

УДК 577.32

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ ФРАКЦИЙ НАТИВНОГО И УФ-ОБЛУЧЕННОГО НИТРОЗОГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ

© 2004 г. Е.А. Калаева, В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева

*Воронежский государственный университет*

NO легко образует комплексы с гемоглобином. Однако особенности конформационного состояния комплекса “гемоглобин-оксид азота”, его физико-химические свойства, пути превращения при воздействии различных факторов внешней среды остаются малоизученными. Гель-хроматография позволяет исследовать третичную и четвертичную структуры молекул, процессы ассоциации-диссоциации белковых комплексов, изменения их конформации при воздействии внешних агентов.

Ранее нами было показано, что образцы нативного и УФ-модифицированного HbNO разделялись на 4 гемсодержащие белковые электрофоретические фракции. Каждая из фракций была представлена компактными димерами с молекулярной массой  $29,3 \pm 2,8$ ;  $27,9 \pm 0,8$ ;  $27,1 \pm 1,3$  и  $30,6 \pm 1,3$  кДа соответственно. Наиболее чувствительной к действию УФ-света оказалась 1-ая электрофоретическая фракция: малая доза ( $453 \text{ Дж/м}^2$ ) индуцировала диссоциацию димеров в составе указанной фракции на мономеры с молекулярной массой  $17,4 \pm 1,2$  кДа, а большие дозы ( $906\text{--}2265 \text{ Дж/м}^2$ ) – снижение молекулярной массы мономеров до  $13,0 \pm 0,3$  –  $13,5 \pm 0,5$  кДа. Менее фотолabile были молекулы 2-ой электрофоретической фракции: увеличение их кажущейся молекулярной массы до  $35,9 \pm 1,7$  –  $42,7 \pm 0,8$  кДа наблюдалось только после облучения большими дозами ( $1359\text{--}4530 \text{ Дж/м}^2$ ). Молекулярная масса HbNO в составе 3-ей и 4-ой электрофоретических фракций не изменялась после воздействия всех используемых нами доз УФ-радиации.

Таким образом, весьма близкие по молекулярным массам димерные фракции HbNO обладают различной степенью прочности межсубъединичных контактов и, как следствие этого, различной чувствительностью к воздействию интегрального потока УФ-излучения.

### ВВЕДЕНИЕ

Биологическое действие оксида азота (NO), ранее известного лишь как токсическое соединение, всесторонне исследуется в течение последних 10–15 лет. Известно, что он является одним из универсальных регуляторов метаболизма, компонентом системы иммунитета и т.д. Обладая высоким сродством к 2-валентному гемовому железу, NO легко образует комплексы с гемоглобином. Нитрозогемоглобин может служить основным переносчиком NO от мест образования к биологическим мишеням [1]. Фармакологическое действие ряда нитрат- и нитритсодержащих лекарственных препаратов основано на их способности генерировать NO. Транспорт такого экзогенного оксида азота также осуществляется гемоглобином.

Периферические эффекты NO: блокада агрегации тромбоцитов, расширение сосудов и др. [2, 3], могут быть обусловлены фотодиссоциацией комплексов HbNO [4]. Однако процессы с участием оксида азота в биосистемах, подвергнутых воздействию физических

факторов внешней среды, в том числе УФ-света от естественных и искусственных источников, остаются практически неизученными; недостаточно полно определены пути превращения комплексов белок-лиганд при этих воздействиях. Принимая во внимание усиливающуюся роль коротко- и средневолнового УФ-излучения в формировании антропогенной нагрузки на окружающую среду, а также широкое использование в клинической практике метода ауто-трансфузии УФ-облученной крови (АУФОК) и других видов фототерапии, становится понятной необходимость проведения подобного рода исследований.

Загрязнение атмосферного воздуха относится к числу важнейших факторов ухудшения здоровья населения. По итогам 1997–1999 г.г. одними из приоритетных загрязнителей воздуха населенных пунктов г. Воронежа и Воронежской области являлись оксид углерода и оксид азота [5, 6]. Экзогенный NO, помимо острых и хронических отравлений, способствует развитию заболеваний дыхательной, сердеч-

но-сосудистой, нервной и др. систем, особенно у лиц, постоянно подвергающихся воздействию указанного вещества (водители автотранспорта, работники автостоянок, инспектора ГИБДД), даже в случае незначительного превышения ПДК. Таким образом, исследование физико-химических свойств нитрозогемоглобина человека, выяснение влияния УФ-света на высшие типы пространственной организации молекул HbNO человека имеет важное теоретическое и практическое значение.

