

УДК 577.322:612.111.1

©Коллектив авторов

## МОДИФИКАЦИЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННАЯ НИТРОГЛИЦЕРИНОМ, В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО КИСЛОРОДНОГО РЕЖИМА

В.Г. Артюхов, Е.А. Калаева\*, О.В. Путинцева, А.И. Полюбезьева

Воронежский государственный университет,

394018, Воронеж, Университетская пл. 1; факс: +7(473)220-87-55; эл. почта: kalaevae@gmail.com

Установлено, что оксигемоглобин человека проявляет высокую устойчивость к воздействию нитроглицерина при инкубации в течение 0,3-3 ч. При более продолжительной экспозиции (24 ч) наблюдается активация процессов образования метгемоглобина. Молекулы гемоглобина в присутствии нитроглицерина быстро окисляются с образованием метгемоглобина в качестве конечного продукта взаимодействия оксигемоглобина с нитроглицерином. Предложена схема процессов взаимодействия оксигемоглобина с нитроглицерином в различных условиях кислородного режима. Показана ведущая роль частично делигандированного гемоглобина в инициации окислительных процессов.

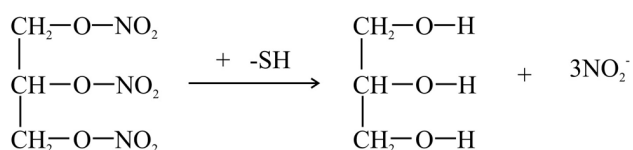
**Ключевые слова:** гемоглобин, кислородсвязывающие свойства, кривая диссоциации оксигемоглобина, нитроглицерин, оксид азота, электронный спектр поглощения

DOI 10.18097/PBMC20166203251

### ВВЕДЕНИЕ

Гемоглобин – транспортный белок крови, основная функция которого заключается в доставке кислорода из лёгких к тканям и органам. Помимо  $O_2$  гемоглобин способен переносить и другие низкомолекулярные лиганды –  $NO$ ,  $CO$ ,  $H_2O$  и др., которые в той или иной степени конкурируют с кислородом за центры связывания в молекуле гемопротейна. Нарушение кислородтранспортной функции гемоглобина имеет негативные последствия для организма, особенно при сердечно-сосудистой патологии.

Нитроглицерин (НГ) считается эталонным препаратом в группе нитратов, применяемых для купирования и профилактики приступов стенокардии [1]. Нитраты являются пролекарствами. Активной группой НГ являются нитрит-ионы ( $NO_2^-$ ), которые в организме высвобождаются в ходе реакции:



Затем  $NO_2^-$  восстанавливается до  $NO$  ферментативным (при участии редуктаз) или неферментативным путём (при участии низкомолекулярных тиолов или SH-групп белков, а также восстановленного гемоглобина) [2]. Образовавшийся оксид азота активирует гуанилатциклазу, оказывая таким образом вазодилататорное действие.

Один из побочных эффектов, возникающих при передозировке НГ (более 20 мкг/кг), – развитие метгемоглобинемии [3]. Выяснение механизмов индуцированного нитратом и нитритом окисления

гемоглобина остается одним из актуальных направлений изучения физиологического и токсического действия препаратов – доноров  $NO$ .

В проанализированных нами публикациях приведены противоречивые данные о механизмах и продуктах взаимодействия гемоглобина человека с нитрит- и нитратсодержащими веществами. Так, одни авторы указывают, что прямое восстановление нитрита в присутствии гемоглобина происходит при нейтральных значениях pH [4], при этом дезоксигемоглобин окисляется до метформы, а нитрит восстанавливается до  $NO$  [5]. Через 1,5 ч после введения нитратов уровень MtHb в крови экспериментальных животных повышается до  $53,4 \pm 2,8\%$ , а на 7-е сутки и в последующие сроки наблюдения содержание MtHb не отличается от значений в контрольной группе ( $1,4 \pm 0,1\%$ ) [6].

Другие учёные считают, что непосредственное окислительно-восстановительное взаимодействие между гемоглобином и нитратами при физиологических условиях практически отсутствует [7]. Нитрит-ионы не могут акцептировать электрон с молекулы оксигемоглобина, что, по-видимому, обусловлено наличием связанного с гемом кислорода, который препятствует осуществлению контакта между донорной орбиталью гема и акцепторной орбиталью  $NO_2^-$  [8].

Возможно, именно различиями в условиях проведения экспериментов (*in vivo* или *in vitro*) объясняются описанные противоречия. Полностью насыщенный кислородом или полностью десатурированный гемоглобин в условиях *in vivo* не встречается, а белок, частично насыщенный лигандом, становится неустойчивым к воздействию окислителей. В условиях *in vitro*, как правило, не принимают во внимание существование переходных (между окси- и дезоксиHb) состояний. Химические

\* - адресат для переписки

свойства и концентрации модифицирующих агентов, наличие или отсутствие редуказ и оксидаз в модельных системах также вносят свой вклад в формирование наблюдаемого эффекта.

Согласно концепции цикла оксида азота, реакция восстановления  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$  ингибируется в присутствии кислорода [9], а при низкой концентрации  $\text{O}_2$  в среде нитраты восстанавливаются до NO [10]. Преобладание в условиях гипоксии нитритредуктазных процессов подтверждается, в частности, тем, что нитроглицерин воздействует преимущественно на венозную часть сосудистого русла, то есть NO образуется из  $\text{NO}_2^-$  в условиях дефицита кислорода. Связываясь с дезоксигемоглобином, оксид азота формирует комплексы Hb-NO [11], устойчивые к окислению.

