

УДК 581.134.4

**МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ФОРМЫ ГЕМОГЛОБИНА КАК ИНСТРУМЕНТ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ****А.Ф. Топунов¹, О.В. Космачевская¹, Э.И. Насыбуллина¹, Н.Н. Новикова²**¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, РАН, Москва, Россия² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

Для диагностики очень информативными являются данные о состоянии гемоглобина (Hb) и эритроцитов. Выделяют гемоглобинопатии – состояния, связанные с нарушением структуры и функционирования Hb. Наследственные гемоглобинопатии обусловлены мутациями в генах, кодирующих Hb, например, серповидно-клеточная анемия [1, 2]. Известно несколько сот аномальных Hb, но не все приводят к клиническим проявлениям [3]. Приобретенные связаны с действием различных соединений на Hb, в том числе при заболеваниях и действии токсикантов. Изменения структуры Hb могут приводить к нарушению кислородпереносящей функции и стабильности эритроцитов, а также затрудняют их прохождение по микрососудам. Патогенез гемоглобинопатий обусловлен связью между структурой Hb и свойствами эритроцита (форма, деформируемость, агрегация), что сказывается на гемолитической устойчивости и реологических свойствах крови. Опишем некоторые модифицированные формы Hb и процессы, приводящие к этим изменениям.

Восстановление и окисление гемоглобина и метгемоглобинемия. Гемоглобины поддерживаются в физиологически активном восстановленном состоянии (с 2-валентным железом гема) благодаря NADH- и NADPH-зависимыми редуктазам [4–6]. При недостаточной активности редуктаз проявляется такое заболевание, как метгемоглобинемия, когда заметная доля Hb находится в окисленном состоянии. Заболевание может быть наследственным, или вызываться некоторыми соединениями [5–7]. Второй вид в англоязычной литературе традиционно называется «drug» (лекарственным), поскольку к нему может привести применение многих лекарственных препаратов.

Еще в 1959 г. было показано, что в эритроцитах больных наследственной метгемоглобинемией недостаточно активен фермент, восстанавливающий окисленный MetHb с NADH в качестве донора электронов [8] – метгемоглобинредуктаза (мет-Hb-редуктазы). Она восстанавливает MetHb при участии цитохрома b₅ как промежуточного переносчика электронов. Показана идентичность мет-Hb-редуктазы эритроцитов и цитохром b₅-редуктазы других тканей [9], и они внесены в номенклатуру ферментов под одним названием – NADH: феррицитохром b₅-оксидоредуктаза (К.Ф. 1.6.2.2.).

Большое распространение метгемоглобинемии обнаружено у эскимосов и индейцев-атабасков Аляски, и у индейцев навахо. В России она отмечена в виде эндемических очагов в Якутии в бассейне реки Вилюй [7]. У коренных жителей (якутов-саха) очень высокое распространение этого заболевания: 1:5700 человек. Накопление заболевания могло произойти благодаря «эффекту основателя» – ограниченной репродуктивной численности у предковых изолированных популяций.

Существует два типа недостаточности мет-Hb-редуктазы: «эритроцитарный» – только в эритроцитах, и «основной», когда она наблюдается и в других тканях. Еще одна энзимопатия – дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (фабизм) является фактором риска для приобретенной метгемоглобинемии, поэтому популяции, для которых она характерна (средиземноморского и африканского происхождения), обладают повышенным риском для проявления заболевания.

Взаимодействие с оксидом азота и его производными. Гемоглобины способны взаимодействовать с активными формами кислорода (АФК) и азота (АФА), то есть функционировать в условиях окислительного и нитрозативного стрессов. Считается, что первоначальной функцией Hb была защита клеток от нитрозативного стресса и модулировании сигнальной функции NO, поэтому общей для большинства известных Hb является реакция превращения NO в NO₃. У животных NO образуется благодаря NO-синтазной реакции, при окислении L-аргинина в L-цитруллин. Поскольку для окисления L-аргинина нужен O₂, реакция ингибируется при гипоксии. В то же время дефицит O₂ активизирует работу нитритредуктазных систем, в том числе связанных с Hb и миоглобином (Mb). При гипоксии восстановление ионов NO₂ – до NO в крови и тканях идет с помощью деоксигенированных Hb (deoxyHb) и Mb (deoxyMb). Mb проявляет NO-диоксигеназную активность и защищает митохондриальную цитохром с-оксидазу от инактивации оксидом азота как в скелетных и сердечных мышцах, где Mb много, так и в гладких, где его намного меньше [10–13]. То есть Mb не только генерирует NO при гипоксии [14], но и окисляет до NO₃ – при обычной концентрации O₂.

