

УДК 577.322.7; 577.325.3

О ВКЛАДЕ ПРЯМОГО И КОСВЕННОГО ДЕЙСТВИЯ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ В ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОСНОВНЫХ ЛИГАНДНЫХ ФОРМ ГЕМОГЛОБИНА В РАСТВОРЕ

© 2003 г. В.Г. Артюхов, И.А. Лавриненко, Г.А. Вашанов

Воронежский государственный университет

Установлено, что разбавление растворов гемоглобина до 5×10^{-6} моль/л не вызывает существенного (тестируемого данным методом) накопления димеров оксиформы гембелка в образцах, однако сопровождается «внутренним напряжением» в областях контактов субъединиц тетрамера. При воздействии УФ-света, одним из основных акцепторов которого являются области субъединичных контактов [8], реализуются дефекты системы связей димеров типа $\alpha\beta$, что приводит к диссоциации, носящей, по-видимому, кооперативный характер.

Предложена математическая модель, описывающая вклад прямого и опосредованного действия УФ-излучения на растворы гембелка.

Для гемоглобина в условиях *in vivo* характерна гетерогенность лигандных форм, обусловленная одновременным присутствием, в первую очередь, окси- (HbO_2), дезокси- (Hb) и метгемоглобина (MtHb). Их соотношение существенно меняется как при протекании патологических процессов в организме, так и различных экзогенных воздействиях. Поэтому определение содержания этих форм в крови может служить одним из важных тестов для клинической биохимии.

С другой стороны, в связи широким внедрением в клиническую практику метода аутоотрансфузии УФ-облученной крови (АУФОК), активным развитием новых технологий и освоением космического пространства все большую практическую и теоретическую значимость приобретают исследования механизмов воздействия ультрафиолетового излучения на биологические системы. Так, известно, что при воздействии УФ-квантов изменяется соотношение в образцах HbO_2 , Hb и MtHb (В.Г. Артюхов, 1995). Однако, до настоящего времени дискутируется вопрос о вкладе прямого и косвенного действия в фотомодификацию биосистем. Исходя из вышеизложенного, нами оценен вклад каждого из этих путей в изменение содержания основных лигандных форм гемоглобина в растворе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гемоглобин выделяли из крови взрослых доноров по методу Драбкина [1] с модификацией Блюменфельда [2]. В работе использовали растворы гем-

белка в концентрациях 5×10^{-4} ; 5×10^{-5} и 5×10^{-6} моль/л в 0,01 моль/л Na фосфатном буфере (рН 7,4). Определение процентного содержания лигандных форм гемоглобина осуществляли, используя эмпирическую систему уравнений [3], основанную на значениях оптической плотности растворов гемоглобина при 577, 569 и 500 нм.

УФ-облучение образцов проводили с помощью ртутно кварцевой лампы типа ДРТ-400 в термостатируемой кювете при 20 °С при непрерывном перемешивании. Расстояние от кюветы до оси лампы составляло 23 см. Для выделения необходимой составляющей ультрафиолетовой части спектра излучения лампы (240-400 нм) использовали светофильтр УФС-1. Интенсивность облучения составляла 151 Дж/м² в 1 мин. Облучение растворов белка проводили в течение 10 мин.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием t-критерия при уровне значимости 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из данных, приведенных на рис. 1а, снижение концентрации гемоглобина в использованном нами диапазоне не вызывает статистически достоверных отличий в относительном содержании оксигемоглобина, которое составляет, соответственно, $77,33 \pm 0,29$; $77,12 \pm 0,38$ и $77,39 \pm 0,67\%$ при 5×10^{-4} ; 5×10^{-5} и 5×10^{-6} моль/л.

Высоким уровнем в крови характеризуется дезоксиформа гембелка. При уменьшении кон-