Таким образом, в условиях *in vitro* оксиформа гемоглобина довольно устойчива к окислению нитритами, а при низком содержании кислорода в среде оксид азота проявляет антиокислительную активность по отношению к дезоксиHb.

Еще один источник генерации метгемоглобина – автоокисление HbO<sub>2</sub>. Имеющиеся сведения об автоокислении гемовых белков свидетельствуют о трёх возможных путях этого процесса [12]:

1) диссоциация (или вытеснение растворителем) протонированного супероксида с оксигенированного гема;

2) перенос электрона с пентакоординированного дезоксигема (реакция между некоординированной молекулой кислорода и пентакоординированным дезоксигемом);

3) перенос электрона с гексакоординированного дезоксигема (реакция между некоординированной молекулой кислорода и гемом, имеющим молекулу воды в шестом координационном положении дезокси(ферро)гема).

Важно, что во втором и третьем пути перенос электрона не зависит от pH в отличие от диссоциации супероксида по первому пути. В действительности, как показывает исследование гембелков с различными функциями, при автоокислении каждый из этих путей вносит свой определенный вклад. Соотношение этих вкладов может зависеть от многих факторов [12]. В целом же известно, что скорость реакции автоокисления зависит от pH среды, температуры, а также от восстановителей и окислителей.

Таким образом, последовательность событий, приводящих к накоплению метгемоглобина в крови в присутствии НГ, остаётся невыясненной. Генерируются ли активные формы кислорода (АФК) в ходе реакций взаимодействия между NO,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{O}_2$ , а затем окисляют гемоглобин, или же метгемоглобин, накопленный в результате нитрит-индуцированного автоокисления, участвует в продукции высокоактивных соединений радикальной природы? Очевидно лишь то, что взаимодействие гемоглобина с нитритом играет ключевую роль в целом ряде жизненно важных процессов, и концентрация кислорода в системе определяет направление этих процессов.

В нашей работе изучено влияние НГ на структурные свойства и кислородсвязывающую функцию гемоглобина человека при различных условиях кислородного режима.

## МЕТОДИКА

Оксигемоглобин (HbO<sub>2</sub>) из эритроцитов крови доноров выделяли по методу Drabkin в модификации Л.А. Блюменфельда [13]. В экспериментах использовали препарат “Раствор нитроглицерина 0,1% для инъекций №10” (Институт новых технологий РАМН, Россия) – водорастворимую лекарственную форму с пониженным содержанием глюкозы, не содержащую спирта. К раствору оксигемоглобина (10 мкМ) добавляли НГ в конечных концентрациях 5 нг/мл и 5 мкг/мл. Полученные образцы инкубировали в течение 20 мин, 3 и 24 ч при 37°C.

Методика регистрации кривых диссоциации контрольных (интактных) и опытных (инкубированных с НГ) образцов оксигемоглобина подробно изложена в наших работах [14, 15]. Для регистрации использовали установку, разработанную на кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского госуниверситета [16]. Принцип действия установки основан на линейной зависимости между степенью насыщения гемоглобина кислородом и изменением его спектральных характеристик.

Степень насыщения гемоглобина кислородом (Y) вычисляли по уравнению:

$$Y = \frac{A_{\text{Hb}} - A_x}{A_{\text{Hb}} - A_{\text{HbO}_2}}$$

где  $A_{\text{Hb}}$  – оптическая плотность дезоксигемоглобина;  $A_{\text{HbO}_2}$  – оптическая плотность раствора оксигемоглобина;  $A_x$  – оптическая плотность раствора гемоглобина при данном давлении.

При построении кривых диссоциации оксигемоглобина по оси абсцисс откладывали парциальное давление кислорода (мм рт. ст.), а по оси ординат – насыщение гемоглобина кислородом (%).

Электронные спектры поглощения (ЭСП) растворов белка регистрировали на спектрофотометре UV-2401 PC (“Shimadzu”, Япония) в диапазоне длин волн от 230 до 650 нм. Использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 10 мм. Оптическую плотность растворов регистрировали на протяжении всего диапазона длин волн через 1 нм при ширине спектральной щели 1 нм. Спектральные характеристики образцов полностью и частично дезоксигенированного гемоглобина определяли с использованием герметично закрывающейся кварцевой кюветы от установки для регистрации КДО, что позволяло регулировать уровень pO<sub>2</sub>.

Содержание окси-, дезокси- и метгемоглобина в растворе гемопротеина рассчитывали по формулам [17, 18]:

$$[\text{HbO}_2] = 0,17 D_{577} - 0,13 D_{569} - 0,015 D_{500} \quad (1)$$

$$[\text{Hb}] = -0,16 D_{577} + 0,25 D_{569} - 0,033 D_{500} \quad (2)$$

$$[\text{MnHb}] = 0,02 D_{577} - 0,04 D_{569} - 0,033 D_{500} \quad (3),$$

где  $[HbO_2]$ ,  $[Hb]$ ,  $[MtHb]$  – концентрация окси-, дезокси- и метформ гемоглобина (мкМ); D577, D569 и D500 – оптическая плотность образцов при длинах волн 577, 569 и 500 нм соответственно.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ “Stadia 7.0 (Professional)”. Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных показателей определяли по t-критерию Стьюдента (при уровне значимости  $\alpha=5\%$ ), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

