

NO-ЗАЛЕЖНА ЗМІНА СПІВВІДНОШЕННЯ ЛІГАНДНИХ ФОРМ ГЕМОГЛОБІНУ У ПЕРИФЕРИЧНІЙ КРОВІ ЛЮДЕЙ

К. Дудок, О. Канюка, А. Федорович, В. Бурда, Н. Сибірна

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: kanokaol@yahoo.com

У результаті проведених досліджень електронних спектрів різних лігандних форм гемоглобіну показано зміну конформаційного стану гемоглобіну при додаванні донора нітроген оксиду – натрій нітриту. Отримані результати свідчать про те, що за дії нітрит-іона реакція з гемоглобіном може відбуватися у декілька етапів. Один із них – утворення метгемоглобіну як проміжної сполуки, яка у подальшому переходить у нітрозилформу. Було показано, що при взаємодії натрій нітриту оксигемоглобін повністю переходить у метформу і лише при взаємодії дезоксигемоглобіну з цим донором оксиду азоту утворюється нітрозилгемоглобін. Також уперше було розраховано коефіцієнт переходу метгемоглобіну у нітрозилгемоглобін, який перебував у межах 2,67–3,3. Отримані нами дані свідчать, що лише третина метгемоглобіну за даних умов реакції переходить у нітрозилгемоглобін. Згідно з отриманими даними, можна також зробити висновок, що ще одна лігандна форма гемоглобіну – ціанметгемоглобін – не переходить у нітрозилформу при додаванні натрій нітриту.

Ключові слова: гемоглобін, лігандні форми гемоглобіну, нітрозилгемоглобін, електронні спектри, нітрити.

Периферична кров є тісною системою, на якій позначається дія на організм токсичних хімічних сполук довкілля, фізичних чинників, зв'язування і транспорт ендогенних метаболітів та біологічно активних екзогенних сполук. Перш за все, це стосується кисневотранспортної, імунної та інших функціональних систем крові. Молекулярною основою дихальної функції крові є гемоглобін, і йому належить важливе місце у складній системі регуляції постачання тканин киснем. Також іншою, не менш важливою, функцією гемоглобіну є його участь у транспорті CO_2 . Деоксигенований гемоглобін (RHb) і деякі його похідні можуть виконувати антитоксичну функцію. Так, метгемоглобін (MetHb) відіграє важливу функцію як за фізіологічних умов, так і за патологій, інактивує отрути різного походження (сульфіди, ціаніди, нітрати тощо). Гемоглобін здатен легко взаємодіяти з таким лігандом як CO, утворюючи стійкий комплекс – карбоксигемоглобін (HbCO), а також здатний активно реагувати з таким лігандом як NO, оскільки його спорідненість до NO значно вища, ніж до O_2 . Утворені лігандні форми гемоглобіну мають важливе фізіологічне значення. Крім того, висока чутливість гемоглобіну до NO може виступати відповідним сенсором, за яким можна судити про ступінь оксигенації та деоксигенації гемоглобіну за різних патологічних станів, наслідком яких є гіпоксія, активація вільнорадикальних процесів, підвищення рівня активних форм Оксигену (АФО) [3]. У літературі є достатня кількість інформації, згідно з якою NO оцінюється як клітинний месенджер із різними фізіологічними функціями. Він здатний утворювати пероксинітрити при взаємодії зі супероксидним радикалом [3].

Існує кілька шляхів утворення нітроген оксиду і регуляція його рівня *in vivo*. Основний шлях за участю активності ендотеліальної NO-синтази. Інший – через гем-

оксигеназну систему (НО-х), зміна рівня якої корелює зі ступенем парціального тиску кисню у тканинах. У зв'язку з цим на особливу увагу заслуговує гем, який утворюється у результаті розпаду гемоглобіну і який може претендувати на роль сенсора.

Вільний гем є прооксидантом, оскільки безпосередньо бере участь в окисно-відновних реакціях. Перетворення вивільненого з гемоглобіну гему в реакціях, які каталізуються гемоксигеназною системою, призводить до утворення Fe^{3+} , який є потенційним індуктором вільнорадикального окиснення. Важливо те, що НОх-система запускає ряд механізмів, які, знову ж, обмежують вільнорадикальне окиснення. Найбільш важливим є утворення білірубину, який, у свою чергу, проявляє антиоксидантні властивості, а також індукує синтез Fe-зв'язуючих білків, зокрема, синтез NO-синтази. Крім того, ізоформа гем-оксигенази НОх-2 зв'язує NO у специфічному гем-акцепторному сайті, що слугує своєрідним внутрішньоклітинним буфером для цього метаболіту [3].