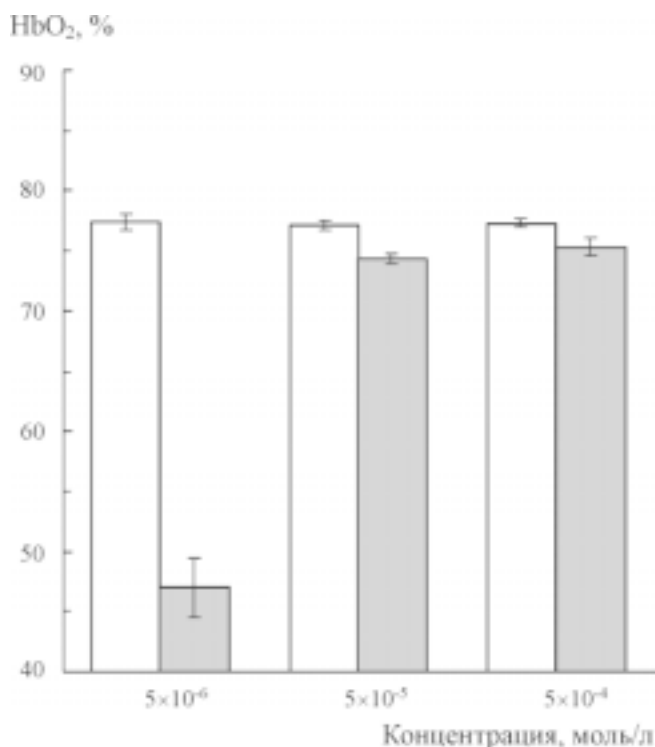


Рис. 1. Изменение содержания оксиформы в растворах гемоглобина разных концентраций:

□ — контроль (а);
 ■ — после УФ-облучения в дозе 1510 Дж/м²(б).

центрации гемоглобина в растворах, как и в случае с HbO₂, нами не выявлено существенного изменения содержания Hb (рис. 2а), которое составляет $20,99 \pm 0,36$; $21,09 \pm 0,33$ и $20,57 \pm 0,26\%$.

В процессе функционирования эритроцитарной клетки образуется окисленная форма гемоглобина – метгемоглобин. В обычных (физиологических) условиях ее содержание в крови незначительно (<1%). Однако, при протекании целого ряда патологических процессов, при внешних воздействиях на организм содержание МтНб может существенно нарастать и достигать 10%. Накопление метформы наблюдается и в водных растворах гембелка, в первую очередь за счет аутоокисления его восстановленных форм [4].

Нами выявлено (рис. 3а) незначительное увеличение относительного содержания МтНб в образцах гемоглобина с $1,68 \pm 0,09$ и $1,80 \pm 0,10\%$ (5×10^{-4} и 5×10^{-5} моль/л) до $2,04 \pm 0,12\%$ при 5×10^{-6} моль/л. Представленные данные демонстрируют, что образование метгемоглобина в указанных условиях осуществляется из функционально активных форм гембелка (HbO₂ и Hb).

УФ-облучение в дозе 1510 Дж/м² растворов гемоглобина (рис. 1б) с концентрациями 5×10^{-4} и 5×10^{-5} моль/л индуцирует небольшое снижение содержания оксигемоглобина по сравнению с

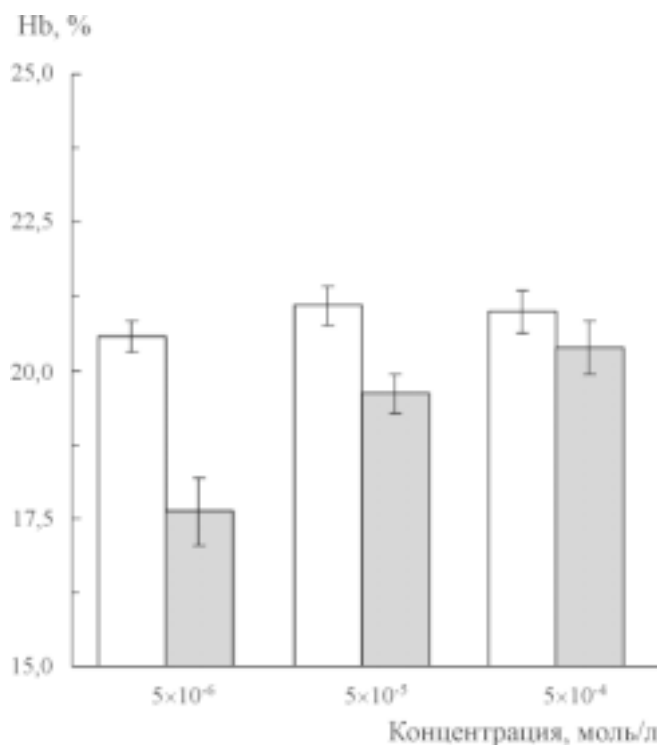


Рис. 2. Изменение содержания дезоксиформы в растворах гемоглобина разных концентраций:

□ — контроль (а);
 ■ — после УФ-облучения в дозе 1510 Дж/м²(б).