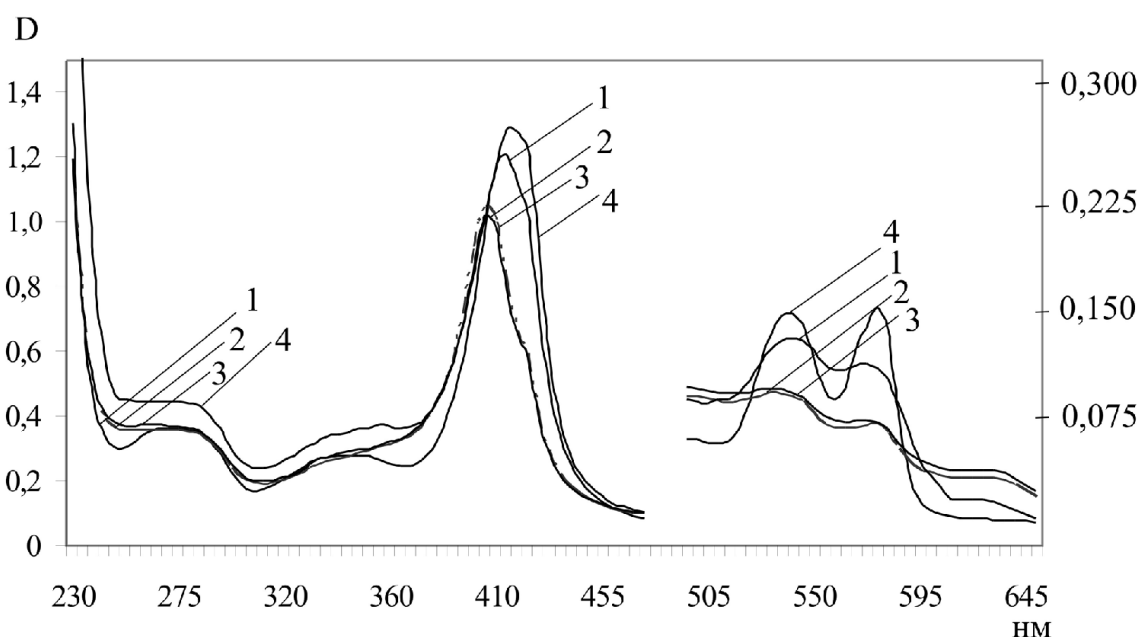
Для определения природы продуктов, образующихся при взаимодействии оксигемоглобина человека с НГ, изучали спектральные свойства нативного и инкубированного с НГ гемопротейда (рис. 1).

Показано, что ЭСП intactных растворов  $HbO_2$  человека имели два максимума в ультрафиолетовой области (273-274 и 346-349 нм) и три полосы поглощения в видимой части спектра (413-414,

541 и 576 нм), что соответствует опубликованным данным [19]. Ранее мы определили как влияет длительное хранение препаратов донорской крови на физико-химические свойства гемоглобина и показали, что хроматографические, электрофоретические и кислородсвязывающие свойства белка не изменяются в течение 1-2 сут хранения [20]. Это указывает на отсутствие спонтанного автоокисления гемопротейда и накопления метгемоглобина по крайней мере в первые 24-48 ч инкубации.

На ЭСП гемоглобина, инкубированного с НГ в течение 20 мин и 3 ч, не обнаружено статистически значимых изменений в положении основных пиков поглощения и величинах оптической плотности, а также в концентрации основных лигандных форм белка (табл. 1).

После 24 ч взаимодействия компонентов отмечено накопление дезокси- (концентрация увеличилась в 2,3 раза) и метформы гемопротейна (концентрация увеличилась в 1,7 раза) в образцах, что сопровождалось снижением концентрации оксигемоглобина в 2,8 раза (табл. 1).



**Рисунок 1.** Электронные спектры поглощения intactного оксигемоглобина (1), нитрогемоглобина (4) и оксигемоглобина, инкубированного (24 ч, 37°C) с нитроглицерином в концентрации 5 нг/мл (2) и 5 мкг/мл (3). Оксигемоглобин и нитрогемоглобин использовали в концентрации 10 мкМ. По оси абсцисс - длина волны, нм; по оси ординат: слева - оптическая плотность образцов (D) в диапазоне длин волн 230-480 нм, справа - оптическая плотность (D) в диапазоне длин волн 490-650 нм.

**Таблица 1.** Содержание основных лигандных форм белка в растворах гемоглобина

Содержание лигандных форм, мкМ	Контроль (intactный $HbO_2$ )	$HbO_2$ + НГ 5 нг/мл			$HbO_2$ + НГ 5 мкг/мл		
		20 мин	3 ч	24 ч	20 мин	3 ч	24 ч
$[HbO_2]$	8,7±1,0	7,9±0,5	8,6±0,01	3,1±0,9*	8,7±1,0	8,2±1,0	3,2±0,3*
$[Hb]$	2,5±0,4	2,6±0,3	2,5±0,5	5,7±1,4*	2,6±0,6	2,5±0,4	5,5±2,7*
$[MtHb]$	3,2±0,1	3,4±0,6	3,4±0,4	5,3±0,2*	3,3±0,6	3,3±0,6	5,8±2,0*

Примечание: НГ - нитроглицерин; \* - отличия от контроля статистически значимы ( $p<0,05$ ).

