

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОДИФИКАЦИИ  
НИТРОЗИЛИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА,  
ИНДУЦИРОВАННЫЕ ОКСИГЕНАЦИЕЙ****М. К. Рубан, Г. А. Вашанов, И. А. Лавриненко***Воронежский государственный университет*

Поступила в редакцию 20.03.10 г.

**Аннотация.** На основании анализа электронных спектров поглощения и кривых диссоциации оксигемоглобина выявлены структурно-функциональные модификации частично и полностью нитрозилированного гемоглобина. По-видимому, оксигенация частично нитрозилированного гемоглобина (соотношение молекул Hb:NO=20:1 по гемю) индуцирует внутримолекулярную перегруппировку NO от гемов к SH-группам Cys $\beta$ 93. Установлено резкое снижение сродства к O<sub>2</sub> гемнитрозилгемоглобина с соотношением молекул Hb:NO=5:1 (по гемю). Оксигенация полностью нитрозилированного Hb приводила к накоплению такого количества метгемоглобина (MtHb), при котором зарегистрировать КДО не удалось.

**Ключевые слова:** нитрозилгемоглобин, оксид азота (II), оксигенация

**Abstract.** On the basis of the analysis of absorption electronic spectra and dissociation curves of oxyhaemoglobin (DCO) structurally functional changes partially and completely nitrosylating haemoglobin are revealed. It is assumed, that oxygenation partially nitrosylating haemoglobin (a parity of molecules Hb:NO=20:1 on haem), induces intramolecular regrouping NO from haems to SH-groups Cys $\beta$ 93. Strong decrease in affinity to O<sub>2</sub> in haemnitrosylhaemoglobin with a parity of molecules Hb:NO=5:1 (on hemu) is established. Oxygenation completely nitrosylating Hb led to accumulation of such quantity methaemoglobin at which to register DCO it was not possible.

**Keywords:** nitrosylhemoglobin, nitrogen monoxide, oxygenation.

**ВВЕДЕНИЕ**

Система оксида азота (II) обладает широким спектром биорегуляторного действия, выполняя в организме человека около 40 функций. С открытием вазодилаторной функции NO, а также в связи с высоким его сродством к гемоглобину (Hb), возникло множество вопросов относительно роли NO-производных Hb в механизмах регуляции тонуса кровеносных сосудов. Предполагается, что NO-производные Hb выступают не только как депо и переносчики NO в кровеносном русле, но и в качестве сенсоров, реагирующих на локальную гипоксию усилением оксигенации и кровоснабжения стрессовых участков [1].

Несмотря на большое число публикаций, посвященных изучению NO-производных Hb, многие вопросы в этой области остаются открытыми [2]. Это связано, прежде всего, с высокой реакционной способностью NO. Кроме того, на наш взгляд, при интерпретации полученных данных нужно учиты-

вать аллостерическую природу Hb и, возможно, важную роль мощного транс-лигандного эффекта NO. Принимая во внимание вышесказанное, целью нашей работы было изучение структурно-функциональных модификаций в различной степени нитрозилированного Hb, как потенциального донора NO в кровеносном русле.

**МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА**

Опытные растворы Hb в 0,1 М Na-фосфатном буфере с pH 7,4 (PBS) выделяли из эритроцитов доноров в день взятия крови согласно методу [3] с модификациями [4]. В качестве источника NO мы использовали PBS, насыщенный газом из баллона, объемная доля NO в котором более 99,85% («Линде Газ Рус», Санкт-Петербург). Полностью насыщенный газом PBS содержит 2 мМоль NO [2, 5]. Когда это было необходимо, исходный раствор NO разбавляли дегазированным PBS до нужной концентрации.

Электронные спектры поглощения регистрировали, используя UV/VIS спектрофотометр Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu, Япония). Концентра-

ции лигандных форм гемоглобина рассчитывали спектрофотометрически [6].

Дезоксигемоглобин (deoxyHb) получали из оксигемоглобина, вакуумируя последний до тех пор, пока соотношение интенсивностей поглощения при 555 нм и 540 нм не становилось более 1,19. Полностью нитрозилированный Hb (HbNO) получали, помещая раствор deoxyHb в атмосферу NO. Степень перехода deoxyHb в HbNO контролировали спектрофотометрически. Добавление раствора с NO или воздуха в тонометр осуществляли с помощью прецизионных газонепроницаемых микрошприцов с тефлоновыми плунжерами (тип Gastight) (Hamilton, Швейцария). При оксигенации HbNO атмосферу NO из тонометра удаляли, вытесняя ее газом с объемной долей гелия 99,99%. Далее вакуумированием удаляли из тонометра He. С помощью установки с вакуумметром в тонометр порциями закачивали воздух и регистрировали спектры поглощения реакционной системы.