необлученными образцами до $75,32 \pm 0,74$ и $74,32 \pm 0,41\%$ соответственно (на 2,01 и 2,80%). Однако, в случае минимальной из использованных концентраций (5×10^{-6} моль/л) фотомодификация белка приводит к резкому уменьшению содержания HbO₂ до $47,00 \pm 2,48\%$ (на 30,39%).

Известно [5], что снижение концентрации гемоглобина в водных растворах до $\leq 10^{-6}$ моль/л вызывает существенное смещение равновесия реакции диссоциации тетрамеров в сторону низкомолекулярных компонентов (димеров). С другой стороны, растворы димеров гемоглобина характеризуются изменением величин $\lambda_{\max}$ во всех основных максимумах поглощения, по отношению к тетрамерам [6, 7]. На основании этих представлений можно предположить, что разбавление растворов гемоглобина до 5×10^{-6} моль/л не вызывает существенного (тестируемого данным методом) накопления димеров оксиформы гембелка в образцах, однако сопровождается «внутренним напряжением» в областях контактов субъединиц тетрамера. При воздействии УФ-света, одним из основных акцепторов которого являются области субъединичных контактов [8], реализуются дефекты системы связей димеров типа $\alpha\beta$, что приводит к диссоциации, носящей, по-видимому, кооперативный характер.

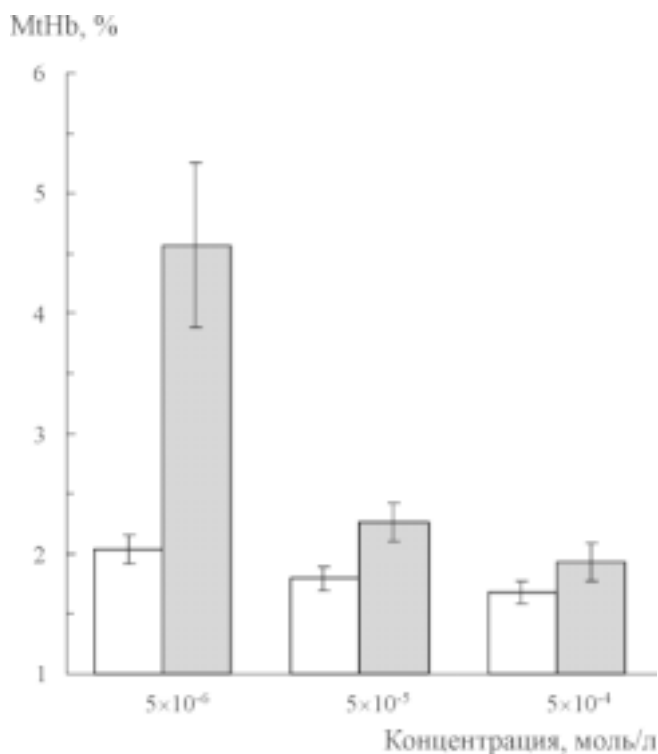


Рис. 3. Изменение содержания метформина в растворах гемоглобина разных концентраций:

□ — контроль (а);
 ■ — после УФ-облучения в дозе 1510 Дж/м²(б).

Как следует из данных рис. 2б, УФ-облучение растворов гемоглобина также приводит к уменьшению содержания дезоксигемоглобина по отношению к контролю при концентрациях 5×10^{-5} и 5×10^{-6} моль/л до $19,61 \pm 0,33$ и $17,61 \pm 0,57\%$ (на 1,48 и 2,96% соответственно). При максимальной концентрации гембелка статистически достоверных отличий в количестве Нб не выявлено ($20,39 \pm 0,44\%$).

Как было показано ранее [4], УФ-излучение значительно ускоряет процессы окисления молекул гемоглобина до метформина. В ходе наших экспериментов при концентрации белка 5×10^{-4} моль/л не выявлено статистически достоверных отличий содержания MtHb по сравнению с контролем. Содержание метгемоглобина при этом составило $1,93 \pm 0,16\%$. Снижение концентрации гемоглобина в УФ-облученных растворах до 5×10^{-5} и 5×10^{-6} моль/л индуцирует увеличение количества метформина до $2,26 \pm 0,15$ и $4,57 \pm 0,68\%$ соответственно, то есть на 0,46 и 2,53%.