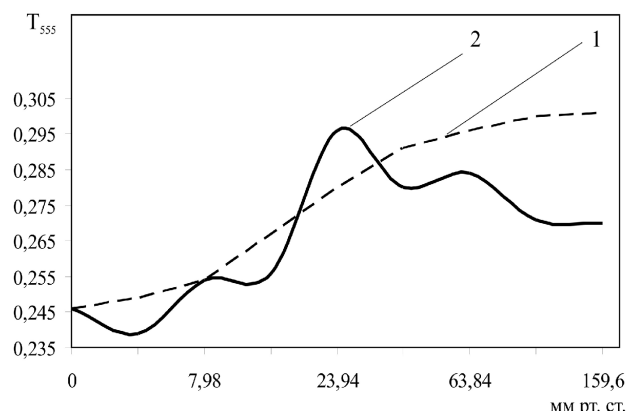
Суточная инкубация оксигемоглобина с НГ в концентрации 5 нг/мл и 5 мкг/мл приводила к смещению максимума абсорбции апобелка до 264-269 нм, переходу пика при 346-347 нм в "плечо" полосы Соре (рис. 1, кривые 2 и 3 соответственно). Это может свидетельствовать о локальных конформационных перестройках третичной структуры белка и изменении вклада отдельных хромофоров глобинового компонента в формирование данной полосы. Интенсивность светопоглощения в видимой части спектра уменьшилась; наблюдались коротковолновые сдвиги максимумов абсорбции: полосы Соре – до 406-409 нм ( $D=1,016\pm0,051$ ),  $\beta$ -полосы – до 537 нм ( $D=0,119\pm0,015$ ).

Не отмечено также накопления нитрогемоглобина (HbNO) в инкубированных с НГ образцах белка, поскольку спектральные характеристики образовавшегося продукта заметно отличаются от характеристик HbNO (рис. 1, кривая 4).

Итак, спектрофотометрическим методом выявлено частичное окисление железа гема и накопление метформы после суточной инкубации гемоглобина с НГ. Зависимости степени изменения структуры и физико-химических свойств гемоглобина от концентрации НГ не обнаружено.

Результаты изучения кислородсвязывающих свойств интактного оксигемоглобина человека подробно описаны нами ранее [14, 15].

Кривая насыщения молекул гембелка, инкубированного с НГ в концентрации 5 нг/мл и 5 мкг/мл в течение 20 мин, не соответствовала кривой сатурации нативных образцов (рис. 2).



**Рисунок 2.** Кривые диссоциации образцов оксигемоглобина человека (10 мкМ), нативного (1) и инкубированного с нитроглицерином (5 мкг/мл) в течение 20 мин при 37°C (2). Регистрация КДО в герметичной кварцевой кювете при  $pO_2 = 0; 3,19; 7,98; 15,96; 23,94; 31,92; 63,84; 95,76$  и 159,6 мм рт. ст.; по оси абсцисс - значения  $pO_2$ , мм рт. ст.; по оси ординат - светопропускание образца ( $T$ , %) при длине волны 555 нм.

Детальный анализ кривых позволяет сделать ряд предварительных заключений. Падение светопропускания образца при  $pO_2=3,19$  мм рт. ст. по сравнению с начальной точкой (0 мм рт. ст.) может свидетельствовать о том, что десатурация молекул гемоглобина, инкубированного с НГ, происходила

очень медленно, и времени, отводимого согласно стандартной методике на дезоксигенацию HbO<sub>2</sub>, было недостаточно для полной десатурации образцов HbO<sub>2</sub> + НГ. Это указывает на повышенное сродство гемоглобина к кислороду в присутствии НГ. Инициатором такого рода явлений может быть NO, который, связавшись с одной из субъединиц белка, повышал сродство к кислороду других гемов [21], так что отдача кислорода затруднялась.

Дальнейшее увеличение парциального давления кислорода в тонометре до 23,94 мм рт. ст. вызывало нелинейный рост величины  $T_{555}$ , что указывает на происходящие в образце процессы связывания кислорода. Кривая сатурации практически выходила на уровень плато, зарегистрированный для нативного HbO<sub>2</sub>. При этом кривая оказалась сдвинутой влево относительно контрольной КДО, что подтверждает наше предположение о повышенном сродстве к кислороду гемоглобина человека, инкубированного с НГ.

Увеличение  $pO_2$  до 30-160 мм рт. ст. приводило к падению светопропускания раствора белка. Таким образом, достигнутый уровень оксигенации гемопротейда не сохранялся, выход КДО на плато не зарегистрирован.

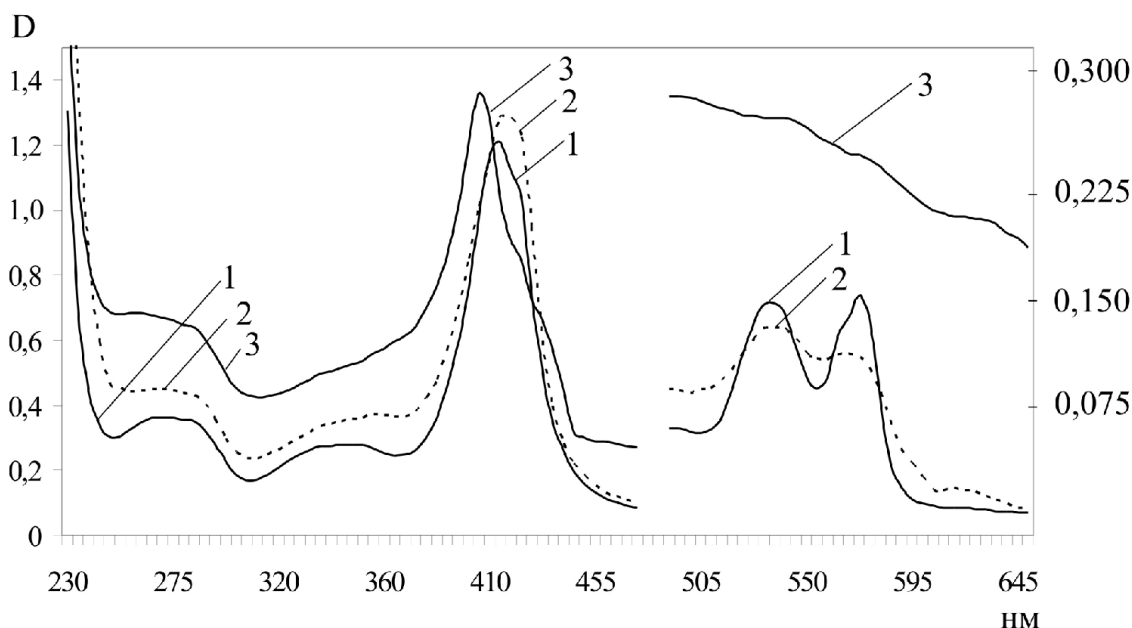
Для выявления скрытых изменений в структуре инкубированного с НГ гембелка мы проанализировали его спектральные характеристики после дезоксигенации и в процессе последующей оксигенации.