О функциональных свойствах полностью (HbNO) и частично нитрозилированного Hb (ЧНГ) судили по кривым диссоциации (КДО), которые регистрировали, используя спектрофотометрический метод [7]. Степень кооперативного эффекта внутри тетрамеров ЧНГ определяли по константе Хилла ( $\alpha$ ).

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с помощью программы для

PC Microsoft Office Excel 2003. Отличия в контрольных и опытных сериях экспериментов анализировали с использованием методов вариационной статистики при 5% уровне значимости.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно литературным данным, в физиологических условиях концентрация NO в кровеносном русле значительно ниже концентрации внутриэритроцитарного Hb (примерно в  $10^2$ — $10^3$  раз) [1]. Однако небольшие количества молекул NO или NO-производных проникают в эритроциты, поскольку установлены вазодилатирующие свойства этих клеток. Следовательно, небольшая популяция внутриэритроцитарного гемоглобина может быть частично нитрозилирована. Мы изучили структурно-функциональные модификации ЧНГ в ходе оксигенации.

Известно, что на различных стадиях оксигенации deoxyHb в его спектрах поглощения наблюдается единственная изобестическая точка при 420 нм, свидетельствующая о взаимном переходе только двух лигандных форм Hb: дезокси-формы в окси-форму (рис. 1) [8, 9]. На рис. 1 максимум 410,5 нм является характеристической точкой дифференциального спектра полностью оксигенированного Hb (oxyHb) относительно deoxyHb.

При оксигенации раствора ЧНГ, полученного при соотношении Hb : NO = 20 : 1 (по гемму) соот-

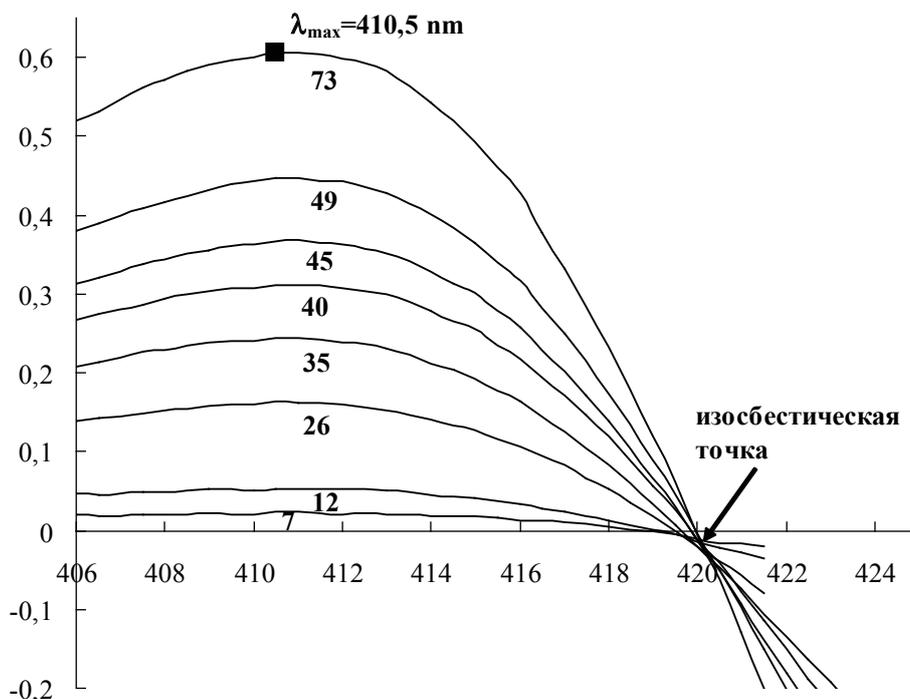


Рис. 1. Дифференциальные спектры поглощения относительно deoxyHb, отражающие процесс оксигенации раствора с концентрацией deoxyHb 65 мкмоль/л по гемму. Цифры под спектрами соответствуют концентрации  $O_2$  (мкмоль)

