

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛ ПОЛИГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ОКСИДОМ АЗОТА (II)

М. К. Рубан, Г. А. Вашанов

На основании анализа электронных спектров поглощения и кривых диссоциации оксигемоглобина выявлены изменения структуры и кислородсвязывающих свойств молекул полигемоглобина человека, сформированных из окси- и NO-производных форм белка.

ВВЕДЕНИЕ

Долгое время исследователи пытаются создать «искусственную красную кровь» на основе гемоглобина. Сами по себе отдельные молекулы гемоглобина нельзя вводить в кровяное русло. Гемоглобин мгновенно будет связан белками плазмы, например, альбумином, превратится в гаптоглобин и будет утилизирован в почках и селезенке. Этот процесс может привести к гемоглобинурии (лихорадке, головным болям, болям в мышцах и суставах) и/или вызвать тромбоз сосудов. Подобные трудности побудили разработчиков попытаться использовать свободный гемоглобин, но «сшить» его отдельные молекулы химическими методами, создав полигемоглобиновые кристаллы. Хотя гемоглобины проявляют спонтанное стремление к кристаллоподобным структурам (внутри эритроцита гемоглобин образует различные виды кристаллических упаковок), сами по себе они нестабильны и вне клетки распадаются от небольших перепадов температуры или колебаний кислотности среды. Чтобы сделать полигемоглобиновую упаковку устойчивой, ее сшивают глутаровым альдегидом, диимидо-эфирами или другими агентами [1].

Чем же привлекательны кровезаменители, сформированные на основе полигемоглобинов? Считается, что полигемоглобин (PolyHb) улучшает состояние нейронов мозга, стимулирует в организме выработку собственных эритроцитов, нормализует артериальное давление, увеличивает площадь функционирующих капилляров и улучшает работу сердца. Такой кровезаменитель способен распадаться естественным образом и утилизироваться организмом [2].

Однако свободный polyHb в кровеносном русле интенсивно связывает NO (II) эндотелиального происхождения, который, как известно, является сосудорасширяющим фактором. Поэтому при введении кровезаменителя на основе полигемоглобина часто

наблюдается резкое увеличение артериального давления из-за сужения кровеносных сосудов [3]. Возможно, решением данной проблемы будет использование в качестве компонента кровезаменителя молекул polyHb, включающих как HbO₂, так и NO-производные Hb. При введении в состав полимеризованного гембелка его NO-производных, последние, возможно, сами будут источниками NO-групп для низкомолекулярных тиолов, либо позволят исключить (или уменьшить) процесс связывания эндотелиального NO кровезаменителем. Кроме того, из-за снижения мест связывания O₂, данные молекулы имеют повышенное сродство к кислороду относительно немодифицированного белка и поэтому способны доставлять лиганд к тканям с низким его содержанием, увеличивая таким образом общую эффективность снабжения организма кислородом [4].

В физиологических условиях, также как и *in vitro*, гем-нитрозилгемоглобин (Hb-NO) всегда присутствует совместно с S-нитрозогемоглобином (SNO-Hb) вследствие их взаимопревращения [3, 4]. При этом каждая молекула Hb может содержать в своем составе одновременно гем-NO и Cys-NO [5]. Данный раствор отличается высокой устойчивостью к действию нитритов и медленно окисляется до метгемоглобина. Гемоглобин с нитрозилированным железом гема и SH-группами характеризуется более компактными размерами и повышенной фотоустойчивостью по сравнению с нативным оксигемоглобином, по-видимому, вследствие значительной прочности связи гем-NO и жесткости структуры апоглобина [5].

Исходя из вышесказанного, целью нашей работы было выявление изменений структуры и кислородсвязывающих свойств молекул polyHb человека, образованного на основе окси- и NO-производных форм белка.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В исследованиях использовали термостабилизированные ($37 \pm 0,5$ °C) растворы окси- (oxyHb, HbO₂) и

NO-производных гемоглобина человека ($5 \cdot 10^{-4}$; $1 \cdot 10^{-4}$; $1 \div 5 \cdot 10^{-5}$), а также растворы polyHb, образованного на основе окси-, окси- и NO-производных форм белка, в 0,1 моль/л Na-фосфатном буфере (pH 7,4).