ЭСП дезоксигемоглобина человека характеризуется максимумами в видимой области спектра при 430, 555 и 585 нм [19]. На зарегистрированных нами ЭСП гемопротейда, инкубированного с НГ (5 мкг/мл), после дезоксигенирования его растворов выявлены полосы поглощения при 265, 406, 537, 580 и 630 нм (рис. 3, кривая 2).

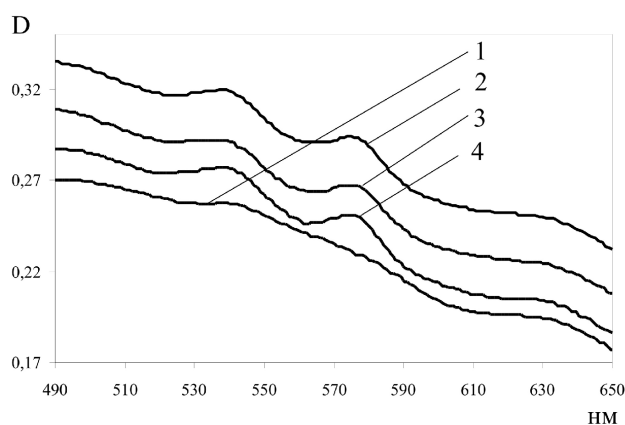
Таким образом, НГ в концентрации 5 мкг/мл индуцировал окисление железа гема на одном из этапов дезоксигенации и накопления метгемоглобина в образце. Однако, судя по форме спектров образцов HbO<sub>2</sub> + НГ, полного перехода гембелка в окисленную форму не происходило, так как максимум поглощения при 495-500 нм, характерный для МтНб, выражен очень слабо, и сохранялась  $\beta$ -полоса, присущая ферриформам гембелка.

Поэтапное увеличение парциального давления кислорода в образцах гембелка от 0 до 23,94 мм рт. ст. индуцировало повышение величины оптической плотности во всех регистрируемых максимумах (рис. 4, кривые 2, 3), так что  $\alpha$ - и  $\beta$ -полосы были выражены более четко, чем на ЭСП дезоксигенированного образца (рис. 4, кривая 1). Не выявлено изменения положения основных пиков поглощения белкового образца.

Дальнейшее повышение  $pO_2$  (31,92-159,6 мм рт. ст.) приводило к колебаниям величины оптической плотности при 265 нм и в  $\alpha$ - и  $\beta$ -полосах (рис. 4, кривая 4), необратимому её снижению в максимуме абсорбции полосы Соре. Не выявлено сдвигов положения основных пиков поглощения и появления новых максимумов.



**Рисунок 3.** Электронные спектры поглощения оксигемоглобина (1), нитрозогемоглобина (2) и инкубированного с нитроглицерином оксигемоглобина после дезоксигенации (3).  $\text{HbO}_2$  и  $\text{HbNO}$  - 10 мкМ; нитроглицерин - 5 мкг/мл. Инкубация с  $\text{HbO}_2$  - 20 мин при 37°C; дезоксигенация инкубированных образцов гемопротеида - 30 мин при  $p\text{O}_2=0$  мм рт. ст. по оси абсцисс - длина волны, нм; по оси ординат: слева - оптическая плотность образцов (D) в диапазоне длин волн 230-480 нм, справа - оптическая плотность (D) в диапазоне длин волн 490-650 нм.



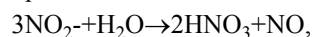
**Рисунок 4.** Электронные спектры поглощения в диапазоне длин волн 490-650 нм растворов оксигемоглобина человека, инкубированного с нитроглицерином, в процессе сатурации образцов.  $\text{HbO}_2$  - 10 мкМ; нитроглицерин - 5 мкг/мл. Инкубация в течение 20 мин при 37°C; дезоксигенация инкубированных образцов - 30 мин при  $p\text{O}_2=0$  мм рт. ст. Спектры регистрировали в герметичной кварцевой кювете при поэтапном увеличении  $p\text{O}_2$  до указанных значений; по оси абсцисс - длина волны, нм; по оси ординат - оптическая плотность образцов (D). 1-4 -  $p\text{O}_2=0$ ; 15,69; 23,94; 159,6 мм рт. ст. соответственно.