Особливий інтерес до нітрозильних комплексів гемопротеїнів, зокрема гемоглобіну, був викликаний ще й тим, що ці комплекси виконують важливі біологічні функції.

Характеризуючи різні лігандні форми гемоглобіну, а також перехід їх одна в одну, особливу увагу необхідно звернути на особливості атома Феруму гему. Відомо, що стан центрального атома гему Феруму у складі комплексних сполук може перебувати у високо спіновому (Т-напруженому) чи низькоспіновому (R-розслабленому) стані залежно від способу заповнення *d*-орбіталей електронами, а також визначається характером лігандного оточення, симетрією та силою зв'язування лігандів у комплексі. Спіновий стан визначається характером лігандного оточення іона металу, а взаємодія з лігандами може призвести до переходу цього стану, що у свою чергу, сприятиме зміні конформації білка, з яким зв'язаний цей іон [7].

Очевидно, що утворення нітрозильних комплексів гемоглобіну в результаті приєднання NO супроводжується зміною електронного стану Феруму, що призводить до зміни властивостей гему і, як наслідок, зміни конфірмаційного стану молекули білка загалом.

Незважаючи на велике число публікацій, що присвячені вивченню NO-похідних гемоглобіну, багато питань у цій галузі залишаються відкритими.

Очевидно, функції гемоглобіну на цьому не обмежуються, тому дослідження фізико-хімічних і функціональних його властивостей з використанням сучасних методичних підходів розширюють наші знання про цей гемопротеїн.

Метою роботи було дослідити зміну лігандних форм гемоглобіну в системі *in vitro* за дії донора нітроген оксиду – натрій нітрату.

Матеріали і методи

Для аналізів використовували цільну периферичну кров практично здорових донорів та гемоглобін, виділений із крові цих донорів.

Кров відбирали загальноприйнятим методом із ліктьової вени з використанням ЕДТА як антикоагулянту. Еритроцити відділяли від плазми шляхом центрифугування при 500 g та відмивали від плазми крові ізотонічним розчином NaCl (0,150 M). Процедуру відмивання повторювали 5 разів при 500 g. Гемоглобін виділяли за методикою Драбкіна [5]. Для відділення строми мембран додатково проводили центрифугування при 20 800 g. Концентрацію гемоглобіну визначали за методом Кушаковського у модифікації Н. О. Сибірної [5]. Визначення 5 лігандних форм гемоглобіну: дезокси-, окси-, карбокси-, сильф- і метформи (RHb, HbO₂, COHb, SHb, MetHb) у цільній крові проводили за методом [1]. Для спектроскопічних аналізів використовували гемоглобін в оксиформі, метформі та у ціанметформі (CNMetHb). Дезоксигемоглобін отримували з оксигемоглобіну шляхом

додавання натрій гідросульфїту ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) з розрахунку 0,83 мг на 1мл HbO_2 . Для отримання нітрозилформи гемоглобіну до дезоксигемоглобіну додавали натрій нітрит (NaNO_2), який вносили еквімолярно концентрації гемоглобіну. Перехід однієї лігандної форми в іншу контролювали спектрофотометрично на спектрофотометрі Specord M-40 (Німеччина) у діапазоні довжин хвиль 490–640 нм. Метгемоглобін отримували переведенням оксигемоглобіну з використанням калій гексаціаноферату ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$). Кількісне визначення метгемоглобіну проводили за методом Родки та О'Нїла [8]. Електронні спектри різних лігандних форм гемоглобіну реєстрували за допомогою спектрофотометра Specord M-40 (Німеччина).

Результати і їхнє обговорення

Багаторічні систематичні дослідження фізико-хімічних і функціональних особливостей гемоглобіну свідчать про невичерпні властивості цього гемопротейну. Увага до вивчення гемоглобіну пов'язана з динамічністю його структури, здатністю реагувати з різними ендogenous метаболітами та хімічними сполуками екзогенного походження, змінюючи свою функцію. З огляду на це, гемоглобін може виступати унікальним індикатором за різного типу захворювань і дії шкідливих факторів оточення. Тому важливим тестом у біохімічних дослідженнях і клінічній практиці є визначення різних параметрів гемоглобіну у периферичній крові.