Все эксперименты проходили непосредственно после выделения оксигемоглобина.

Для формирования полимерных молекул Hb использовали 25 %-й водный раствор глутарового альдегида (ГА) («Renal», Венгрия). Связывание гемоглобина с ГА осуществляли в соотношении 1:16 соответственно.

Молекулярную массу полигемоглобина определяли методом колоночной гель-хроматографии на носителе Toyopearl HW 60.

Оксигемоглобин выделяли по методу Драбкина-Блюменфельда [6]. Его содержание в образцах, образование NO-производных гемоглобина, регистрацию электронных спектров поглощения для выявления структурных изменений Hb, появляющихся в результате химической модификации и полимеризации, степень дезоксигенации белка выявляли спектрофотометрически на спектрофотометре СФ-46 («Ломо», Россия).

Для образования NO-производных гемоглобина применяли нитроцистеин (Cys-NO), который получали методом, описанным в работе Монгина и соавт. [7].

Регистрацию электронных спектров поглощения растворов окси-, NO-производных Hb, а также растворов PolyHb, сформированного из окси-, окси- и NO-производных форм белка проводили в диапазоне длин волн 250—700 нм. Концентрация обеих тетра-

мерных форм гемоглобина составила $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л в Na-фосфатном буфере (0,1 моль/л, pH 7,4), а концентрация PolyHb равнялась $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

Кислородсвязывающие свойства PolyHb, сформированного из окси-, окси- и NO-производных форм белка оценивали по кривым диссоциации растворов оксигемоглобина (КДО). Регистрацию КДО, основанную на различиях в спектрах поглощения дезокси- и оксиформ белка в видимом диапазоне длин волн, проводили на установке, изготовленной на кафедре биофизики и биотехнологии ВГУ.

Степень кооперативного эффекта внутри тетрамера гемоглобина определяли, рассчитывая константу Хилла (α).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В качестве кровезаменителя можно использовать PolyHb, включающий не менее пяти молекул белка, так как гемоглобин в таком состоянии, во-первых, обладает наилучшими кислородтранспортными свойствами (легче связывает кислород и отщепляет его при парциальных давлениях, соответствующих венозной части кровеносного русла, в количествах, эквивалентных нативному белку), а, во-вторых, не выводится почками и не приводит к агрегации эритроцитов [8].

Метод гель-хроматографии показал, что молекулярная масса полигемоглобина, образованного из тетрамеров HbO₂, а также образцов PolyHb, сформированных при соотношении компонентов Hb-NO-производные и HbO₂ = 1:4 и 2:3 соответственно, в наших экспериментах соответствовала объединению пяти тетрамеров оксигемоглобина и его NO-производных.

При регистрации электронных спектров поглощения наблюдается увеличение значений оптической плотности растворов полимеризованного белка относительно нативного, что является результатом роста светорассеяния крупными молекулами PolyHb (рис. 1). Сдвиг полосы Soret влево для образцов PolyHb, образованных из тетрамеров HbO₂, относительно нативного оксигемоглобина (рис. 1), свидетельствует о частичном окислении гембелка в процессе полимеризации.

Полоса Soret растворов полигемоглобина, сформированных при соотношении HbO₂:Hb-NO-производные = 4:1, располагалась в области 416 нм. Данный максимум для растворов PolyHb, образованных при соотношении указанных форм белка 3:2, был смещен в область 418 нм (рис. 2).