Hb-SNO (у которого NO присоединен к цистеину) оказывает сосудорасширяющее действие и усиливает кровоток в сосудах [15]. Доля образующихся нитрогемоглобина (HbNO) и Hb-SNO зависит от насыщения Hb кислородом. Предполагается, что деохиHb может работать как S-нитрозотиол-синтаза, используя в качестве субстрата нитрит [16]. Есть еще один путь связывания NO с Hb, помимо железа гема и цистеина β93. На тиольной группе этого цистеина могут формироваться динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) [17, 18]. Мы показали, что Hb-ДНКЖ действуют как сайт-специфические антиоксиданты, защищающие белок от окислительной модификации [19, 20]. Таким образом, HbNO, Hb-SNO и ДНКЖ образуют пул депонированного NO в организме.

Взаимодействие с активными формами кислорода. Важным является и взаимодействие Hb с пероксидом водорода (H_2O_2) и другими АФК, поскольку Hb проявляет пероксидазную активность и может инициировать свободнорадикальное окисление биомолекул под действием H_2O_2 [21]. При реакции оксиHb с избытком H_2O_2 происходит быстрое образование metHb. Он может образовываться и в результате автоокисления Hb. Взаимодействие оксигенированного Hb (HbO₂) и metHb с H_2O_2 может протекать через образование феррил-формы Hb {Гем+• (FeIV) – OH} со свободным радикалом на порфириновом кольце. Эта форма нестабильна, характеризуется высокой окисляющей активностью и индуцирует реакции свободнорадикального окисления липидов. При этом образуются алкоксильные (RO•) и алкилпероксильные (ROO•) радикалы и гидроперекиси липидов (ROOH), которые также могут окислять metHb с образованием новых порций феррил Hb. Нами совместно с Институтом физико-химической медицины, Белорусским госуниверситетом и НПЦ «Кардиология» (Минск) разработан удобный спектрофотометрический метод определения пероксидазной активности Hb [22].

При автоокислении охуHb образуется супероксид-анион-радикал $O_2^{\bullet-}$, который при взаимодействии с NO образует сильный окислитель пероксинитрит ($ONOO^-$), для которого гемопротейды являются основными мишенями. Его взаимодействие с охуHb и охуMb приводит к образованию мет-форм, повреждению порфиринового кольца, нитрованию тирозина, выходу гема из гидрофобного кармана, его высвобождению и разрушению [23].

Гликозилирование гемоглобина – связывание с активными карбонильными соединениями, в том числе с сахарами. Hb был первым белком, для которого был описан этот процесс [24], и была показана его взаимосвязь с диабетом [25]. Гликозилированный Hb человека типа А обозначается как HbA1. Эта фракция есть у здоровых людей (5–7 %) [26]. В зависимости от природы сахара, связанного с Hb, различают субфракции HbA1. HbA1a1 образуется в результате взаимодействия с фруктозо – 1,6 – дифосфатом, HbA1a2 – глюкозо-6-фосфатом, HbA1c – глюкозой [27].

Неферментативное гликозилирование, это химическая конденсация белка с моносахаридом и дальнейшее превращение этого соединения. Альдегидная группа глюкозы соединяется с аминогруппой аминокислот, образуется альдимин или Шиффово основание, которое подвергается перегруппировке Амадори с образованием стабильной кетоаминной формы – конечного продукта гликозилирования, остающегося в эритроцитах до конца их жизни. Как правило, местом гликозилирования Hb является аминная группа N-концевой аминокислоты (валин) обеих β-цепей гемоглобина А (HbA1c). Есть данные, что углеводы способны присоединяться и к ε-аминогруппе остатков лизина как α-, так и β-цепей [28]. Доля гликозилированных белков повышается при таких заболеваниях, как сахарный диабет, галактоземия, мелитурия (повышенная экскреция углеводов с мочой), атеросклероз и др. [27], при этом содержание HbA1c является маркером нарушений углеводного обмена [29]. При окислении сахаров пероксидом водорода или пероксинитритом могут образовываться и продукты «пост-Амадори» с желто-коричневой окраской, что приводит к конформационным перестройкам и фрагментации белка [30]. К этим продуктам относятся глиоксаль, метилглиоксаль и 3-дезоксиглюкозоны, их накопление приводит к карбонильному стрессу. Функционирование одного из самых активных АКС – метилглиоксала описано в обзоре [31].