Таким образом, в присутствии НГ изменение содержания кислорода в среде приводило к переходу атома железа гемоглобина в окисленное состояние ( $\text{Fe}^{3+}$ ), в результате чего гемоглобин в ходе сатурации образца утрачивал способность связывать кислород, и мы регистрировали его остаточную функциональную активность.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Нами выявлена высокая устойчивость оксигемоглобина к окисляющему действию НГ при совместной инкубации в течение 0,3-3 ч. Не зарегистрировано изменений спектральных характеристик растворов  $\text{HbO}_2$ , инкубированного с НГ, в указанном временном интервале. Не выявлено образования  $\text{HbNO}$  или  $\text{MtHb}$  в течение первых 3 ч взаимодействия гемопротеина с НГ, что соответствует данным литературы [7, 22].

Инкубация образцов  $\text{HbO}_2$  с НГ в течение 24 ч индуцировала модификацию их физико-химических свойств. По нашему мнению, возможна следующая последовательность событий (табл. 2, левый столбец). Равновесие реакции  $\text{NO}_2^- \leftrightarrow \text{NO}$  в присутствии кислорода смещено в сторону образования окисленных продуктов [23]. В то же время,  $\text{NO}$  может образоваться в реакции



но это реакция третьего порядка, вероятность протекания которой достаточно низка, следовательно, продукты накапливаются очень медленно. Предполагается [24], что компоненты реакции концентрируются в гидрофобных полостях молекулы белка. В таком случае существование инкубационного периода может быть связано именно с тем, что на проникновение компонентов реакции во внутренние области молекулы и достижение минимальной необходимой для протекания реакций концентрации требуется определенное время. Поэтому в первые 3 ч инкубации  $\text{HbO}_2$  с НГ не наблюдается изменений спектральных характеристик гембелка.

# МОДИФИКАЦИЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ГЕМОГЛОБИНА

Таблица 2. Схема процессов взаимодействия гемоглобина человека с нитроглицерином в условиях различного кислородного режима

HbFe <sub>2</sub> <sup>+</sup> O <sub>2</sub> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>			
Длительность инкубации	pO <sub>2</sub> > 30 мм рт. ст.	pO <sub>2</sub> ≈ 20-30 мм рт. ст.	pO <sub>2</sub> < 20 мм рт. ст.
< 3 часов	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ⇌ NO (в присутствии кислорода восстановления нитрита не происходит)	HbFe <sup>2+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> → Hb(Fe <sup>2+</sup> O <sub>2</sub> ) <sub>x</sub> (Fe <sup>2+</sup> ) <sub>y</sub> + O <sub>2</sub>	+ -SH NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → NO (в условиях гипоксии восстановление нитратов активизируется),
> 3 часов	3NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> +H <sub>2</sub> O → 2HNO <sub>3</sub> +NO (накопление компонентов реакции в гидрофобных полостях белка) ↓ HS-HbFe <sup>2+</sup> O <sub>2</sub> + NO → NOS-HbFe <sup>2+</sup> O <sub>2</sub> (нитрозилирование Cys93β гемоглобина, снижение сродства S-нитрозогемоглобина к кислороду) NOS-HbFe <sup>2+</sup> O <sub>2</sub> → NOS-Hb(Fe <sup>2+</sup> O <sub>2</sub> ) <sub>x</sub> (Fe <sup>2+</sup> ) <sub>y</sub> + O <sub>2</sub> → Hb(Fe <sup>2+</sup> NO) <sub>x</sub> (Fe <sup>2+</sup> O <sub>2</sub> ) <sub>y</sub> (накопление дезоксиHb, частичное нитрозилирование гема) ↓	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → NO (в условиях гипоксии нитрит восстанавливается до NO) ↓ Hb(Fe <sup>2+</sup> NO) <sub>x</sub> (Fe <sup>2+</sup> O <sub>2</sub> ) <sub>y</sub> или Hb(Fe <sup>3+</sup> ) <sub>x</sub> (Fe <sup>2+</sup> NO) <sub>y</sub> (формирование гибридных комплексов) ↓	Hb(Fe <sup>2+</sup> (O <sub>2</sub> )) <sub>4</sub> → Hb(Fe <sup>2+</sup> O <sub>2</sub> ) <sub>x</sub> (Fe <sup>2+</sup> ) <sub>y</sub> + O <sub>2</sub> → HbFe <sup>2+</sup> + 4O <sub>2</sub> (одновременно происходит дезоксигенирование гемоглобина) ↓
<p>прямое окисление частично дезоксигенированного гемоглобина нитритом: Hb(Fe<sup>2+</sup>O<sub>2</sub>)<sub>x</sub>(Fe<sup>2+</sup>)<sub>y</sub> + NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → MtHbFe<sup>3+</sup> + NO, или автоокисление гемопротейда по механизму нуклеофильного замещения, индуцированное нитрит-ионами: Hb(Fe<sup>2+</sup>O<sub>2</sub>)<sub>x</sub>(Fe<sup>2+</sup>)<sub>y</sub> + H<sub>2</sub>O + NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → [HbFe<sup>2+</sup> ↔ <sup>H<sub>2</sub>O</sup> O<sub>2</sub>] → MtHbFe<sup>3+</sup> + O<sub>2</sub>• ↓ накопление свободнорадикальных продуктов: NO + O<sub>2</sub>• → ONOO<sup>-</sup>      ONOO<sup>-</sup> ↔ OH• + NO<sub>2</sub><sup>-</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup></p>			HbFe <sup>2+</sup> + NO → HbFe <sup>2+</sup> NO (в условиях низкой концентрации кислорода окислительные процессы блокируются, образуются NO и HbNO)

В оксигенированном (R-) состоянии у гемоглобина возрастает реактивность тиольного остатка цистеина Cys93β по отношению к NO [25], что приводит к образованию S-нитрозогемоглобина. Накопление NO-S-HbO<sub>2</sub> в сатурированных растворах гемоглобина косвенно подтверждено нами ранее: после взаимодействия HbO<sub>2</sub> с донорами NO не выявлено доступных для титрования SH-групп, заметные изменения претерпели спектральные характеристики гемопротейда в УФ-области [20].

