

### ГЕМОГЛОБИН ЧЕЛОВЕКА: СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОДИФИКАЦИИ, МАТЕМАТИЧЕСКИЕ И КОМПЬЮТЕРНЫЕ МОДЕЛИ

(рецензия на книгу «Гемоглобин человека в условиях воздействия различных физико-химических агентов» В.Г. Артюхова, О.В. Путинцевой, Е.А. Калаевой, В.С. Савостина. - Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2013. - 364 с.)

УФ-свет – один из важнейших экологических факторов, под воздействием которого возникла жизнь на Земле. Понять сложные механизмы резистентности и адаптации живых систем по отношению к УФ-излучению можно, только изучив его влияние на клеточно-молекулярном уровне. Принимая во внимание усиливающуюся роль коротко- и средневолнового УФ-излучения в формировании антропогенной нагрузки на окружающую среду, а также широкое использование в клинической практике различных видов фототерапии, становится понятной необходимость исследований процессов с участием низкомолекулярных физиологически активных соединений в биосистемах, подвергнутых воздействию УФ-света от естественных и искусственных источников, и путей фотопревращения комплексов белок-лиганд при этих воздействиях. Вопросам влияния УФ-света на структурное и функциональное состояние ферментов (каталаза, супероксиддисмутаза, пероксидаза) уделяется существенное внимание; как в России, так и за рубежом опубликовано немало работ по этой тематике. Монографий, посвященных комплексному анализу физико-химических и функциональных свойств сложных белков (гемопротеидов), крайне мало (среди них следует отметить книгу «Олигомерные белки: структурно-функциональные модификации и роль субъединичных контактов» (В.Г. Артюхов [и др.] – Воронеж : Изд-во Воронеж. ун-та, 1997. – 244 с.)); основные фотохимические исследования гемопротеидов проведены в основном без учета их структурной неоднородности и лигандного состава.

Материалом для написания монографии В.Г. Артюхова, О.В. Путинцевой, Е.А. Калаевой, В.С. Савостина «Гемоглобин человека в условиях воздействия различных физико-химических агентов»

послужила часть научно-исследовательской работы, выполняемой в Воронежском госуниверситете на базе кафедры биофизики и биотехнологии биолого-почвенного факультета в течение продолжительного времени и связанной, главным образом, с изучением последствий воздействия факторов различной природы на физико-химические и функциональные свойства белков крови.

Монография состоит из двух частей. Часть I «УФ-индуцированные структурно-функциональные изменения гемоглобина в присутствии некоторых эндогенных низкомолекулярных биорегуляторов» начинается с обзора современных научных воззрений на природу, метаболизм, роль в биосистемах малых неионных лигандов (оксида азота и углерода), серосодержащих соединений (восстановленного глутатиона, S-нитрозоцистеина и S-нитрозоглутатиона), лекарственных препаратов – источников оксида азота (нитроглицерина, МОНОЧИНКВЕ®); далее подробно рассматриваются строение, физико-химические и функциональные свойства различных лигандных форм гемоглобина человека (окси-, карбокси-, NO-производные), обсуждаются механизмы воздействия УФ-света на сложные белки.

Известно, что в организме человека и животных гемоглобин существует в комплексе с целым рядом малых лигандов ( $O_2$ , CO, NO,  $H_2O$  и др.) в виде молекул окси-, карбокси-, нитрозо-, метгемоглобина и др., физико-химические свойства и функциональная активность которых резко отличаются в зависимости от природы лиганда. В норме соотношение отдельных лигандных форм гемоглобина поддерживается на определенном физиологическом уровне. Однако оно может колебаться из-за изменения газового состава вдыхаемого воздуха, приема лекарственных препаратов, проведения физиотерапевтических процедур,

протекания различных патологических процессов в организме. В настоящее время всё большую актуальность приобретают исследования, посвященные изучению физико-химических и функциональных свойств гемоглобина при различном соотношении отдельных его дериватов в образце.

Исследование структурного статуса молекул оксигемоглобина в присутствии лекарственных средств – источников NO, представляет особый интерес, поскольку нитратные вазодилаторы имеют широкое распространение в кардиологии. Функционирование молекул NO в клетках организма человека тесно связано с низкомолекулярными серосодержащими пептидами (восстановленный глутатион – GSH, цистеин – CysSH). Соединяясь с оксидом азота, GSH образует нитрозоглутатион (GSNO), а CysSH – нитрозоцистеин (CysNO). Эти соединения депонируют NO в условиях гиперпродукции, предохраняют его от окисления, защищают NO от различных воздействий при внутри- и межклеточном переносе, участвуют в генерации NO путем восстановления нитрат- и нитрит-ионов. Таким образом, нитрозотиолы являются важным звеном в обеспечении физиологических функций NO в организме человека, а исследования взаимодействия S-нитрозоглутатиона и S-нитрозоцистеина с гемоглобином и анализ физико-химических и функциональных свойств образующихся при этом соединений становятся все более востребованными.