Особый интерес представляет модификация Hb при одновременном действии АФА и активных карбонильных соединений (АКС), т. е. при карбонильном стрессе. Мы показали, что при этом возможно образование и нитрозо-, и нитриHb, причем появление той или иной модификации зависит и от соотношения действующих агентов, и от условий реакции [32, 33].

Взаимодействие с сульфидами. При поступлении H_2S и сульфидов в организм они могут связываться с гемом Hb с образованием сульфгемоглобина (sulfHb) [34]. Сульфгемоглобинемия может быть и следствием приема некоторых лекарств (сульфонамидов, фенасетина, ацетанилида) [35]. В нормальной крови sulfHb отсутствует, при патологиях его концентрация – в диапазоне 1–10 % [36]. Hb человека может связывать сульфиды и по остатку Цис-93 β-цепей.

Взаимодействие с «необычными» лигандами. Гемоглобины могут формировать прочные комплексы и с другими молекулами, например, с гетероциклическими соединениями с атомом азота в гетероцикле, в частности, с изохинолином и никотиновой кислотой, а также с алкилизоцианидами и нитрозоароматическими соединениями: нитрозобензолом [37] и нитрозотолуолом, при этом нитрозобензол связывается как с железом гема, так и с белком [38]. Комплексы с Hb могут образовывать и алкильные радикалы: метильный, этильный, п-пропильный, трет-бутильный, изобутильный [39]. Группой веществ, связывающихся с глобином, являются производные пиридоксала и имидазол [40, 41]. Комплексы образуются в случае присутствия соответствующих соединений в среде и при связывании некоторых лекарственных препаратов. Они были обнаружены в крови людей, работавших на химических заводах, как результат хронического отравления [38].

Мембраносвязанный гемоглобин (MBHb), является одним из индикаторов состояния эритроцитов, который несмотря на это мало используется в диагностике. Связывания эритроцитарного Hb с мембранами было описано при получении теней эритроцитов гипотоническим лизисом [42]. Доля MBHb, определенная разными авторами, обычно составляла от 3 до 5 %, хотя разброс мог быть и 1–10 %. [43, 44], что можно объяснить использованием разных методов.

Главным путем взаимодействия Hb с мембранами является обратимое электростатическое связывание deoxyHb по цитоплазматическому домену анионтранспортного белка полосы 3 (CDB3) [45–48]. Также возможна адсорбция к мембранным липидам с помощью гидрофобных взаимодействий. Необратимым является ковалентное связывание Hb с компонентами мембраны из-за действия окислительных агентов, вызывающих образование свободных радикалов и оксоферрильной формы Hb, инициирующих перекисное окисление липидов [49, 50]. Доля необратимо связанного Hb возрастает при серповидно-клеточной анемии и талассемии. Связывание Hb с мембранами имеет множественное биологическое значение. Это регуляция метаболизма глюкозы и свойств цитоскелета в зависимости от концентрации O₂, формирование сигнала о повреждении или старении эритроцита, и участие в сигнальном пути гипоксической вазодилатации. Перечисленные функции Hb реализует при участии CDB3. Обратимое связывание Hb с мембранами может быть адаптивной реакцией, направленной на стабилизацию липидного бислоя мембран и регуляцию его упруго-механических свойств. Эритроциты участвуют в регуляции капиллярного кровотока и локального внутрисосудистого давления. MBHb влияет на эритрокринную функцию эритроцитов – участие в метаболизме сигнальных метаболитов. DeoxyHb, связанный с CDB3, восстанавливает нитрит-ионы и является источником NO [51]. MBHb имеет более высокое сродство к O₂, низкий коэффициент Хилла и более высокую пероксидазную активность [52].