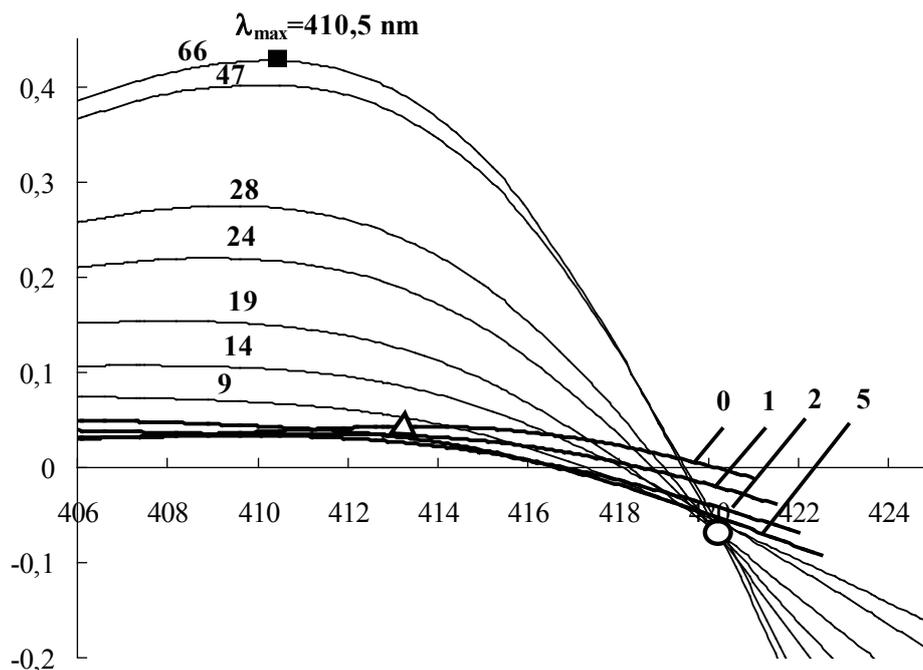


Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения относительно деохиНб, отражающие процесс оксигенации раствора, содержащего ЧНГ (концентрация Нб 60 мкмоль/л по гемму). Цифры над и под спектрами соответствуют концентрации  $O_2$  (мкмоль)

ветственно, изобестическая точка при 420 нм в спектрах появлялась не сразу (рис. 2). Белый треугольный маркер на рис. 2 отражает максимум дифференциального спектра ЧНГ относительно деохиНб, значение которого (413,5 нм) близко к максимуму в дифференциальном спектре НбNO относительно деохиНб (415,0 нм), идентифицированному нами ранее [9]. На начальных этапах оксигенации (1—5 мкмоль  $O_2$ ) наблюдалось постепенное исчезновение максимума 413,5 нм. При последующих добавлениях 9—66 мкмоль  $O_2$  в спектрах появлялась изобестическая точка при 420 нм и максимум дифференциального спектра охиНб при 410,5 нм. Эти данные мы объясняем, опираясь на две идеи: гипотезу аллостерически контролируемых процессов ассоциации и диссоциации NO в гемоглобине, предложенную J. S. Stamler [1]; известный факт мощного транслигандного влияния NO, нарушающего связь атома Fe гема с азотом ( $N_\epsilon$ ) проксимального Нус апобелка ЧНГ, что приводит к образованию пятикоординатных  $\alpha$ -NO гемов [10]. По-видимому, на начальных этапах оксигенации частично нитрозилированного Нб отсутствие изобестической точки в области 420 нм и постепенное исчезновение максимума при 413,5 нм в дифференциальных спектрах могут быть следствием перегруппировки молекул NO от гемов к SH-группам Cys $\beta$ 93. Появление изобестической точки в области 420 нм

и максимума в дифференциальном спектре при 410,5 нм с увеличением концентрации  $O_2$  может быть связано с тем, что молекулы NO полностью переместились от гемов к Cys $\beta$ 93 и далее происходит насыщение кислородом вакантных гемов.

Дополнительные сведения о механизме этой реакции можно получить при исследовании функциональных свойств ЧНГ, регистрируя основные параметры кислородсвязывающих свойств Нб. На рис. 3 показано, что оксигенация раствора ЧНГ, полученного при соотношении молекул Нб : NO = 20 : 1 (по гемму), приводила к достоверному увеличению сродства Нб к  $O_2$  по отношению к контролю: величина полунасыщения лигандом ( $P_{50}$ ) уменьшалась с  $18,7 \pm 1,6$  до  $8,1 \pm 1,2$  мм рт. ст., а константа Хилла ( $\alpha$ ) — с  $2,7 \pm 0,2$  до  $2,1 \pm 0,1$ . Известно, что к увеличению сродства остальных субъединиц к  $O_2$  приводит образование гемина в одной из цепей тетрамера [11]. С другой стороны, было показано, что нитрозование SH-групп Cys $\beta$ 93 гемоглобина приводит к таким конформационным изменениям в тетрамере деохиНб, которые препятствуют His- $\beta$ 146 осуществлять стабилизацию T-состояния гембелка [12].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании литературных сведений и полученных нами экспериментальных данных, мы полагаем, что взаимодействие молекул NO с Нб может быть обратимым, когда гембелок частично нитро-