Молекулы восстановленного глутатиона входят в состав глутатионовой антиоксидантной системы, которая играет важную роль в нормальном функционировании клеток, тканей и организма человека. Однако недостаточная изученность влияния этих молекул на эритроцитарные белки крови стимулировала авторов к проведению исследований третичной и четвертичной структуры, а также кислородсвязывающей способности нативного и УФ-облученного оксигемоглобина человека в присутствии восстановленного глутатиона.

В настоящее время роль математических методов в естествознании резко возрастает, поскольку любое утверждение в биологии (в силу ее тесного переплетения с физикой и химией) нуждается в сопоставлении с основными законами этих точных научных дисциплин, для этого необходимо использовать математические методы анализа. Приложение методов современной математики к положениям и законам биологии позволяет придать им более четкую и содержательную форму, а также выявить новые, ранее неизвестные аспекты.

Следует отметить стремление авторов вскрыть сущность тонких механизмов процессов связывания молекул гемоглобина с кислородом. Этому способствовал тщательный анализ изменений показателей кислородсвязывающей способности гемопротейда. Помимо традиционного критерия оценки функциональной активности гемоглобина (по величинам давления полунасыщения белка лигандом и константы Хилла), для учета сложного характера взаимодействий дериватов гемоглобина между собой и для уточнения, в какой фазе оксигенации происходят те или иные изменения, был предложен способ расчета содержания оксигемоглобина в интактном образце и смесях при различных парциальных давлениях кислорода. Кроме того, было вычислено содержание оксигемоглобина при парциальных давлениях кислорода 40 мм рт.ст. (pO<sub>2</sub> венозной крови) и 100 мм рт.ст. (pO<sub>2</sub> артериальной крови), поскольку при функционировании в физиологических условиях (в кровеносном русле) изменение степени насыщения гемоглобина кислородом происходит именно в этом диапазоне pO<sub>2</sub>. Величина артериально-венозной разности содержания HbO<sub>2</sub> в крови позволяет судить об объеме кислорода, отдаваемого тканям в процессе газообмена. Предложенные авторами регрессионные модели процессов оксигенации нативного и модифицированного оксидами азота и углерода гемопротейда, несомненно, расширяют и углубляют наши представления о характере изменений кислородсвязывающей способности гемоглобина человека в условиях воздействия низкомолекулярных неионных лигандов и УФ-излучения. Использование методов математической статистики (корреляционный, кластерный анализ) дает возможность выявить связи между основными параметрами оксигенации гемопротейда, что позволяет понять сущность процессов, происходящих на молекулярном уровне.

Вторая часть монографии - «Гемоглобин как основа искусственных кровезаменителей» начинается с изложения проблемы трансфузии донорской крови и создания искусственных кровезаменителей. В настоящее время в связи с увеличением частоты возникновения чрезвычайных ситуаций: природных катаклизмов (землетрясения, цунами), локальных военных конфликтов, террористических актов, автомобильных катастроф, а также ростом числа операций по пересадке органов и тканей, постоянно возрастает потребность в переливании цельной крови и её отдельных компонентов. Недостаточный объем донорской крови и

наличие ряда ограничений по её использованию: опасность передачи при трансфузии бактериальных и вирусных инфекций, возможность несовместимости донорской крови и крови реципиента по антигенному составу, короткие сроки хранения, - требуют создания искусственных кровезаменителей.

Гемоглобин является важнейшим компонентом крови, обеспечивает полноценное снабжение организма человека кислородом, необходимое для его нормального функционирования и поддержания гомеостаза, что приобретает высокую значимость при развитии различных патологических состояний. В связи с этим весьма актуальной является разработка кислородпереносящих растворов на основе гемоглобина, химически модифицированного некоторыми органическими молекулами, защищающими его от разного рода внешних воздействий. Несмотря на определенные успехи в этой области, необходимо продолжать поиск химических соединений и способов модификации молекул гемоглобина с целью эффективной регуляции свойств гемопротейда и снижения степени отрицательных эффектов введения растворов гембелка в организм человека.

В качестве таких веществ авторами были выбраны представители высокомолекулярных полианионов, производные декстрана – препарат «Реополиглюкин» и диальдегиддекстран (ДАД), а также полиэтиленгликоль (ПЭГ), нашедшие применение в молекулярной биологии и медицине.