Гель-хроматография относится к числу методов, которые позволяют исследовать третичную и четвертичную структуры молекул, процессы ассоциации-диссоциации белковых веществ, изменения их конформации при воздействии внешних агентов, поэтому этот метод и стал главным в нашей работе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оксигемоглобин выделяли из эритроцитов доноров в день взятия крови методом [7] с модификациями [8], в основе которого лежит осмотический гемолиз эритроцитов.

В опытах использовали растворы белка с концентрацией  $1 \cdot 10^{-4}$  Моль/л, которая определялась спектрофотометрическим способом.

Оксигемоглобин переводили в нитрозоформу, применяя в качестве донора оксида азота нитрозосцистеин (Cys-NO), который получали по методу, описанному в работе [9]. Для этого на влажном льду смешивали эквимольные количества L-цистеина и нитрита натрия ( $\text{NaNO}_2$ ), затем добавляли 0,5 н соляную кислоту; при этом раствор приобретал красную окраску и максимумы поглощения при 340 и 540 нм. Раствор Cys-NO хранили в темноте на льду не более 1 часа и непосредственно перед использованием нейтрализовали гидроксидом натрия (NaOH). В колбу с боковым отростком вносили 1,5 мл раствора HbO<sub>2</sub>, в боковой отросток – 0,7 мл раствора Cys-NO (0,1 Моль/л). Содержимое колбы вакуумировали в течение 20 мин, снижая давление до  $10^{-4}$  мм рт. ст. После этого к раствору образовавшегося дезоксигенированного гемопротейда приливали Cys-NO и инкубировали смесь при вакуумировании 10 мин. От избытка несвязавшихся молекул Cys-NO избавлялись, пропуская раствор гембелка через хроматографическую колонку (высота – 70 мм, диаметр – 10 мм), упакованную сефадексом G-25 (“Pharmacia”, Швеция) и уравновешенную Na-фосфатным буфером (0,1 Моль/л, pH 7,4). Образование нитрозогемоглобина контролировали спектрофотометрически по наличию характерных максимумов поглощения (418, 545 и 575 нм).

Растворы гембелка в объеме 3 мл облучали све-

том ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 в термостатируемой кювете ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) на расстоянии 23 см от оси лампы при постоянном перемешивании магнитной мешалкой. Интегральный поток УФ-излучения выделяли с помощью светофильтра УФС-1 (полоса пропускания – 240-390 нм). Интенсивность облучения составляла 151 Дж/м<sup>2</sup>. Время экспозиции – 1, 3, 6, 9, 15 и 30 мин, что соответствовало дозам облучения 151, 453, 906, 1359, 2265 и 4530 Дж/м<sup>2</sup>.

Нитрозогемоглобин подвергали вертикальному диск-электрофорезу в полиакриламидном геле (ПААГ), используя установку фирмы “Reanal” (Венгрия). В экспериментах применяли 5,5%-ный концентрирующий и 7%-ный разделяющий ПААГ и трис-глициновый электродный буфер, pH 8,3.

Для исследования хроматографических характеристик фракций белка, разделившихся в процессе электрофореза, их вырезали из трубочек геля и экстрагировали в 2,5 мл натрий-фосфатного буфера в течение 18-20 часов.