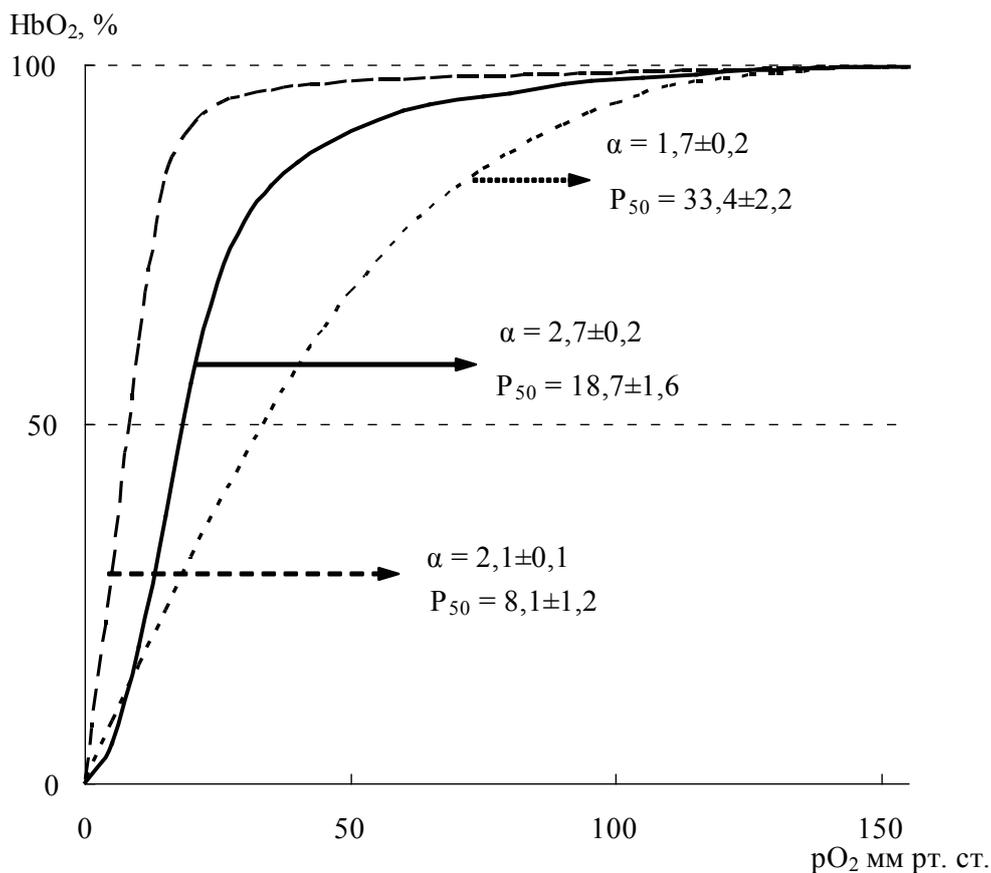


Рис. 3. КДО ЧНГ: сплошная кривая — нативный Нб; пунктирная — ЧНГ (Нб : NO=20 : 1 по гемму); точечная — ЧНГ (Нб : NO=5 : 1 по гемму)