Из данных, представленных на рис. 4, следует, что в растворах гемоглобина с концентрацией 5×10^{-4} моль/л и 5×10^{-5} моль/л выявляется незначительное снижение общего содержания гембелка после УФ-облучения до $97,64 \pm 0,85$ и $96,19 \pm 0,64\%$ соответственно. В случае минимальной из использованных концентраций, как и в случае с НbO₂, наблюдается резкое уменьшение содержания бел-

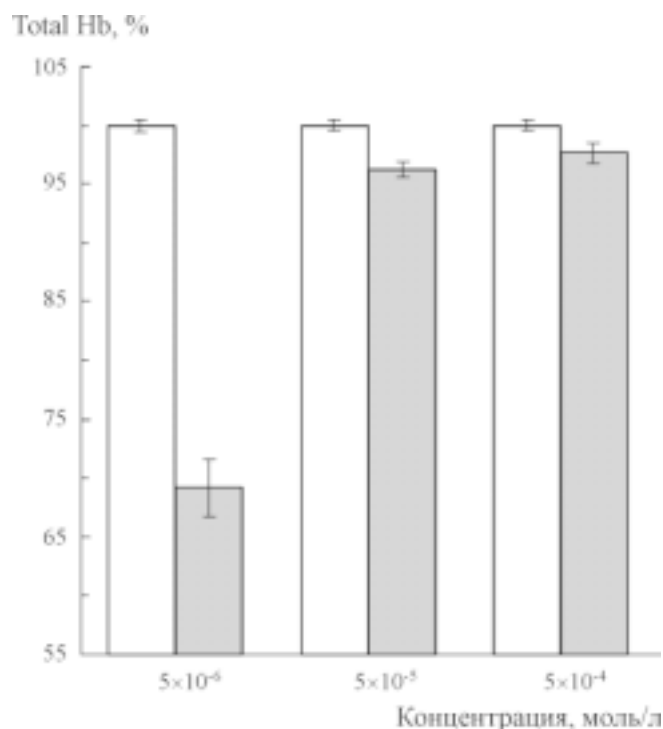


Рис. 4. Изменение общего содержания гемоглобина в растворах гембелка разных концентраций:

□ — контроль (а);
 ■ — после УФ-облучения в дозе 1510 Дж/м²(б).

ка (до $69,18 \pm 2,50\%$). Степень это уменьшения дает основание предполагать, что выявленные изменения связаны, в первую очередь, с модификацией оксиформы гембелка.

Таким образом, существенное уменьшение содержания НbO₂ и Нб при УФ-облучении не может быть объяснено только их фотоокислением. Полученные данные можно интерпретировать за счет накопления диссоциированных (димерных) форм гемоглобина в образцах. Не исключена также возможность их последующей реассоциации с формированием тетрамеров, включающих в свой состав атомы железа Fe(II) и Fe(III) – гибридов валентности [9]. Кроме того, полученные результаты дают основание полагать, что в случае использования низких концентраций гембелка (5×10^{-6} моль/л) значительное снижение содержания оксигемоглобина обусловлено, в первую очередь, косвенным действием УФ-света, поскольку в ходе экспериментов не выявлено пропорционального изменения соотношения основных лигандных форм гембелка (табл. 1).

С целью проверки данного предположения нами оценен вклад прямого и косвенного действия излучения в фотомодификацию растворов гемоглобина.

Изменение соотношения лигандных форм гемоглобина после воздействия УФ-света (240-400 нм) в дозе 1510 Дж/м²

Концентрация белка, моль/л	HbO ₂	Hb	MtHb
5×10^{-6}	67,94±3,58	25,46±0,82	6,60±0,89
5×10^{-5}	77,26±0,43	20,39±0,43	2,35±0,16
5×10^{-4}	77,15±0,76	20,88±0,45	1,98±0,17

Примечание – для каждого образца суммарное содержание лигандных форм составляет 100%

Известно [10], что величина степени повреждения белка при прямом действии радиации характеризуется линейной зависимостью:

$$y = kx, \quad (1)$$

где x – исходное число молекул; y – количество модифицированных молекул; k – квантовый выход фотоокисления.

Величина степени повреждения белка при косвенном действии УФ-излучения будет характеризоваться уравнением с одной константой:

$$y = b, \quad (2)$$

где b – количество радикалов в системе в заданных условиях. В данном случае зависимость является также линейной, но не зависит от аргумента функции.

Относительная степень фотомодификации молекул при прямом действии УФ-света уравнение имеет вид:

$$g = k, \quad (3)$$

где g – относительное количество модифицированных молекул.