Изучению действия температуры на белковые молекулы посвящено значительное количество работ. Вместе с тем, мало внимания уделено исследованию природы конформационных превращений сложных (олигомерных) белков, приводящих к их термоинактивации. Недостаточно изучены вопросы, касающиеся выявления физико-химических основ тепловой денатурации этих биополимеров, тогда как изучение процесса термоденатурации позволяет исследователям устанавливать связь между структурой белков и их стабильностью, и понять, какие факторы определяют устойчивость нативной конформации макромолекулы. Всё это убеждает в необходимости проведения подобного рода исследований. В качестве объектов исследования в данной серии экспериментов выступили оксигемоглобин человека в растворе, в присутствии реополиглюкина, в комплексах с ПЭГ или диальдегиддекстраном и в составе эритроцитов, что позволило провести сравнительный анализ термостойкости окси-

формы гемопротейда в зависимости от условий микроокружения и исходной конформации белка.

По меткому выражению Р. Шеннона (1978), имитационное моделирование - это нечто промежуточное между искусством и наукой, направление, появление которого целиком обязано бурному росту возможностей вычислительной техники. Наиболее наглядным примером имитационного моделирования является построение динамических моделей белковых молекул. Молекулярная динамика - весьма быстро и активно развивающееся направление науки. Проследить, каким образом физические взаимодействия отдельных атомов реализуются в виде макроскопических конформационных движений, стало возможным благодаря методам молекулярной динамики. Авторами были созданы трехмерные модели молекул декстрана, диальдегиддекстрана и гемоглобина человека. Кроме того, был осуществлен расчет ряда характеристик исследуемых молекул, которые весьма сложно определить в условиях лабораторного эксперимента: местонахождение альдегидных групп в молекуле ДАД, пространственное расположение аминокислотных остатков лизина в молекуле гемоглобина, величина энергетической щели боковых аминогрупп лизина и их реакционная способность, номера аминокислотных остатков лизина, принимающих участие в процессе образования связей гемоглобина с ДАД. На основании экспериментальных и полученных с помощью компьютерного моделирования данных предложена схема процессов образования комплексов гемоглобин-ДАД различного состава и созданы пространственные модели конъюгатов гемоглобин-ДАД I и II типов. Анализ компьютерных моделей молекулы нативного гемоглобина и комплексов гемоглобин-ДАД I и II типов позволяет сделать вывод о том, что при модификации гембелка диальдегиддекстраном происходит увеличение компактности белковой глобулы за счет усиления внутримолекулярных взаимодействий. Несмотря на это, сохраняется конформационная лабильность гемовой группы и отдельных субъединиц относительно друг друга (кооперативный эффект), что свидетельствует о способности комплексов гемоглобин-ДАД к обратимой оксигенации, а, следовательно, к эффективной транспортировке кислорода.

В свете достижений последнего десятилетия, касающихся исследования физико-химических и функциональных свойств сложных белков в из-

меняющихся условиях окружающей среды, актуальность и своевременность данной работы не вызывает сомнений. Исследования в этой области важны как с точки зрения разработки теоретических основ современной биофизики, поскольку дают возможность соотносить конформационные модификации макромолекул с ее функциональной активностью, так и с точки зрения практического использования в медицине.

Авторами проделан большой объем работы с использованием традиционных и современных методов анализа (спектрофотометрия в УФ- и видимом диапазонах, гель-хроматография, электрофорез в ПААГ, регистрация кривых диссоциации гемоглобина, модификация гемоглобина низкомолекулярными биорегуляторами, лекарственными препаратами, реополиглокином и диальдегиддекстраном, синтез конъюгатов гемоглобин-ДАД, определение соотношения основных лигандных форм в нативных и модифицированных образцах гемоглобина, выявление природы ионогенных групп, участвующих в образовании комплекса гемоглобин-ДАД, определение химической, фото- и термоустойчивости

гемоглобина в присутствии реополиглокина, ДАД и ПЭГ, создание математических и компьютерных моделей, методы статистической обработки результатов), получен и проанализирован весьма значительный материал.

Монография хорошо оформлена, содержит обширный список цитируемой литературы (496 источников), большое количество таблиц и рисунков, облегчающих восприятие экспериментальных данных, которые ясно и логично изложены, корректно обсуждены. Книга представляет большой интерес для широкого круга специалистов, работающих в области молекулярной биологии, биофизики, биохимии, физиологии, трансфузиологии и службы крови, полезна для бакалавров, магистров и аспирантов, специализирующихся в данных отраслях науки. Так, например, экспериментальные данные рецензируемой монографии в последнее десятилетие используются в качестве лекционных материалов в курсах «Молекулярная биология и биофизика», «Фотобиология», входящих в учебные планы подготовки магистров кафедры биофизики и биотехнологии биолого-почвенного факультета ВГУ.

заведующая кафедрой медицинской биохимии и микробиологии  
биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета  
доктор биологических наук, профессор, Т. Н. Попова