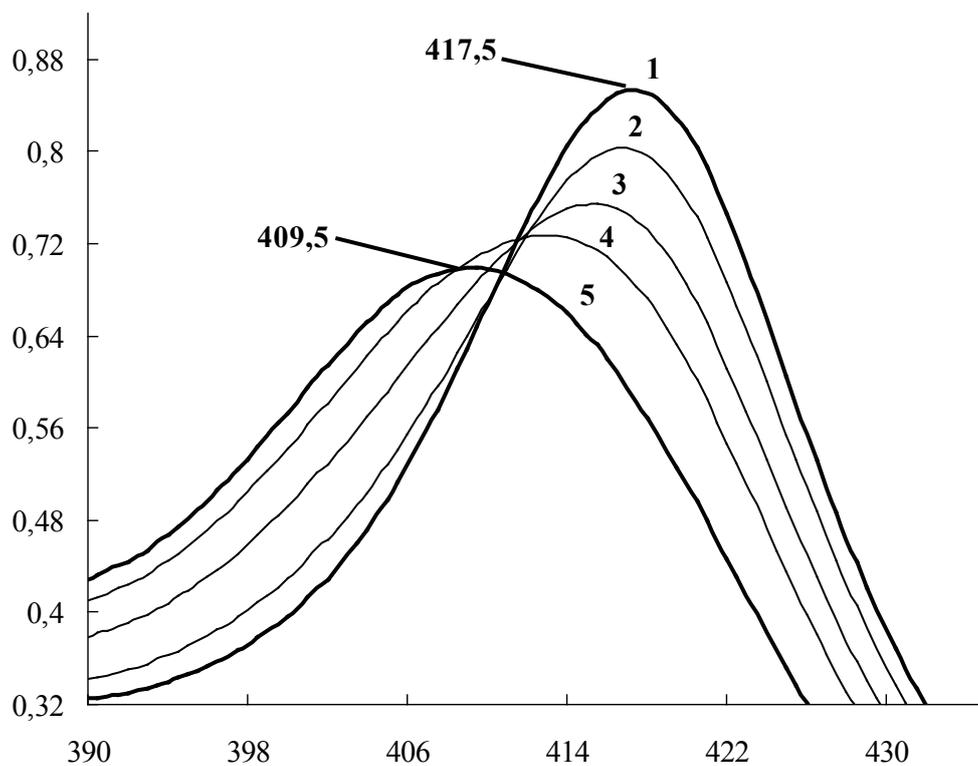


Рис. 4. Оксигенация полностью нитрозилированного гемоглобина (концентрация 30 мкмоль по гемму): 1 —  $pO_2 = 0$  мм рт. ст.; 2 —  $pO_2 = 3,2$  мм рт. ст.; 3 —  $pO_2 = 16,0$  мм рт. ст.; 4 —  $pO_2 = 31,9$  мм рт. ст.; 5 —  $pO_2 = 159,6$  мм рт. ст.

зилирован и находится в Т-конформации. С одной стороны, при субсатурационных уровнях NO скачивается мощный транс-лигандный эффект. По-видимому, он приводит к значительному напряжению или даже разрыву связи  $N_\epsilon$  проксимального гистидина с атомом железа гема в  $\alpha$ -цепях, что может обуславливать неустойчивость атомов железа NO-гемов к окислению. Сродство  $Fe^{3+}$ -гемов к NO значительно ниже, чем к  $Fe^{2+}$ -гемам [14]. Таким образом, в ЧНГ молекулы NO, по-видимому, могут диссоциировать из гемов. С другой стороны, оксигенация ЧНГ увеличивает реакционную способность остатков Cys- $\beta$ 93 по отношению к NO. Следовательно, при оксигенации ЧНГ молекула NO может захватываться SH-группами Cys- $\beta$ 93, образуя S-нитрозооксигемоглобин с повышенным сродством к  $O_2$ . Предполагается, что дезоксигенация S-нитрозооксигемоглобина приводит к снижению стабильности связи NO с SH-группами Cys- $\beta$ 93 и диссоциации молекул NO в присутствии низкомолекулярных тиолов (цистеин, глутатион). В этом случае молекулы кислорода являются аллостерическими эффекторами для гемоглобина, а SH-группы Cys- $\beta$ 93 — его активными центрами. Связывание молекул NO с SH-группами Cys- $\beta$ 93 повышает сродство гемоглобина к кислороду, препятствуя His- $\beta$ 146 осуществлять стабилизацию Т-состояния гембелка [12]. Следовательно, молекулы NO выступают в роли эффекторов, изменяющих взаимодействие лиганда  $O_2$  с активными центрами (гемами). Такой тонкий механизм взаимной регуляции сродства NO и  $O_2$  к гемоглобину может служить для изменения скорости кровотока на уровне микроциркуляции в соответствии с локальными потребностями в  $O_2$  клеток органов и тканей.