Нами разработана спектрофотометрическая методика определения MBHb, при которой определяется Hb, связанный с тенями эритроцитов после гемолиза клеток. Hb определяется в щелочном растворе пиридина [53, 54], с переводом Hb в пиридингемохромоген – удобную для детекции форму. Методика позволяет определять < 0,1 % MBHb в пробе [55]. Она испытана на эритроцитах и цельной крови пациентов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Показано повышение доли MBHb у онкобольных после химиотерапии, Установлен диапазон нормальных значений MBHb: 3,3 % – 4,9 %, соответствующий гемолитической устойчивости эритроцитов. Мы предлагаем использовать MBHb как дополнительный показателя при диагностике.

Взаимодействие с металлами. Известно, что белки при нарушении структуры образуют неспецифические комплексы с переходными металлами со сниженной функциональной активностью. Прогрессирующее образование таких комплексов наблюдается при хроническом окислительном стрессе, старении и эндогенных интоксикациях, в том числе при многих заболеваниях [56, 57]. Нами было показано, что в условиях, моделирующих интоксикацию мочевиной, значительно возрастает связывание гемоглобином ионов Zn и Fe. Окислительный стресс ускоряет этот процесс [58].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно 12 генов, кодирующих различные Hb человека, некоторые действуют постоянно, другие сменяются в процессе развития. В организме можно обнаружить и продукты посттрансляционных модификаций Hb. Мы предложили термин «ГемоглобинОм», объединяющий все формы Hb, присутствующие в организме [59]. Эритроциты являются датчиками метаболического состояния крови, способными аккумулировать повреждения, поскольку время их жизни ~120 дней. Наиболее удобными являются показатели, связанные с Hb, которые могут быть использованы и в компьютерной диагностике. Нами совместно с кафедрой компьютерных медицинских систем НИЯУ «МИФИ» и НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина ведется работа над компьютерной экспертной системой «BLOOD» для диагностики анемий и гемоглобинопатий [60], предложена пилотная версия системы, подтверждено, что она реализует заявленные функции. Система является инструментом поддержки принятия решений при диагностике, возможна ее реализация как автоматизированного программно-информационного комплекса и для обучения медицинского персонала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Perutz M.F., Liguori A.M., Eirich F. // Nature. 1951. V. 167(4258). P. 929–931.
2. Ingram V. // Nature. 1956. V. 178(4537). P. 792–794.
3. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т.45(6). С. 627–653.
4. Топунов А.Ф., Голубева Л.И. // Успехи биологической химии. 1989. Т. 30. С. 239–252.
5. Топунов А.Ф., Петрова Н.Э. // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 199–228.
6. Топунов А.Ф., Космачевская О.В. // Биомика. 2018. Т.10(3). С. ф251–267.
7. Наследственные анемии и гемоглобинопатии. М.: Медицина. 1983. 336 с.
8. Scott E.M., Griffith I.V. // Biochim. Biophys. Acta. 1959. V. 34. P. 584–586.
9. Kuma F., Prough R.A., Masters B.S.S. // Arch. Biochem. Biophys. 1976. V. 172(2). P. 600–607.
10. Qiu Y., Sutton L., Riggs A.F. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273(36). P. 23426–23432.
11. Ascenzi P., Brunori M. // Biochem. Mol. Biol. Edu. 2001. V. 29(5). P. 183–185.
12. Kreutzer U., Jue T. // J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2004. V. 286(3). P. H985 H991.
13. Rassaf T., Fogel U., Drexhage C., Hendgen-Cotta U., Kelm M., Schrader J. // Circ. Res. 2007. V. 100(12). P. 1749–1754.
14. Rifkind J., Nagababu E., Ramasamy S. // Antioxid. Redox Signal. 2006. V. 8(7–8). P. 1193–1203.
15. Stamler J.S., et al. // Science. 1997. V. 276(5321). P. 2034–2037.