Регистрация КДО образцов полигемоглобина, сформированных из пяти тетрамеров HbO₂, пока-

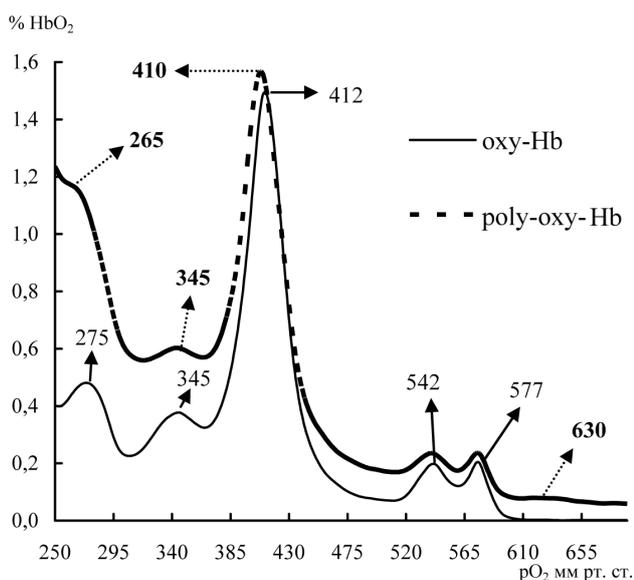


Рис. 1. Электронные спектры поглощения oxyHb и poly-oxy-Hb

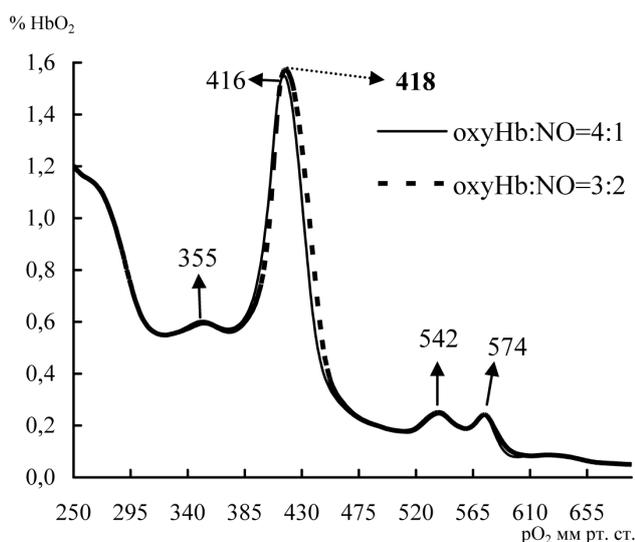


Рис. 2. Электронные спектры поглощения polyHb различно состава

зала (рис. 3), что сшивка тетрамеров приводит к существенному изменению основных параметров кислородсвязывающей способности по сравнению с нативными тетрамерами гембелка: величина полунасыщения лигандом P_{50} уменьшается с $19,2 \pm 0,5$ до $12,2 \pm 1,2$ мм рт. ст., а константа Хилла (α) — с $2,7 \pm 0,1$ до $2,1 \pm 0,2$. Возможно, химическая модификация изменяет конформационную подвижность белковой макромолекулы. Одним из механизмов этого может служить участие в процессе остатков лизина Lys82(β), которые, как известно, играют решающую роль в аллостерическом взаимодействии с молекулами 2,3-дифосфоглицерата [9]. Это, в свою очередь, стабилизирует оксиконформацию гембелка и, следовательно, приводит к сдвигу КДО влево в область меньших парциальных давлений кислорода.

Уменьшение значения константы Хилла также свидетельствует о затруднении конформационной подвижности апобелка в процессе обратимого присоединения лиганда. Следовательно, формирование полигемоглобина способствует большей структурной жесткости полученной молекулы по сравнению с тетрамерным состоянием.

Кроме того, нельзя исключить и процесса частичного окисления гемового железа при химической модификации гемоглобина глутаровым альдегидом. Как было показано ранее на кафедре биофизики и биотехнологии ВГУ, в этих случаях формируются гибриды валентности, функциональные свойства которых также существенно отличаются от таковых для нативного белка [10].