С другой стороны, гемоглобин может выступать в роли утилизатора избытка NO. Это обусловлено возможностью как практически необратимо связывать молекулы NO, так и преобразовывать их в менее активные формы ( $N_2O$ ,  $NO_3^-$ ), окисляясь при этом до MtHb. В тех случаях, когда метгемоглобин-редуктазная система эритроцитов не сможет справиться с избытком MtHb или большое количество Hb будет необратимо преобразовано в HbNO, могут возникать патологические состояния, обусловленные нарушением кислородтранспортных свойств внутриэритроцитарного Hb.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 08-04-99033 р\_офи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stamler J. S. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient / J.S. Stamler, L. Jia, J.P. Eu et al. // Science. — 1997. — № 276. — P. 2034—2037.
2. Herold S. Reactions of deoxy-, oxy-, and methemoglobin with nitrogen monoxide. Mechanistic studies of the S-nitrosothiol formation under different mixing conditions / S. Herold, G. Rock // J. Biol. Chem. — 2003. — № 278. — P. 6623—6634.
3. Drabkin D. L. The chromatographic and optical properties of hemoglobin of man in comparison those of other species / D. L. Drabkin // J. Biol. Chem. — 1946. — V. 164. — P. 703—723.
4. Блюменфельд Л. А. Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода / Л. А. Блюменфельд // М.: Советская наука. — 1957. — 134 с.
5. Рабинович В. А. Краткий химический справочник. / В. А. Рабинович, З. Я. Хавин // Ленинград: Химия. — 1978. — 392 с.
6. Стусь Л. К. Осцилляция некоторых лигандированных форм гемоглобина при хранении крови / Л. К. Стусь, Е. Д. Розанова // Биофизика. — 1992. — Т. 37, вып. 2. — С. 387—388.
7. Столяр О. Б. Молекулярные основы кислородной диссоциации оксигемоглобина кролика при действии рентгеновского излучения в дозе 600 р / О. Б. Столяр, О. И. Петренко, В. Н. Коробов // Молекулярные механизмы биологического действия ионизирующих излучений. — 1979. — С. 64—75.
8. Gow A. J. Reaction between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions / A. J. Gow, J. S. Stamler // Nature. — 1998. — № 391. — P. 169—173.
9. Рубан М. К. Взаимодействие дезоксигемоглобина с оксидом азота (II) / М. К. Рубан, Г. А. Вашанов, И. А. Лавриненко // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. — 2009. — № 1. — С. 162—165
10. Hille R. Spectral transitions of nitrosyl hemes during ligand-binding to hemoglobin / R. Hille, J.S. Olson, G. Palmer // J. Biol. Chem. — 1979. — № 254. — P. 2110—2120.
11. Benesch R. E. Subunit exchange and ligand binding: a new hypothesis for the mechanism of oxygenation of hemoglobin / R. E. Benesch, R. Benesch and G. Miacduff // Proc. N. A. S. Biochemistry. — 1965. — Vol. 54. — P. 535—542.
12. Bonaventura C. Effects of S-Nitrosation on Oxygen Binding by Normal and Sickle Cell Hemoglobin / C. Bonaventura, G. Ferruzzi, S. Tesh, R.D. Stevens // Journal Of Biological Chemistry. — 1999. — Vol. 274. — №. 35. — P. 24742—24748.
13. Артюхов В. Г. Олигомерные белки: структурно-функциональные модификации и роль субъединичных контактов / В. Г. Артюхов, О. В. Башарина, Г. А. Вашанов и др. // Воронеж: Изд-во Воронежс. гос. ун-та. — 1997. — 244 с.
14. Sharma V. S. Reaction of nitric oxide with heme proteins and model compounds of hemoglobin / V.S. Sharma, T. G. Traylor, R. Gardiner et al. // Biochemistry. — 1987. — № 26, P. 3837—3843.

*Вашанов Г. А.* — проф., зав. кафедрой физиологии человека и животных Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 207533, e-mail: vga@main.vsu.ru

*Vashanov G. A.* — professor, Head of Department of the Human and Animal Physiology Voronezh State University; tel.: (4732) 207533, e-mail: vga@main.vsu.ru

*Рубан М. К.* — м.н.с. Технопарка Воронежского государственного университета; тел.: (910) 3442696, e-mail: ruban@vsu.ru

*Ruban M. K.* — scientific employee of Technopark of Voronezh State University; tel.: (910) 3442696, e-mail: ruban@vsu.ru

*Лавриненко И. А.* — ассистент кафедры биофизики и биотехнологии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208586, e-mail: bf188@bio.vsu.ru

*Lavrinenko I. A.* — assistant of the Chair of Biophysics and Biotechnology of Voronezh State University; tel.: (4732) 208586, e-mail: bf188@bio.vsu.ru