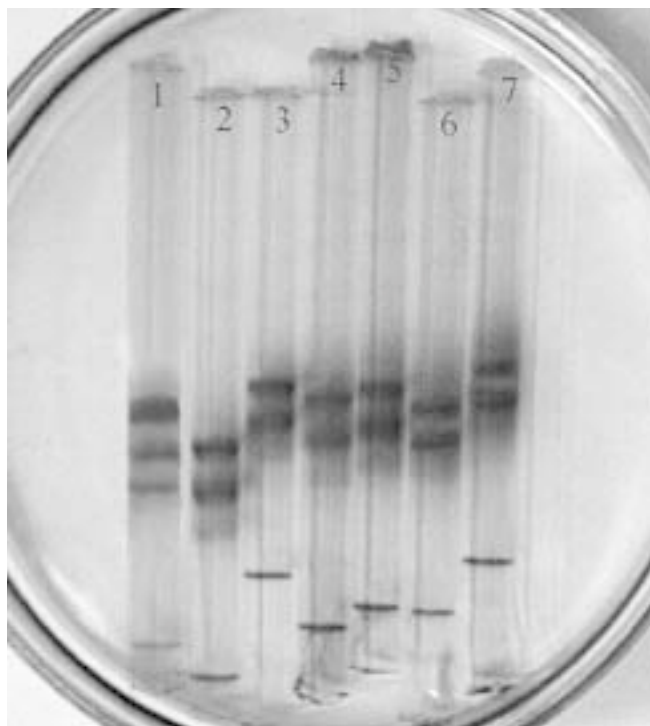
Гель-фильтрацию образцов электрофоретических фракций нитрозогемоглобина проводили по методу [10]. Колонку высотой 50 см и диаметром 1 см упаковывали сефадексом G-100 и уравнивали натрий-фосфатным буфером, pH 7,4. На колонку наносили по 1 мл исследуемого раствора. Скорость элюции белка составляла 1 мл за 5 мин. Элюат собирали порциями по 3 мл в пробирки. Наличие белка во фракциях определяли на спектрофотометре СФ-46, измеряя оптическую плотность элюата при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения ароматических аминокислот и полосы Core. Находили пробы с наибольшим содержанием белка и вычисляли объемы их выхода. На основании этих результатов строили элюционные кривые, которые дают информацию о количестве фракций и характере их распределения.

Для расчета кажущихся молекулярных масс нативных и УФ-облученных образцов HbNO определяли объемы их выхода из хроматографической колонки и по линейной зависимости объемов выхода белков-метчиков от логарифма их молекулярных масс находили указанные величины по калибровочной прямой.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных статистических программ “Stadia”. Достоверность различий контрольных и опытных значений определяли по t-критерию Стьюдента при 95%-ном уровне значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано [11], что образцы нативного HbNO разделялись на 4 гемсодержащие бел-



**Рис. 1.** Электрофореграммы нативного и УФ-облученного нитрозогемоглобина человека. Обозначения: 1 – нативный HbNO; 2 – облучение в дозе 151 Дж/м<sup>2</sup>; 3 – облучение в дозе 453 Дж/м<sup>2</sup>; 4 – облучение в дозе 906 Дж/м<sup>2</sup>; 5 – облучение в дозе 1359 Дж/м<sup>2</sup>; 6 – облучение в дозе 2265 Дж/м<sup>2</sup>; 7 – облучение в дозе 4530 Дж/м<sup>2</sup>.

ковые электрофоретические фракции (рис. 1). УФ-облучение в дозах 151-4530 Дж/м<sup>2</sup> не вызывало изменения фракционного состава HbNO.

Образцы каждой электрофоретической фракции HbNO элюировали с хроматографической колонки

одной фракцией с молекулярной массой 29,3±2,8; 27,9±0,8; 27,1±1,3 и 30,6±1,3 кДа соответственно. Это означает, что молекулы в составе всех электрофоретических фракций были представлены компактными димерами. Следовательно, в условиях эксперимента происходило ослабление субъединичных контактов и диссоциация тетрамеров HbNO. Вероятно, это связано с изменениями третичной структуры белка, вызванными присоединением NO, сродство которого к железу гема очень высоко. Прочная связь гем-лиганд вызывает конформационные перестройки активного центра молекул гемопротейда, что может приводить к ослаблению межсубъединичных взаимодействий (контактов).

УФ-облучение в дозе 151 Дж/м<sup>2</sup> не приводило к изменению кажущихся молекулярных масс электрофоретических фракций исследуемого гемопротейда (табл.).

Увеличение дозы УФ-света до 453 Дж/м<sup>2</sup> индуцировало повреждение четвертичной структуры молекул в составе 1-ой электрофоретической фракции и диссоциацию димеров на мономеры с кажущейся молекулярной массой 17,4±1,2 кДа (рис. 2). Остальные фракции демонстрировали большую устойчивость к действию модифицирующего агента в указанной дозе: их молекулярные массы достоверно значимых изменений не претерпели.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о меньшей устойчивости молекул HbNO в составе 1-ой электрофоретической фракции к УФ-облучению по сравнению с остальными фракциями гемопротейда.