У досліджуваних зразках донорської крові було проведено визначення загального вмісту гемоглобіну, кисневої ємності та співвідношення лігандних форм гемоглобіну (табл. 1). Кисневу ємність визначали з урахуванням лише вмісту оксигемоглобіну. Вміст HbO_2 у гемолізатах периферичної крові здорових пацієнтів перебував у межах 95–98 %. Середнє значення вмісту метгемоглобіну відповідало середньостатистичному значенню для здорових донорів.

Таблиця 1

Вміст лігандних форм гемоглобіну в гемолізатах досліджуваних зразків донорської крові ($M \pm m$), ($n = 7$)

Лігандні форми гемоглобіну					Вміст гемоглобіну, г/л	Киснева ємність O_2 , V/%
% RHb	% bHbO ₂	% HbCO	% HbS	% MetHb		
1,29 ± 0,36	97,14 ± 1,48	2,03 ± 0,68	0,04 ± 0,02	1,33 ± 0,06	129,60 ± 8,03	16,39 ± 0,79

Киснево-транспортна функція гемоглобіну забезпечується спорідненістю до кисню, в чому і полягає його найважливіше фізіологічне значення. Отримані результати є важливими, оскільки ступінь оксигенації гемоглобіну, його спорідненість до кисню залежить не лише від загальної кількості гемоглобіну, від реакції дезоксигемоглобін ↔ оксигемоглобін, але й від перерозподілу лігандних форм і кисневої ємності.

Спорідненість гемоглобіну до кисню – це саморегульована система, але у процесі дихального циклу і кругообігу крові може змінюватися завдяки зміні рН, CO_2 , NO та дії інших факторів ендogenous чи екзогенного походження [2].

Зважаючи на процеси, які супроводжуються утворенням нітрозилгемоглобіну та нітрозогемоглобіну за дії NO-похідних сполук і їхній вклад у процеси постачання органів і тканин киснем, важливим етапом дослідження є пошуки методичних підходів до ідентифікації та порівняльного визначення співвідношення цих лігандних форм у периферичній крові.

Як було відмічено вище, утворення різних лігандних форм гемоглобіну супроводжується зміною їхніх конформаційних станів, які зручно реєструвати спектроскопічними методами.

Було проведено порівняльні спектrophотометричні дослідження спектрів поглинання оксигемоглобіну, дезоксигемоглобіну та його перехід у нітрозилгемоглобін (рис. 1).

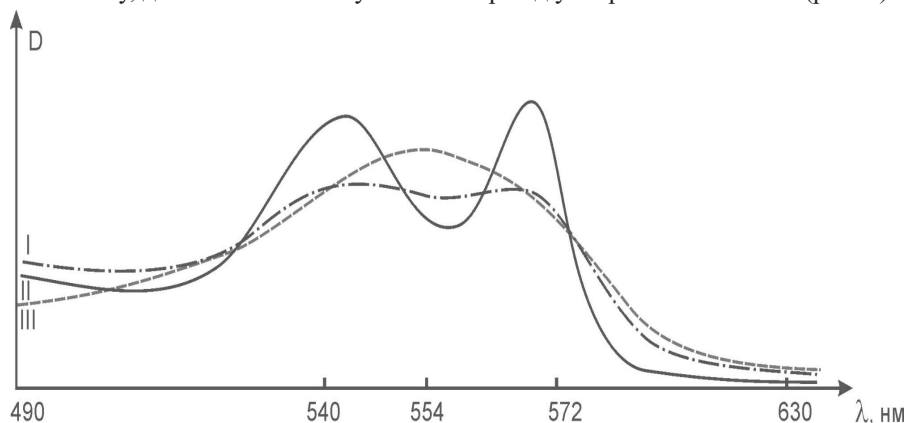


Рис. 1. Типові спектри поглинання окремих лігандних форм гемоглобіну: спектр I – HbNO; спектр II – HbO₂; спектр III – RHb. Характеристичні максимуми поглинання: HbNO – дві широкі смуги з вираженими максимумами поглинання при 544,8 нм і 572,2 нм; HbO₂ – дві смуги при 541,4 нм і 576,6 нм; RHb – смуга з максимумом при 554,9 нм

При додаванні розчину натрій нітриту до 10 мкМ розчину дезоксигемоглобіну зафіксовано характеристичний спектр поглинання для нітрозилгемоглобіну зі смугами при 544,8 нм і 572,2 нм (рис. 1, спектр I).