Зависимость относительной величины поврежденных молекул белка при косвенном действии УФ-излучения представляет собой гиперболическую функцию:

$$g = bx^{-1}. \quad (4)$$

В условиях проведения эксперимента модификация макромолекул по механизму только прямого или только косвенного действия является маловероятным, то есть имеет место алгебраическая сумма этих видов повреждений. В этом случае, для определения содержания модифициро-

ванных молекул получаем уравнение вида:

$$y = kx + b. \quad (5)$$

Относительная доля модифицированных молекул оценивается из следующего соотношения:

$$g = bx^{-1} + k. \quad (6)$$

Уравнения для определения доли прямого и косвенного действия излучения (5) и (6) справедливы, если слагаемые являются аддитивными величинами.

Так как в исследуемом образце гемоглобина содержится определенное количество различных лигандных форм, то для корректного расчета степени изменения последних необходимо в уравнение ввести константу, представляющую собой контрольную величину содержания одной из лигандных форм гембелка.

Учитывая, что содержание исходных (пул лигандных форм), контрольных и модифицированных (одна из лигандных форм) молекул гемоглобина есть концентрация, получаем уравнение для определения содержания лигандных форм гемоглобина:

$$y = kc_0 + b + c, \quad (7)$$

где c_0 – концентрация гемоглобина в контроле; c – концентрация лигандной формы белка в контроле.

Аналогично этому уравнение для определения относительной доли модифицированных молекул принимает вид:

$$g = bc_0^{-1} + k + z, \quad (8)$$

где z – относительная концентрация лигандной формы белка в контроле.

Для вычисления роли прямого и косвенного действия УФ-света в фотомодификации лиганд-

Доля прямого действия УФ-излучения (240-400 нм) в изменении содержания лигандных форм гемоглобина

Концентрация белка, моль/л	HbO ₂	Hb	MtHb	Hb _{total}
5×10^{-6}	5,90	18,54	8,76	6,88
5×10^{-5}	64,04	37,14	47,55	55,63
5×10^{-4}	89,47	91,17	90,28	89,82

ных форм белка мы использовали систему линейных уравнений (7). Результаты вычислений представлены в табл. 2.

Как следует из представленных данных, при увеличении концентрации гембелка в растворе возрастает роль прямого действия излучения. При этом выявляется различная степень устойчивости к воздействию УФ-излучения для изучаемых лигандных форм гемоглобина. При минимальной из использованных концентраций гембелка наименее устойчивой к прямому действию УФ-света оказывается дезоксиформа, что не противоречит литературным данным [11]. Рост содержания гемоглобина в образцах приводит к увеличению центров поглощения УФ-квантов. Поэтому возрастает роль HbO_2 как основного компонента гетерогенной системы (и MtHb как продукта его фотоокисления) в прямом поглощении энергии ультрафиолетового излучения.

Для проверки предположения о возможности фотодиссоциации тетрамеров и о большей фоточувствительности димеров нами была определена степень соответствия между теоретическими ожидаемыми на основании предложенной нами модели и экспериментальными значениями содержания различных лигандных форм гемоглобина. Так, если с уменьшением концентрации гемоглобина в растворах не будет увеличиваться разница между теоретической величиной и экспериментальной, то устойчивость димерных и тетрамерных форм по отношению к действию УФ-света будет одинаковой. Если экспериментальная величина будет превышать теоретическую, то это говорит о более высокой устойчивости молекул димеров по отношению к тетрамерам и наоборот.

Для определения изменения содержания лиган-

дных форм гемоглобина, мы использовали уравнение (8), эмпирические коэффициенты для которого были вычислены из экспериментальных данных по методу регрессионного анализа:

$$\text{HbO}_2\% = -4,48 \times 10^{-5} \times c_0^{-1,08} - 1,80 + z, \quad (9)$$

$$\text{Hb}\% = -1,31 \times 10^{-4} \times c_0^{-0,84} - 5,48 \times 10^{-1} + z, \quad (10)$$

$$\text{MtHb}\% = 1,22 \times 10^{-5} \times c_0^{-1,00} + 2,22 \times 10^{-1} + z, \quad (11)$$

$$\text{Hb}_{\text{total}}\% = -7,33 \times 10^{-5} \times c_0^{-1,05} - 2,12 + z, \quad (12)$$

где $\text{HbO}_2\%$; $\text{Hb}\%$; $\text{MtHb}\%$ и $\text{Hb}_{\text{total}}\%$ – содержание лигандных форм и суммарного гемоглобина в процентах; c_0 – концентрация гемоглобина (моль/л); z – содержания лигандных форм или суммарного гемоглобина (в процентах) в контрольном образце.