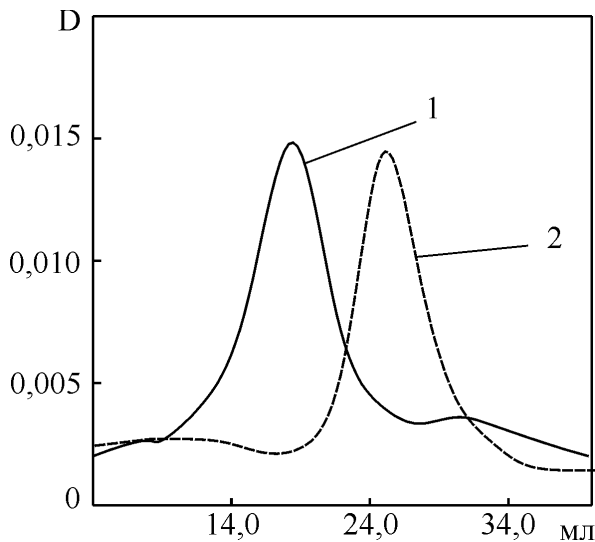
Воздействие УФ-излучения в дозе 906 Дж/м<sup>2</sup> приводило к снижению молекулярной массы мономе-

Таблица

**Кажущиеся молекулярные массы электрофоретических фракций нативного и УФ-облученного нитрозогемоглобина человека**

Доза облучения, Дж/м <sup>2</sup>	Кажущаяся молекулярная масса, кДа			
	1-ая фракция	2-ая фракция	3-я фракция	4-ая фракция
0	29,3±2,8	27,9±0,8	27,1±1,3	30,6±1,3
151	35,0±1,3	27,9±0,8	28,4±2,5	29,9±1,0
453	17,4±1,2 *	27,7±1,3	24,6±1,1	28,3±0,6
906	13,5±0,5 *	33,7±1,2	26,4±0,7	28,8±1,0
1359	13,3±0,9*	35,9±1,7*	25,4±0,8	30,1±0,4
2265	13,0±0,3*	34,6±0,6*	30,4±0,6	24,4±1,9
4530	16,2±0,7*	42,7±0,8*	29,3±0,8	27,9±1,4

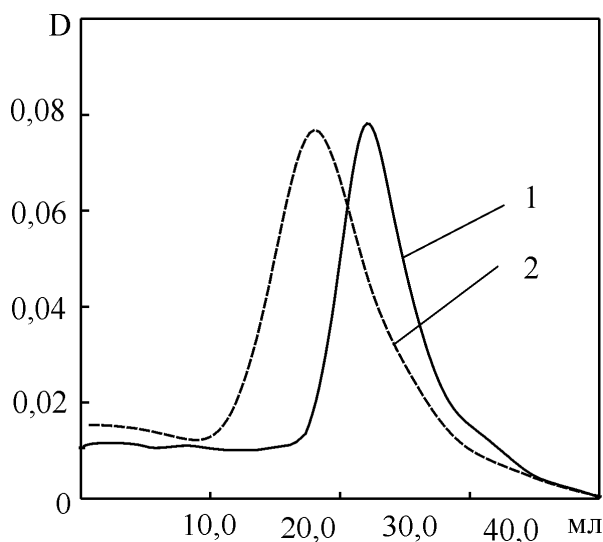
Примечание: \* - отличие от контроля статистически достоверно (p<0,05).



**Рис. 2.** Профили элюции 1-ой электрофоретической фракции нативного (1) и УФ-облученного в дозе 453 Дж/м<sup>2</sup> (2) HbNO человека.

ров в составе 1-ой электрофоретической фракции до  $13,5 \pm 0,5$  кДа. Объемы выходов из колонки и молекулярные массы остальных фракций оставались на уровне контрольных значений.