В умовах експерименту нами не було виявлено утворення нітрозилгемоглобіну в реакції оксигемоглобін – розчин NaNO₂. Оксигемоглобін повністю переходив у метформу. В еритроцитах NO окиснюється оксигемоглобіном (HbO₂) до нітрату, в той час як HbO₂ безпосередньо окиснюється до MetHb. Донором NO може виступати також нітрит, який теж окиснюється HbO₂ до нітрату з утворенням MetHb. Однак при цьому може утворюватися і проміжний продукт ферогемоглобін (тобто HbFe^(IV)=O), а не MetHb (тобто HbFe^(III)). У функціонально здорових еритроцитах людини за нормальних умов, тобто при високому молярному надлишку HbO₂ (наприклад, 8 мМ) відносно концентрації нітриту (наприклад, 2 мкМ), проміжний продукт HbFe^(IV)=O повністю перетворюється в MetHb.

Побутує думка, що за дії нітросполук на організм утворюється нітрозилгемоглобін, нітрозогемоглобін і метгемоглобін. Для з'ясування механізмів утворення різних лігандних форм гемоглобіну ми провели у системі *in vitro* визначення вмісту метгемоглобіну у зразках гемолізатів після додавання розчину NaNO₂ (рис. 2). Вміст метгемоглобіну у досліджуваних зразках становив 0,98 ± 0,36 %, а після переведення у нітрозилформу – 0,85 ± 0,60 %. Отримані результати свідчать про те, що за дії нітритів чи нітратів реакція з гемоглобіном може проходити у кілька етапів. Один із них – утворення метгемоглобіну як проміжної сполуки, що в подальшому переходить у нітрозилформу.

Важливим етапом роботи було дослідження електронних спектрів поглинання метгемоглобіну до реакції з розчином NaNO₂ та після. На рис. 2 представлені спектри поглинання MetHb (I), типовий спектр HbNO (II) і спектр поглинання гемолізатів, переведених у метформу після додавання реагенту (розчину NaNO₂) (III).

Електронний спектр I – це типовий спектр MetHb, який характеризується максимумами при 500 нм і 630 нм. Крива III має смугу з максимумом поглинання при 630 нм, також має виражений максимум при 540 нм, характерний для HbNO, слабо виражений максимум у межах 560–700 нм і відсутній максимум при 500 нм.

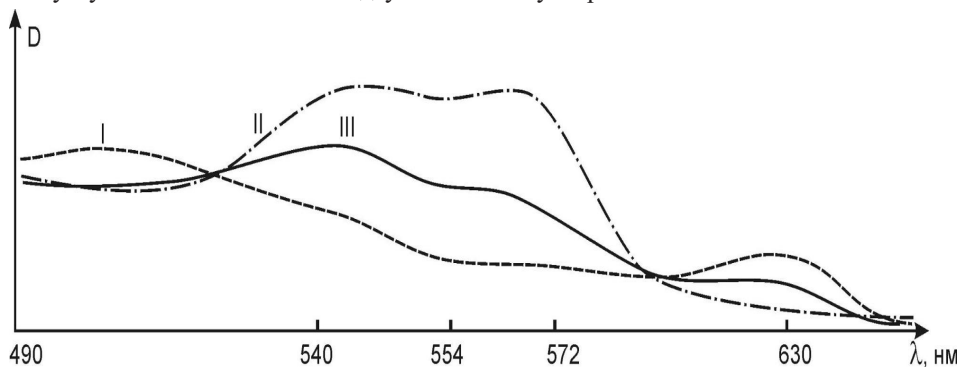


Рис. 2. Типові порівняльні спектри поглинання, які характеризують нітрозилгемоглобін та перехід метгемоглобіну в нітрозилгемоглобін: Спектр I – MetHb, з характеристичними максимумами поглинання при 499,9 нм і 629,9 нм; Спектр II – HbNO переведений з RHb з максимумами поглинання при 544,5 нм і 572,2 нм; Спектр III – спектр поглинання розчину MetHb після реакції з NO (утворення HbNO), – широка смуга з вираженим максимумом при 538 – 540 нм і 629,9 нм