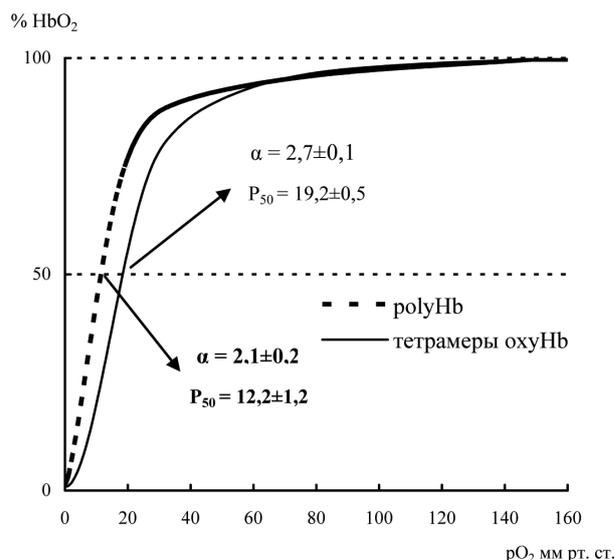


Рис. 3. Кривые диссоциации

При соотношении компонентов $\text{HbO}_2:\text{Hb-NO}$ -производные = 4:1 (рис. 4) значения P_{50} и α были равны $6,7 \pm 1,3$ мм рт. ст. и $1,5 \pm 0,2$. Сдвиг КДО влево относительно Poly-oxy-Hb ($12,2 \pm 1,2$) может быть результатом преобладания в растворе SNO-Hb, который имеет высокое сродство к кислороду [4].

КДО PolyHb, образованного при соотношении $\text{HbO}_2:\text{Hb-NO}$ -производные = 3:2, имели нетипичную форму (рис. 4). P_{50} и α составили $38,1 \pm 1,6$ мм рт. ст. и $1,0 \pm 0,2$, что свидетельствует, по-видимому, о присутствии в растворе большого количества Hb-NO, α -гемы которого прочно связаны с NO. В результате

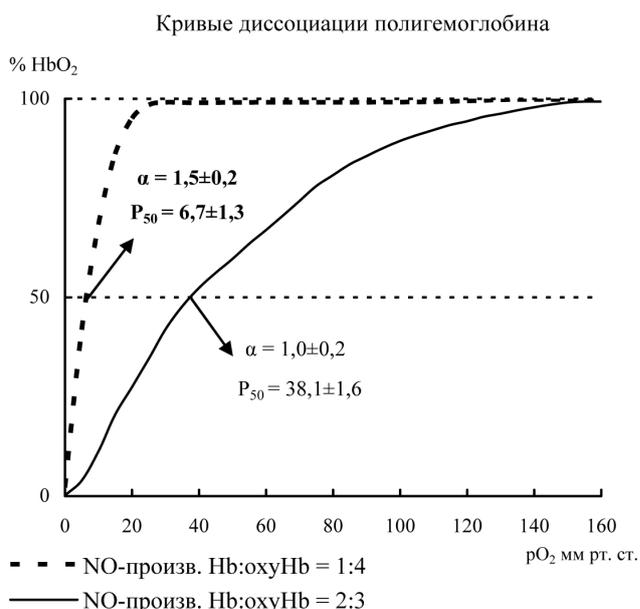


Рис. 4. Кривые диссоциации полигемоглобина

модифицированный гембелок обладает низким сродством к кислороду. Величина константы Хилла в данном случае свидетельствует о независимом функционировании субъединиц оксигемоглобина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных экспериментов нами установлено, что полимеризация оксигемоглобина приводит к усилению кислородсвязывающей способности образцов по сравнению с нативными тетрамерами, что выражается в снижении величин P_{50} и константы Хилла. Можно предположить, что это происходит в результате структурных перестроек апобелка и, по-видимому, фиксирования R-конформации гемоглобина. Регистрация спектральных характеристик образцов полигемоглобина, сформированных из пяти тетрамеров в оксиформе, показала, что при поликонденсации происходит частичное окисление гембелка.