Образование SNO-HbO<sub>2</sub> приводит к декомпактизации белковой глобулы и снижению сродства гемоглобина к кислороду [25]. Кроме того, при хранении наблюдается самопроизвольная диссоциация лиганда от атома железа гема. Подтверждением процессов десатурации HbO<sub>2</sub> служит зарегистрированное нами накопление дезоксигемоглобина в препаратах (табл. 1). В это время раствор содержит достаточно ионов NO<sub>2</sub><sup>-</sup>,

а концентрация NO ещё слишком мала, чтобы оксид азота заблокировал все центры связывания частично дегидрированного белка. Отсутствие лиганда в координационной сфере атома железа у части молекул гемоглобина делает Fe<sup>2+</sup> доступным для окисления NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. При накоплении NO последний с большой эффективностью соединяется с гемом белка, находящегося в дезокси (T-) конформации [26]. Таким образом, реакции нитрозилирования частично дезоксигенированного гемопротейна (Fe<sup>2+</sup>+NO→Fe<sup>2+</sup>NO) протекают конкурентно с образованием MtHb [10, 27]. Вследствие этого начинают формироваться гибридные комплексы Hb(Fe<sup>2+</sup>NO)<sub>x</sub>(Fe<sup>2+</sup>O<sub>2</sub>)<sub>y</sub> или Hb(Fe<sup>3+</sup>)<sub>x</sub>(Fe<sup>2+</sup>NO)<sub>y</sub> (табл. 2, центральный столбец), что подтверждается спектрофотометрическими данными: на ЭСП образцов сохраняется β-максимум, полоса Сорс сдвинута вправо по сравнению с таковой чистого метгемоглобина.

Возможно, происходит автоокисление части молекул оксигемоглобина по механизму нуклеофильного замещения, индуцированное нитрит-ионами и сопровождающееся генерацией АФК. Однако не установлено дозозависимого воздействия НГ на физико-химические и функциональные свойства оксигемоглобина человека в указанном диапазоне концентраций. Поэтому, на наш взгляд, окисление основной массы молекул гемоглобина происходит по свободнорадикальному механизму с участием АФК ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $ONOO^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  и др.), которые образуются при участии  $NO_2^{\cdot-}$ ,  $NO$ ,  $O_2$ ,  $HbO_2$ ,  $MtHb$  [28].

Для выявления роли переходных (частично лигандированных) состояний в нитрит-индуцированном окислении оксигемоглобина человека нами проанализированы его спектральные характеристики в присутствии НГ в условиях различного кислородного режима.

При дезоксигенации растворов гемопротейна (при регистрации КДО) в среде с пониженным содержанием кислорода возникают условия для осуществления ряда реакций. Нитрит-ионы восстанавливаются до  $NO$  ( $3NO_2^{\cdot-} + H_2O \rightarrow 2HNO_3 + NO$ ),  $HbO_2$  переходит в дезоксиформу. В условиях гипоксии (табл. 2, правый столбец) окисление полностью дезоксигенированного гемоглобина оставшимся нитритом представляется маловероятным. Во-первых,  $NO_2^{\cdot-}$  имеет большие (по сравнению с  $NO$ ) размеры и несет на себе заряд, что препятствует его проникновению в гидрофобную полость белка, окружающую гем, тогда как взаимодействие дезоксигемоглобина с  $NO$  ограничено только скоростью диффузии лиганда и практически необратимо. Во-вторых, молекулы гемоглобина при диссоциации  $O_2$  переходят в Т-конформацию, в которой атом железа гема обладает большим сродством к  $NO$ , чем в R-конформации [11]. В-третьих, связывание  $NO$  гемоглобином не носит кооперативного характера и не требует существенных изменений структуры белка [29, 30]. Поэтому, на наш взгляд, наиболее вероятным представляется накопление  $HbNO$  в среде инкубации.

Окисление атома железа гема происходит, когда величина парциального давления кислорода соответствует состоянию полунасыщения белка лигандом (около 20 мм рт. ст), поскольку вблизи этой точки гемоглобин становится крайне неустойчивым к воздействию окислителей [31]. Кислород не может конкурировать с  $NO$  за центры связывания на  $Fe^{2+}$  и вытеснять оксид азота из активного центра, окисленный атом железа  $Fe^{3+}$  не способен присоединять  $O_2$ . Таким образом, нам представляется, что механизм реакции образования метгемоглобина в присутствии  $NO_2^{\cdot-}$  сводится к тому, что при непосредственном участии нитрит-ионов или в результате процессов автоокисления частично дезоксигенированный гемоглобин переходит в метформу.  $MtHb$  участвует в образовании свободнорадикальных продуктов (супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), пероксинитрит ( $ONOO^{\cdot-}$ ) и др.), в присутствии которых процесс окисления ускоряется лавинообразно. Однако

в условиях нормального кислородного режима (при 24-часовой инкубации  $HbO_2$  с НГ) первая фаза (дезоксигенирование гемоглобина и его окисление) является более длительной, чем при пониженной концентрации  $O_2$  (при регистрации КДО).