За методикою Родкі і О'Ніл у досліджуваних зразках гемолізатів проводили контроль метгемоглобіну до і після реакції з розчином NaNO_2

Таблиця 2

Вміст метгемоглобіну у зразках досліджуваних гемолізатів периферичної крові здорових донорів розчином NaNO_2 , ($M \pm m$), ($n = 3$)

Вміст метгемоглобіну після переведення $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, %	Вміст метгемоглобіну після реакції з розчином NaNO_2 , %	Різниця, вмісту метгемоглобіну, %	Відносна кількість утвореного HbNO з MetHb, %
$79,85 \pm 6,51$	$53,33 \pm 2,43$	$26,52 \pm 4,35$	$33,21 \pm 2,5$

Порівнюючи спектри поглинання досліджуваних гемолізатів з урахуванням поглинання при 630 нм ми підраховали співвідношення максимумів поглинання. Ступінь переходу метгемоглобіну у нітрозилгемоглобін розраховували за різницею співвідношення поглинання при 630 нм переведеного оксигемоглобіну в метформу та переведеного метгемоглобіну в нітрозилгемоглобін (D_{630}/D'_{630}). Вирахований таким способом коефіцієнт перебував у межах 2,67–3,3. Це свідчить, що лише третина метгемоглобіну за даних умов реакції переходить у нітрозилгемоглобін.

Отримані результати розрахунків вмісту метгемоглобіну при визначенні його кількості хімічним методом збігаються з даними спектрометричних аналізів. Останній підхід може бути використаний для визначення вмісту нітрозилгемоглобіну в гемолізатах периферичної крові.

На рис. 3 представлені порівняльні спектри поглинання CNMetHb (спектр I) та після реакції з розчином NaNO_2 (спектр II).

Результати проведених досліджень дають підстави вважати, що утворений у реакції NO не може витіснити CN-групи з комплексу CNMetHb. Виявлена смуга у ділянці 550–560 нм зі слабо вираженим максимумом може бути обумовлена впливом нітрозогемоглобіну за рахунок нітрозилування цистеїну (93) в β -ланцюгах [6, 9].

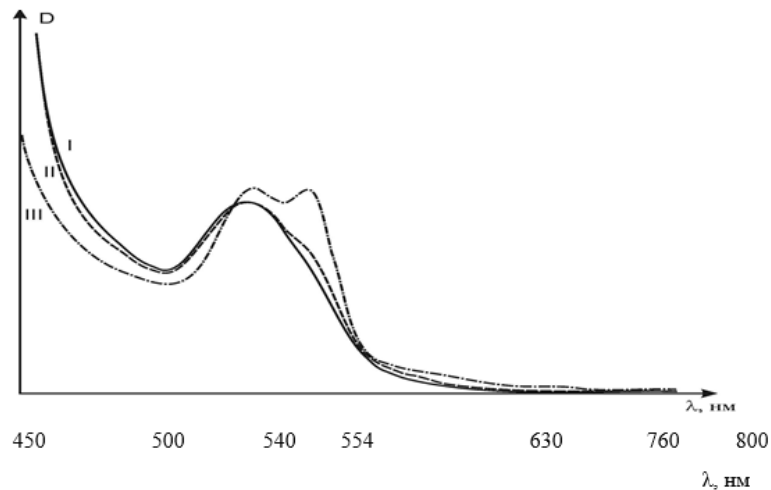


Рис. 3. Типові спектри поглинання лігандних форм гемоглобіну: Спектр I – *CNMetHb*; Спектр II – *CNMetHb* після реакції переведення у *HbNO*; Спектр III – *RHb* переведений у *HbNO*