Результаты оценки соответствия теоретических и экспериментальных величин приведены в табл. 3.

Как следует из приведенных данных, для оксигемоглобина отмечено снижение его содержания относительно теоретической величины при 5×10^{-6} моль/л, что может быть объяснено смещением равновесия в сторону образования димерных форм, обладающих большей фоточувствительностью по сравнению с тетрамерами. Кроме того, незначительное увеличение доли дезоксигемоглобина (5×10^{-6} моль/л), вероятно, связано со смещением динамического равновесия в системе окси-дезоксиформа в сторону последнего. При концентрации гемоглобина 5×10^{-5} моль/л отмечено слабо выраженное увеличение содержания оксигемоглобина относительно теоретической величины. Вместе с тем, в этих условиях наблюдается снижение дезоксиформы белка, что, по видимому, связано с УФ-индуцированной оксигенацией гембелка [4].

Разница, полученная между теоретической и экспериментальной величинами для суммарного

Таблица 3

Образец	C, моль/л	Теоретическая величина, %	Опытная величина, %
HbO_2	5×10^{-6}	54,72	47,00
	5×10^{-5}	73,45	74,32
	5×10^{-4}	75,38	75,32
Hb	5×10^{-6}	16,74	17,61
	5×10^{-5}	20,03	19,61
	5×10^{-4}	20,37	20,39
MtHb	5×10^{-6}	4,58	4,57
	5×10^{-5}	2,26	2,26
	5×10^{-4}	1,93	1,93
Hb_{total}	5×10^{-6}	73,58	69,18
	5×10^{-5}	95,56	96,19
	5×10^{-4}	97,68	97,64

гемоглобина, подтверждает предположение о том, что при уменьшении концентрации гембелка в растворе УФ-облучение индуцирует диссоциацию тетрамерных форм на димеры, обладающих большей фоточувствительностью.

Таким образом, представленные данные показывают, что процесс фотомодификации растворов гемоглобина формально может быть описан той же системой уравнений, что и при воздействии ионизирующей радиации. Установлено, что косвенное воздействие УФ-света на содержание лигандных форм гемоглобина в растворе является преобладающим при низких концентрациях гембелка в растворе (5×10^{-6} моль/л). Увеличение содержания гембелка в образцах способствует возрастанию роли прямого поглощения УФ-квантов его хромофорами. Следовательно, вклад каждого из путей фотомодификации должен оцениваться как функция от концентрации гемоглобина в растворе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drabkin D. The crystallographic and optical properties of haemoglobin of man in comparison with those of other species // *J. Biol. Chem.* — 1947. — Vol. 164, № 2. — P. 703–723.
2. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода. — М.: Советская наука, 1957. — 140 с.
3. A multi-wavelength spectrophotometric method for the simultaneous determination of five haemoglobin derivatives / A. Zwart, A. Buursma, E.J. van Kampen et al. // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* — 1981. — Vol. 19, № 7. P. 457–463.
4. Артюхов В.Г. Гемопротеиды: закономерности фотохимических превращений в условиях различного микроокружения. — Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 1995. — 280 с.
5. Рифкинд Д.М. Гемоглобин и миоглобин // *Неорганическая биохимия* / Под ред. Г. Эйхгорна. — М.: Мир, 1978. — Т. 2. — С. 256–338.
6. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. — М.: Мир, 1985. — Т. 3. — 536 с.
7. Козлова И.Е. УФ-чувствительность молекул гемоглобина с различным субъединичным составом: Дисс. ... канд. биол. наук. — Воронеж, 2000. — 152 с.
8. Олигомерные белки: структурно-функциональные модификации и роль субъединичных контактов / В.Г. Артюхов, О.В. Башарина, Г.А. Вашанов и др. — Воронеж: Изд-во Воронежского ун-та, 1997. — 264 с.
9. Артюхов В.Г., Вашанов Г.А., Козлова И.Е. УФ-чувствительность димеров гемоглобина в свободном состоянии и в составе гибридов валентности: модификация серотонином // *Радиационная биология. Радиоэкология.* — 2001. — Т. 41, № 2. — С. 190–194.
10. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных. — М: Высш. шк., 1988. — 424 с.
11. Bolton W., Perutz M.F. Three dimensional fourier synthesis of horse desoxyhaemoglobin at 2,8 Å resolution // *Nature.* — 1970. — Vol. 228, № 5271. — P. 551–552.