів і активністю NOS. Очевидно, зростання вмісту нітратів у цьому варіанті досліджу пов'язане не з генерацією NO^{\cdot} у процесі функціонування ферменту – NO-синтази, а унаслідок його вивільнення зі зв'язаної форми – нітрозопохідних і залізонітрозильних комплексів, у тому числі і з нітрозогемоглобіну.

Отримані результати дають підстави вважати, що спірокарбон із двома конденсованими ядрами та дві інші сполуки з конденсованими та роз'єднаними у просторі ядрами сприяють стабілізації еритроцитарних мембран, суттєво впливають на фізико-хімічні та функціональні властивості гемоглобіну, стан антиоксидантної системи, регулювання внутрішньоклітинних процесів через NO^{\cdot} та його деривати. Механізми взаємодії еритроцит – досліджувані синтезовані сполуки становлять інтерес і можуть бути розглянуті у подальших дослідженнях.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Артюхов В. Г. Гемопротеиды: закономерности фотохимических превращений в условиях различного микроокружения. Воронеж: ВГУ, 1995. 280 с.
2. Васильева Е. М. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии // Биомедицинская химия. 2005. Т. 51. Вып. 2. С. 118–126.
3. Дудок К. П., Федорович А. М., Дудок Т. Г. та ін. Вплив спірокарбону та похідних піролопиримидиндіонів на фізико-хімічні характеристики лігандних форм гемоглобіну *in vitro* // Біологічні студії / *Studia Biologica*. 2009. Т. 3. № 2. С. 23–34.
4. Ересько В. А., Речицький А. Н., Бойко Р. Т. и др. Синтез и фармакологические свойства 1,6-замещенных-4-арил-2,3,4,5,6,7-гексагидро-(1H)пирроло-[3,4-d] пиримидинонов-2,5 // Физиологически активные вещества. 1995. Вып. 26. С. 27–30.
5. Иванов Ю. Г. Модификация спектрофотометрического метода определения кислородно-диссоциационных кривых гемоглобина // Бюл. эксп. биол. и медицины. 1975. № 11. С. 122–125.

6. *Ильина Л. В., Вережка С. В.* Лигандиндуцированное структурирование полиреактивных иммуноглобулинов // Укр. біохім. журнал. 2003. Т. 75. № 6. С. 56–61.
7. *Казакова В. В., Елкина Н. М.* Окислительная модификация и изменения внутримолекулярной гидрофобности гемоглобина А при инкубации эритроцитов человека в среде Фентона // Укр. біохім. журнал. 2007. Т. 79. № 4. С. 35–38.
8. *Киселик І. О., Луцик М. Д., Шевченко Л. Ю.* Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології // Лаб. діагностика. 2001. № 3. С. 43–45.
9. *Королюк М. А., Иванова И. Г., Майорова И. Г.* и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–18.
10. *Кошелева В. Д., Бойко Р. Т., Ересько В. А.* Влияние спирокарбона на гипоталамо-гипофизарную нейросекреторную систему (ГГНС) растущих животных // Материалы Всеукр. науч.-практ. конф. (Херсон, 1994). С. 103.
11. *Мороз О. М., Дудок К. П.* Іонотранспортні системи та структурно-функціональний стан еритроцита у хворих на хронічний алкоголізм // X з'їзд ВУЛТ. „Укр. мед. вісті” (Євпаторія, 2009). Т. 1–4. С. 192–193.
12. *Речицький О. Н., Ересько В. А., Дудок К. П., Сибірна Н. О.* Дослідження впливу „спірокарбону” на структурно-функціональний стан еритроцитарних мембран периферичної крові здорових людей та хворих на алкоголізм // Теорія і практика сучасного природознавства: матеріали III Всеукр. наук.-практ. конф. (Херсон, 2007). С. 47–52.
13. *Речицький О. Н., Пилипчик Л. Л., Косяк Т. А., Єзіков В. І.* Дослідження на рослинних об'єктах росту регулюючої активності спірокарбону та його похідних // Чорноморський бот. журнал. 2010. Т. 6. № 1. С. 89–94.
14. *Сибірна Н. О., Люта М. Я., Климишин Н. І.* Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах // Біологічні студії / Studia Biologica. 2010. Т. 4. № 1. С. 143–160.
15. *Старикович Л. С., Дудок К. П., Сибірна Н. О.* та ін. Дослідження впливу спірокарбону на фізико-хімічні й біохімічні характеристики еритроцитів щурів у нормі та за алкогольної інтоксикації // Медична хімія. 2009. Т. 11. № 1. С. 58–62.
16. *Сумбаев В. В., Ясинская И. М.* Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс // Совр. пробл. токсикологии. 2000. Т. 3. С. 3–5.
17. *Терсков И. А., Гительзон И. И.* Метод химических (кислотных) эритрограмм // Биофизика. 1954. Т. 11. Вып. 2. С. 259–266.
18. *Чувилін Ф. Т., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П.* Аллостерические регуляторы обратимой оксигенации гемоглобина // Биоорг. химия. 1990. 16 (9). С. 1157–1176.
19. *Bringold U., Ghafourifar P., Richter C.* Peroxynitrite formed by mitochondrial NO synthase promotes mitochondrial Ca²⁺ release // Free Radic. Biol. Med. 2000. N 3–4. P. 343–348.
20. *Dudok K., Dudok T., Vlokh I.* et al. **Optical Spectra of Hemoglobin Taken from Alcohol Dependent Humans** // Ukr. J. Phys. Opt. 2005. Vol. 6. N 4. P. 142–145.
21. *Ghafourifa P., Cadenas E.* Mitochondrial nitric oxide synthase // Trends in Pharmacological Sciences. 2005. Vol. 26. Issue 4. P. 190–195.
22. *Perutz M. F.* Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron // Ann. Rev. Biochem. 1979. Vol. 48. P. 327–386.