Отримані нами результати експериментальних досліджень однозначно свідчать про важливу біологічну роль нітрозильних комплексів гемоглобіну у зміні функціональних властивостей гемоглобіну в цілому. Результати розрахунку коефіцієнта переходу в нітрозилгемоглобін визначені хімічним методом і за даними спектрометричних аналізів можуть бути використані для визначення вмісту нітрозилгемоглобіну у гемолізатах периферичної крові.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білий О. І., Дудок К. П., Лук'янець В. М. Визначення вмісту гемоглобіну та його лігандних форм у цільній крові за методом абсорбційної спектроскопії. Львів: Вид-во ЛДУ, 1998. 12 с.
2. Дударев В. П. Роль гемоглобина в адаптации к гипоксии и гипероксии. К.: Наук. думка, 1979. 149 с.
3. Жукова А. Г., Сазонтова Т. Г. Гем-оксигеназа: функция, регуляция, биологическая роль // *Нурохіа Medical J.* 2004. Т 12. С 30-44.
4. Зинчук В. В. Газотранспортная функция крови и NO // *Журнал Гр ГМУ.* 2009. № 2. С34-37.
5. Сибірна Н. О., Великий М. М. Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові: метод. посіб. Львів: ЛДУ, 1997. 69 с.
6. Vçhtera A., Pichb A., Schmidta M., Haghikiac A., Tsikasa D. Evidence by chromatography and mass spectrometry that inorganic nitrite induces S-glutathionylation of hemoglobin in human red blood cells // *Journal of Chromatography B.* 2016. Vol. 1019. P. 72-82.
7. Perutz M. F. Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron // *Ann. Rev. Biochem.* 1979. Vol. 48. P. 327-386.
8. Rodkey F.L., O'Neal J.D. Effect of carboxyhemoglobin on the determination of metgemo-globin in blood // *Biochem. Medicine.* 1974. Vol. 9. P. 261-270.
9. Xu X., Cho M., Spencer N.Y. et al. Measurements of nitric oxide on the heme iron and-93 thiol of human hemoglobin during cycles of oxygenation and deoxygenation // *PNAS.* 2003. Vol. 100 (20). P. 11304-11308.

Стаття: надійшла до редакції 28.07.16

доопрацьована 31.08.16

прийнята до друку 1.09.16

**NO-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ ЛИГАНДНЫХ ФОРМ
ГЕМОГЛОБИНА В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛЮДЕЙ****К. Дудок, Е. Каниюка, А. Федорович, В. Бурда, Н. Сибирная***Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: kanokaol@yahoo.com*

В результате проведенных исследований электронных спектров различных лигандных форм гемоглобина показано изменение конформационного состояния гемоглобина при добавлении донора оксид азота - натрий нитрита. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при действии нитрит-иона реакция с гемоглобином может проходить в несколько этапов. Один из них - образование метгемоглобина как промежуточного соединения, которое в дальнейшем переходит в нитрозилформу. При взаимодействии натрия нитрита с оксигемоглобином было зафиксировано полное превращение гемоглобина в метформу и только при взаимодействии дезоксигемоглобина с этим донором оксида азота образуется нитрозилгемоглобин. Также впервые был рассчитан коэффициент перехода метгемоглобина в нитрозилгемоглобин, который находился в пределах 2,67–3,3. Полученные нами данные свидетельствуют, что лишь треть метгемоглобина при данных условиях реакции переходит в нитрозилгемоглобин. Согласно полученным данным, можно сделать вывод, что еще одна лигандная форма гемоглобина - цианметгемоглобин – не переходит в нитрозилформу при добавлении натрий нитрита.

Ключевые слова: гемоглобин, лигандные формы гемоглобина, нитрозил гемоглобин, электронные спектры, нитриты.

**NO-DEPENDENT CHANGING OF THE LIGAND FORM
OF HEMOGLOBIN IN PERIPHERAL BLOOD OF PEOPLE****K. Dudok, O. Kaniuka, A. Fedorovich, V. Burda, N. Sybirna***Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: kanokaol@yahoo.com*

As a result of research electronic spectra of the different ligand forms of hemoglobin shows the change of hemoglobin conformational state while adding nitrogen oxide donor - sodium nitrite. The results indicate that the action by the nitrite- ion reaction with hemoglobin can take place in several stages. One of them - methemoglobin formation as an intermediate compound that subsequently enters to nitrosylform. It was shown that the interaction of sodium nitrite was recorded oxyhemoglobin complete conversion of hemoglobin in metform and with only the interaction deoxygenate hemoglobin with the donor nitrogen oxide formed nitrosylhemoglobin. Also for the first time calculated the conversion factor of methemoglobin in nitrosylhemoglobin, which was within the 2.67 - 3.3. Our data show that only a third of methemoglobin reaction under these conditions proceeds in nitrosylhemoglobin. According to the data, we can also conclude that the ligand is another form of hemoglobin - cyanmethemoglobin not go into nitrosylform when added sodium nitrite.

Keywords: hemoglobin, ligand forms of hemoglobin, nitrosylhemoglobin, electronic spectra, nitrites.