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что необходимым мониторинг уровня оксигенации крови пациентов, длительное время регулярно принимающих НГ, для исключения негативного воздействия лекарственного препарата на физиологическую функцию гемоглобина.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы" (ФЦП ИР14-20) мероприятие 3.1.2. "Поддержка и развитие Центров коллективного пользования научным оборудованием" Соглашение № 14.593.21.0001, идентификатор проекта RFMEFI59314X0001.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Лупанов В.П. (2011) Мед. совет, **1-2**, 25-29.
2. Ткаченко Б.И., Евлахов В.И., Поясов И.З. (2003) Бюлл. экспер. биол. мед., **136**(9), 244-247.
3. Маишковский М.Д. (2012) Лекарственные средства, Новая волна, М., с. 393-394.
4. Zweier J.L., Samouilov A., Kuppusamy P. (1999) Biochim. Biophys. Acta, **1411**, 250-262.
5. Куроптева З.В., Реутов В.П., Байдер Л.М., Белая О.Л., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Молдалиев Ж.Т. (2011) Докл. Акад. Наук, **441**(3), 406-409.
6. Шперлинг И.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Михаленко А.Н., Шевцова Н.М., Наследникова И.О., Миллер А.А., Филиппова О.Н. (2011) Вестн. Рос. Воен.-Мед. Акад., **3**, 156-162.
7. Степура И.И., Маскевич С.А., Тутов В.Ю. (2012) Биохимия, **77**, 53-70.
8. Садвакас А.С. (2013) Инновации в науке, **17**, 155-162.
9. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Швалев В.Н., Космачевская О.В., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Свинов М.М., Косицын Н.С. (2012) Усп. физиол. наук, **43**, 73-93.
10. Кузенков В.С., Крушинский А.Л., Реутов В.П. (2011) Вестн. МГУ. сер.16: Биол., **1**, 3-6.
11. Reynolds J.D., Hess D.T., Stamler J.S. (2011) Transfusion, **51**, 852-858.
12. Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M.A., Rybak-Akimova E.V. (1998) Biochemistry, **37**, 10188-10194.
13. Блюменфельд Л.А. (1957) Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода, Сов. наука, М., 132.
14. Артюхов В.Г., Калаева Е.А., Путинцева О.В., Преображенский А.П. (2007) Биофизика, **52**(1), 24-32.
15. Артюхов В.Г., Калаева Е.А., Путинцева О.В. (2004) Физиология человека, **30**(2), 110-116.
16. Артюхов В.Г., Вашанов Г.А., Пенской К.П. Удостоверение на ращпредложение № 772 от 6.02.1989 г.
17. Стусь Л.К., Розанова Е.Д. (1992) Биофизика, **37**(2), 387-388.
18. Zwart A., Kwant G., Oeseburg B., Zijlstra W.G. (1984) J. Appl. Physiol., **57**, 429-434.

19. Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Калаева Е.А., Савостин В.С. (2013) Гемоглобин человека в условиях воздействия различных физико-химических агентов. Издательско-полиграфический центр Воронеж. гос. ун-та, Воронеж, 364 с.
20. Путинцева О.В. (2007) Структурно-функциональные свойства некоторых лигандных форм гемоглобина человека в условиях УФ-облучения и различного микроокружения. Дисс. докт. наук. Воронежский госуниверситет, Воронеж.
21. Doctor A., Stamler J.S. (2011) *Compr. Physiol.*, **1**(1), 541-568.
22. Кудрявцев М.Е., Дмитриева О.Н., Куроптева З.В. (1996) *Изв. РАН. Сер. биол.*, **4**, 453-459.
23. Реутов В.П. (2002) *Биохимия*, **67**, 353-376.
24. Недоспасов А.А., Беда Н.В. (2005) *Природа*, **7**, 35-42.
25. Perutz M.F. (1996) *Nature*, **380**(6571), 205-206.
26. Stamler J.S., Jia L., Eu P., McMahon T.S., Demchenko I.T., Bonaventura J., Gernet K., Piantadosi C.A. (1997) *Science*, **276**, 2034-2037.
27. Стародубцева М.Н., Игнатенко В.А., Черенкевич С.Н. (1999) *Биофизика*, **44**, 1068-1072.
28. Satoh Y., Shikama K. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 10272-10275.
29. Hille R., Olson J.S., Palmer G. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 12110-12120.
30. Yonetani T., Tsuneshige A., Zhou Y., Chen X. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 20323-20333.
31. Иржак Л.И. (1975) Гемоглобины и их свойства. Наука, М., 240 с.

Поступила: 01. 02. 2016.  
Принята к печати: 04. 04. 2016.

## THE MODIFICATION OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF HUMAN HEMOGLOBIN INDUCED BY NITROGLYCERIN UNDER DIFFERENT OXYGEN REGIME CONDITIONS

*V.G. Artyukhov, E.A. Kalaeva, O.V. Putintseva, A.I. Polyubez'eva*

Voronezh State University,  
1 Universitetskaya sq., Voronezh, 394018 Russia; fax: +7(473)220-87-55; e-mail: office@main.vsu.ru

Human oxyhemoglobin exhibits high resistance to nitroglycerin during incubation of the protein with this compound for 0.3-3 h. Prolonged exposure (24 h) leads to activation of methemoglobin production. In the presence of nitroglycerin hemoglobin molecules undergo rapid oxidation during deoxygenation with formation of methemoglobin as the terminal product of human oxyhemoglobin interaction with nitroglycerin. The scheme of interaction processes of oxyhemoglobin with nitroglycerin in different conditions of oxygen regime is proposed. Partially deligated hemoglobin plays the leading role in the initiation of hemoglobin oxidation processes.

**Key words:** hemoglobin, oxygen-binding properties, oxyhemoglobin dissociation curve, nitroglycerin, nitric oxide, electron absorption spectrum