Стаття: надійшла до редакції 31.08.12

доопрацьована 12.11.12

прийнята до друку 13.11.12

ROLE OF PYRROLOPYRIMIDINEDIONS DERIVATIVES IN THE REGULATION OF HEMOGLOBIN PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS AND HUMAN BLOOD ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY *IN VITRO*

K. Dudok¹, L. Starykovych¹, A. Rechytskyi², A. Shkavolyak³, N. Sybirna¹

¹*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine*

²*Kherson State University
27, 40 Years of October St., Kherson 73002, Ukraine*

³*Danylo Halytsky National Medical University
69, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine*

The effect of spirocarbon and pyrrolopyrimidinedione derivatives (substance № 1, 2, 3) on the stability of erythrocyte membrane, hemoglobin affinity for oxygen, catalase activity, activity of total, inducible and endothelial NOS, content of nitrites and nitrates in red blood cells hemolysate from healthy donors *in vitro* was examined. It was testified that that after one- and 24-hour incubation of erythrocytes with solutions of substances N 1 increased erythrocytes acid hemolytic resistance. Duration of maximum and total hemolysis significantly increases It was shown that spirocarbon and pyrrolopyrimidinedione derivatives increase hemoglobin affinity for oxygen, as evidenced by the reduction in P₅₀ parameter. In the experiment conditions showed a reduction in erythrocytes hemolysate catalase activity. Incubation of erythrocytes with substance №3 leads to increased inducible NOS activity, substance № 2 leads to reduced total NOS activity and increased total nitrates. Nitrite content decreased by incubation with substance № 1. Discusses mechanisms of pyrrolopyrimidinedione derivatives action on the structure of erythrocyte membranes, antioxidant enzyme activity and the hemoglobin affinity for oxygen.

Keywords: spirocarbon, pyrrolopyrimidinedione derivatives, erythrocytes, hemoglobin, oxygenation, catalase, NOS, nitrites, nitrates.

РОЛЬ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛОПИРИМИДИНДИОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ГЕМОГЛОБИНА И АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ КРОВИ ЛЮДЕЙ *IN VITRO*

Е. Дудок¹, Л. Старикович¹, А. Речицкий², А. Шкаволяк³, Н. Сибирная¹

¹*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина*

²*Херсонский государственный университет
ул. 40 лет Октября, 27, Херсон 73002, Украина*

³*Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого
ул. Пекарская, 69, Львов 79010, Украина*

Исследовали влияние спирокарбона и производных пирролопиримидиндионов (вещества № 1, № 2, № 3) на стабильность мембран эритроцитов, сродство гемоглобина к кислороду, каталазную активность, активность суммарной, индуцибельной и эндотелиальной NO-синтазы (NOS), содержание нитритов и нитратов в гемолизатах эритроцитов крови здоровых доноров *in vitro*. Установлено, что после одно- и 24-ча-

совой инкубации эритроцитов с растворами соединений № 1, № 2 и № 3 стойкость эритроцитов к кислотному гемолизу возрастает. Показано также, что исследуемые соединения влияют на сродство гемоглобина к кислороду, о чем свидетельствует снижение параметра P_{50} . В условиях эксперимента выявлено снижение каталазной активности в гемолізатах эритроцитов. Инкубация эритроцитов с соединением № 3 способствует повышению активности индуцибельной NOS, а с соединением № 2 – снижению активности суммарной NOS и **повышению содержания нитратов**. Содержание нитритов снижается после инкубации эритроцитов с соединением № 1.

Ключевые слова: спирокарбон, производные пирролопиримидиндионов, эритроциты, гемоглобин, оксигенация, каталаза, NOS, нитриты, нитраты.