16. Angelo M., Singel D., Stamler J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103(22). P. 8366–8371.
17. Vanin A.F., Serezhnikov V.A., Mikoyan V.D., Genkin M.V. // Nitric Oxide. 1998. V. 2(4). P. 224–234.
18. Gow A.J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96(16). P. 9027–9032.
19. Shumaev K.B., et al. // Nitric Oxide. 2008. V. 18(1). P. 37–46.
20. Shumaev K.B., et al. // Methods in Enzymology. 2008. V. 436. P. 445–461.
21. Reeder B., Wilson M. // Curr. Med. Chem. 2005. V. 12(23). P. 2741–2751.
22. Григорьева Д.В., et al. // Бюлл. экп. биол. мед. 2013. Т. 155(1). С. 129–132.
23. Alayash A.I., Ryan B.A., Cashion R.E. // Arch. Biochem. Biophys. 1998. V. 349(1). P. 65–73.
24. Kunkel H.G., Wallenius G. // Science. 1955. V. 122(3163). P. 288.
25. Rahbar S. // Clin. Chim. Acta. 1968. V. 22(2). P. 296–298.
26. Dolhofer R., Renner R., Wieland O.H. // Diabetologia. 1981. V. 21(3). P. 211–215.
27. Галенок В.А., et al. Гликозилированные протеины. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние. 1989. 258 с.
28. Shapiro R., Mc Manus M.J., Zalut C., Bunn H.F.J. Biol. Chem. 1980. V. 255(7). P. 3120–3127.
29. Fluckiger R., Berger W., Winterhalter K.H. Diabetologia. 1977. V. 13. P. 393–396.
30. Yim H. – S., Kang S. – O., Nah Y.-C., Chock P.B., Yim M.B. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270(47). P. 28228–28233.
31. Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53(3). С. 253–270.
32. Kosmachevskaya O.V., et al. // Hemoglobin. 2013. V. 37(3). P. 205–218.
33. Kosmachevskaya O.V., et al. // Clin. Chem. Lab. Med. 2014. V. 52(1). P. 161–168.
34. McCutcheon A.D., Melb M.D., Flack E.H. // Lancet. 1960. V. 276(7144). P. 240–242.
35. Park C.M., Nagel R.L. // N. Engl. J. Med. 1984. V. 310(24). P. 1579–1584.
36. Discombe G. // Lancet. 1960. V. 276(7146). P. 371–372.
37. Murayama M. // J. Biol. Chem. 1960. V. 235(4). P. 1024–1028.
38. Scheler W. // Acta Biol. Med. Germ. 1960. V. 5. P. 382–397.
39. Talbot B., Brunori M., Antonini E., Wyman J. // J. Mol. Biol. 1971. V. 58(1). P. 261–276.
40. Benesch B.R., Benesch R.E. // Methods Enzymol. 1981. V. 76. P. 147–159.
41. Андреев Г.М., Кисель М.А. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23(4). С. 290–293.
42. Anderson H.M., Turner J.C. // J. Clin. Invest. 1960. V. 39(1). P. 1–7.
43. Nash G.B., Meiselman H.J. // Biophys. J. 1983. V. 43(1). P. 63–73.
44. Токтамысова З.С., Биржанова Н.Х. // Биофизика. 1990. Т. 35(6). С. 1019–102012.
45. Shaklai N., Yguerabide J., Ranney H.M. // Biochemistry. 1977. V. 16(25). P. 5593–5597.
46. Fung L.W. // Biochemistry. 1981. V. 20(25). P. 7162–7166.
47. Eisinger J., Flores J., Salhany J.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79(2). P. 408–412.
48. Sega M.F., Chu H., Christian J., Low P.S. // Biochemistry. 2012. V. 51(15). P. 3264–3272.
49. Shaklai N., Ranney H.R. // Isr. J. Med. Sci. 1978. V. 14(11). P. 1152–1156.
50. Kriebardis A.G., et al. // J. Cell. Mol. Med. 2007. V. 11(1). P. 148–155.
51. Salhany J.M. // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 6059–6072.
52. Tsuneshige A., Imai K., Tyuma I. // J. Biochem. 1987. V. 101(3). P. 695–704.
53. Riggs A. // Methods Enzymol. 1981. V. 76. P. 5–29.
54. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43(3). С. 347–353.
55. Насыбуллина Э.И., et al. // Труды Карельского научного центра РАН. 2018. № 4. С. 93–104.
56. Wang W., Kuzmenko I., Vaknin D. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2014. V. 16. P. 13517–13522.
57. Reeg S., Grune T. // Antioxid Redox Signal. 2015. V. 23. P. 239–255.
58. Новикова Н.Н., et al. // Кристаллография. 2019. Т. 64(6). С. 945–951.
59. Топунов А.Ф., et al. // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 2013. С. 150–152.
60. Насыбуллина Э.И., Ник et al. // Краткие сообщения по физике. 2015. Т. 42(7). С. 22–27.