Включение в состав полимерных комплексов молекул NO-производных гемоглобина приводит к значительным изменениям кислородсвязывающей активности PolyHb. Возможно, полигемоглобин, сформированный при соотношении Hb-NO-производные:HbO₂ = 1:4, содержит большое количество S-нитрозо-Hb, а PolyHb, полученный при соотношении данных форм гембелка 2:3, в качестве NO-производного гемоглобина включает, в основном, гем-нитрозил-Hb. Как и при минимальном соотношении компонентов (1:4), так и в случае соотношения компонентов 2:3 происходит разобщение структурных перестроек отдельных протомеров апобелка при оксигенации ($\alpha = 1,5 \pm 0,2$ и $1,0 \pm 0,2$ соответственно) и накопление R-конформации гембелка в первом случае ($P_{50} = 6,7 \pm 1,3$ мм рт. ст.) и T-конформации во втором ($P_{50} = 38,1 \pm 1,6$ мм рт. ст.).

Можно предположить, что при использовании в качестве кровезаменителя молекул полигемоглобина, включающего HbO₂ и NO-производные гембелка в соотношении 4:1, в кровеносном русле он может выступать в качестве доноров NO, передавая эту молекулу с S-нитрозо-Hb на низкомолекулярные тиолы и комплексы негемового железа крови. Возможно, присутствие в составе полигемоглобина такого количества NO-производных Hb позволит исключить процесс связывания эндотелиального NO

кровезаменителем. Предположительно такой полигемоглобин из-за повышенного сродства к кислороду позволит доставлять этот лиганд к тканям с низким его содержанием, увеличивая, таким образом, общую эффективность снабжения организма кислородом [4]. При увеличении количества молекул NO-производных в составе полигемоглобина (HbO₂: NO-производные Hb = 3:2) наблюдается резкое уменьшение сродства polyHb к O₂, а также образование в качестве NO-производных Hb гем-нитрозил-Hb. Поэтому, на наш взгляд, использование такого кровезаменителя нецелесообразно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Иваницкий Г.Р.* Переливание крови: против, за и альтернатива / Г.Р. Иваницкий // Наука и жизнь. — 1999. — № 2.
2. *Song L.Q. et al.* Effects of polymerized bovine hemoglobin on the activity of Na⁺ K⁺-ATPase after global cerebral ischemia and reperfusion / L.Q. Song et al. // *Disi junyi daxue xuebao (J. Fourth Mil. Med. Univ.)*. — 1999. — Vol. 20. — № 8. — 676—677.
3. *Huang K. et al.* Modulation of nitric oxide bioavailability by erythrocytes / K. Huang // *Physiology*. — 2001. — Vol. 98. — № 20. — 11771—11776.
4. *Gladwin M.T.* Relative role of heme nitrosylation and β -cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation / M.T. Gladwin, F.P. Ognibene, L.K. Pannel et. al // *Biochemistry*. — 2000. — Vol. 97. — № 18. — P. 9943—9948.
5. *Калаева Е.А.* Дис. ... канд. биол. наук. / Е.А. Калаева — Воронеж, 2001. — 188 с.
6. *Блюменфельд Л.А.* Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода / Л.А. Блюменфельд. — М.: Советская наука. — 1957. — 134 с.
7. *Монгин А.А.* Деполяризация изолированных нервных окончаний мозга донорами окиси азота: мембранные механизмы / А.А. Монгин, П.И. Недвецкий, С.В. Федорович // *Биохимия*. — 1998. — Т. 63. — вып. 6. — С. 787—796.
8. *Nishide H.* Facilitated oxygen transport with modified and encapsulated he-moglobins across non-lowing solution membrane / H. Nishide, X.S. Chen, E. Tsuchida // *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* — 1997. — Vol. 25. — № 4. — P. 335—346.
9. *Страйер Л.* Биохимия. В 3 т. Т. 1. / Л. Страйер. — М.: Мир, 1984 — 232 с.
10. *Заводник И.Б.* Процессы окисления гемоглобина человека / И.Б. Заводник, Е.А. Лапшина // *Биохимия*. — 1996. — Т. 61. — вып. 1. — С. 42—48.