Повышение дозы облучения до 1359 Дж/м<sup>2</sup> вызывало следующие изменения хроматографических свойств электрофоретических фракций HbNO. Молекулы в составе 1-ой фракции были представлены мономерами массой  $13,3 \pm 0,9$  кДа. УФ-облучение индуцировало конформационные перестройки молекул в составе 2-ой электрофоретической фракции, которые приводили к разворачиванию белковой глобулы, увеличению ее размеров и возрастанию массы до  $35,9 \pm 1,7$  кДа (рис. 3). Молекулы HbNO в составе 3-



**Рис. 3.** Профили элюции 2-ой электрофоретической фракции нативного (1) и УФ-облученного в дозе 1359 Дж/м<sup>2</sup> (2) HbNO человека.

ей и 4-ой электрофоретических фракций демонстрировали высокую фотостабильность (их масса составила  $25,4 \pm 0,8$  и  $30,1 \pm 0,4$  кДа соответственно).

УФ-облучение в дозе 2265 Дж/м<sup>2</sup> вызывало сходные с предыдущей дозой облучения (1359 Дж/м<sup>2</sup>) изменения хроматографических свойств молекул 1-ой и 2-ой фракций HbNO: их массы отличались от контроля и были равны  $13,0 \pm 0,3$  и  $34,6 \pm 0,6$  кДа соответственно. Хроматографические характеристики 3-ей и 4-ой электрофоретических фракций не отличались от контрольных.

Самая большая из исследуемых доз УФ-света (4530 Дж/м<sup>2</sup>) вызывала конформационные перестройки мономеров HbNO в составе 1-ой электрофоретической фракции, вследствие чего их молекулярная масса увеличилась до  $16,2 \pm 0,7$  кДа. Молекулярная масса димеров в составе 2-ой электрофоретической фракции возросла до  $42,7 \pm 0,8$  кДа, что указывает на увеличение размеров белковых молекул данной фракции.

Таким образом, выявленные изменения хроматографических свойств электрофоретических фракций нативного и УФ-облученного нитрозогемоглобина человека позволили установить следующее. Весьма близкие по молекулярным массам димерные фракции HbNO обладают различной степенью прочности межсубъединичных контактов и, как следствие этого, различной чувствительностью к воздействию интегрального потока УФ-излучения. Молекулы HbNO в составе 1-ой электрофоретической фракции оказались наиболее фоточувствительными. Индуцированные УФ-облучением в дозах 453–4530 Дж/м<sup>2</sup> локальные конформационные перестройки апобелкового компонента молекул HbNO 1-ой электрофоретической фракции вызывали ослабление субъединичных контактов и диссоциацию димеров на мономеры. 2-ая электрофоретическая фракция HbNO была более фотостабильной, однако, большие дозы (1359–4530 Дж/м<sup>2</sup>) УФ-света вызывали изменение размеров глобул белка, связанные с процессами ее разворачивания. Молекулы гемопротейда в составе 3-ей и 4-ой электрофоретических фракций проявляли высокую устойчивость к действию УФ-света в указанном диапазоне доз.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lancaster, J.R.Jr. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 8137 – 8141.
2. Snyder, S.H. // Science. 1992. V.257. P. 494-496.
3. Verma, A., Hirsch, D.J., Glatt, E.A. et al. // Science. 1993. V.259. P. 381-384.
4. Чумака А.Г., Чичкан Д.Н., Улащик В.С. и др. // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2000. Т. 130, № 8. С. 140 – 143.
5. Доклад о санитарно-эпидемиологической

обстановке в Воронежской области в 1997 году / Под ред. *М.И. Чубирко*. Воронеж. 1998. С. 6 – 8.

6. Доклад о санитарно-эпидемиологической обстановке в Воронежской области в 1999 году / Под ред. *М.И. Чубирко*. Воронеж. 2000. – 156 с.

7. *Drabkin, D.L.* // *J. Biol. Chem.* 1946. V. 164. P. 703-723.

8. *Блюменфельд Л.А.* Гемоглобин и обратимое присоединение М.: Сов. Наука. 1957. 132 с.

9. *Монгин А.А., Недвецкий П.И., Федорович С.В.* // *Биохимия*. 1998. Т. 63, вып. 6. С. 787-796.

10. *Детерман Г.* Гель-хроматография М.: Мир. 1970. 252 с.

11. *Калаева Е.А., Путинцева О.В., Артюхов В.Г.* / *Вестник Воронежского Государственного Университета: Химия. Биология*. 2000. № 6. С. 78-81.