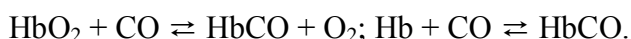


## Восстановление карбоксигемоглобина до оксигемоглобина

В. А. ИГНАТЕНКО, А. В. ЛЫСЕНКОВА, В. А. ФИЛИПОВА

Оксид углерода (II) (CO) при дыхании, легко преодолевая легочно-капиллярную мембрану альвеол, проникает в кровь, вступая во взаимодействие с гемоглобином (Hb) эритроцитов, образуя карбоксигемоглобин (HbCO), вытесняя при этом кислород. Оксид углерода (II) связывается как с окисленной (HbO<sub>2</sub>), так и с восстановленной формой гемоглобина (Hb), представляющими Fe (II) – гемоглобины.

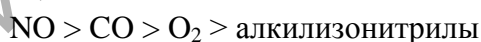


Известно, что при фотодиссоциации HbCO под действием кванта света (hν) CO удаляется от гема на небольшое расстояние. При снятии действия hν опять происходит образование карбоксигемоглобина.

Скорость присоединения CO к гемоглобину примерно в 10 раз ниже скорости присоединения кислорода. В то же время скорость диссоциации HbCO приблизительно в 360 раз меньше скорости диссоциации HbO<sub>2</sub>. Отношение этих скоростей определяет относительное сродство CO к Hb и равно примерно 360. Этим и определяется быстрое образование HbCO в крови при низком содержании CO во вдыхаемом воздухе. Так, например, при содержании в воздухе CO 0,1%, кислорода 21%, приблизительно 50% Hb превращается в HbCO. Это приводит к гипоксемии и выводу из транспортной функции большей части гемоглобина.

Особенность взаимодействия CO с гемоглобином заключается в кооперативном эффекте и во влиянии связанного CO на диссоциацию кислорода. Связывание 3 молекул CO с тремя гемами Hb приводит к образованию прочной связи четвертого гема с кислородом и невозможности его передачи тканям.

Лиганды, соединяющиеся с гемоглобином (Fe(II)- гемоглобин), имеющие кооперативный эффект и зависящие от pH, образуют ряд по степени сродства к Hb



Представленная информация подтверждает трудности, возникающие при восстановлении к оксигенации токсических карбоксигемоглобинов.

### Материалы и методы исследования

Окси Hb получали из свежей донорской крови по описанному ранее методу [8]. Отмытые трижды 0,15 М раствором NaCl эритроциты подвергали осмотическому шоку в 0,01М Na-фос-фатном буфере pH-7,2 с последующим центрифугированием при 16000 об/мин., для опытов брали супернатант, концентрацию белка изменяли в пределах 10<sup>-4</sup> ÷ 10<sup>-5</sup> М и определяли спектрофотометрически по экстинции для λ=415 нм.

МетHb получали добавлением к раствору HbO<sub>2</sub> (ε<sub>415</sub>=125000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>, фосфатный буфер 0,015 М, pH 7,0) избытка феррицианида с последующим отделением низкомолекулярных соединений гельфильтрацией на сефадексе G – 25.

HbCO получали пропусканием через водный раствор HbO<sub>2</sub> окиси углерода, которая образовывалась при добавлении серной кислоты к водному раствору муравьиной кислоты; дезоксиHb – добавлением к HbO<sub>2</sub> гидросульфита натрия [11]. Для защиты HbO<sub>2</sub> от окисления кислородными свободными радикалами использовали цистеин, цистин, глутатион окис-

ленный, глутатион восстановленный, сывороточный альбумин. Окисление серосодержащих соединений, содержащих S-S и -SH группы, до остатков цистеиновой кислоты контролировали на аминокислотном анализаторе после кислотного гидролиза в 6 н HCl.

В качестве ловушек радикалов OH и H использовали растворы спиртов, концентрацию которых изменяли от 0,01 до 1 М.

Растворы исследуемых веществ помещали в стеклянный сосуд, закрывали и ставили на кварцевый излучатель ультразвуковой головки. Ультразвуковую головку помещали в сосуд, через который циркулировала охлажденная вода, подаваемая насосом термостата U-10 для охлаждения излучателя и облучаемой пробы. Ультразвуковые колебания частоты 880 кГц получали с кварцевого излучателя диаметром 4 см. от ультразвукового терапевтического аппарата УТП-1 с изменяемой интенсивностью 0,2-2 Вт/см<sup>2</sup>.

Температура плавления ферро- и ферриформ Hb до и после действия ультразвука определяли по измерениям, проводимым на прецизионном дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-IM при скорости прогрева 2 К/мин и избыточном давлении 4,1 атм.

### Результаты и обсуждение

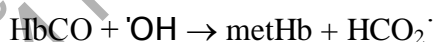
Известно, что Fe (III) – гемоглобин не носит кооперативного характера при взаимодействии с лигандами.

Для восстановления способности Hb оксигенироваться, HbCO перевели в состояние metHb.

В качестве активного лиганда взяли гидроксильный радикал 'OH, получаемый в ультразвуковом поле. При действии УЗ на водные растворы образуется 'OH радикал, который может взаимодействовать с железом Fe (II), переводя его в Fe (III) с образованием гидроксид иона радикала, то есть



Аналогичная реакция происходит и при взаимодействии Fe (II) – гемоглобина-HbCO с 'OH радикалом.



Железо (II) ферро-гемоглобин в озвучиваемых водных растворах окисляется в основном 'OH –радикалами. Константа скорости взаимодействия железа (II) гемоглобина с 'OH -радикалом  $k = 3,6 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ . Эта величина больше констант скоростей реакций железа (II) с другими продуктами сонолиза воды.

Действие УЗ на водный раствор HbCO в атмосфере воздуха приводит к его окислению до метHb, что проявляется коротковолновым сдвигом полосы Core в УФ области спектра поглощения, возникновением полосы с максимумом на 630 нм. (рис. 1). Превращение HbCO происходит количественно (рис. 1). Это подтверждается окислением оксиHb той же концентрации  $K_3 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (рис. 1, кривая 4). Обработка раствора метHb, полученного окислением  $K_3 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$  или в УЗ поле, NaBH<sub>4</sub> приводит к образованию дезоксиHb, который после пропускания через раствор атмосферного воздуха превращается в HbO<sub>2</sub> (рис. 1, кривые 3,1).

Кривые, характеризующие связывание кислорода с исходным Hb и гемоглобином, полученным после восстановления метHb NaBH<sub>4</sub>, образованного в ультразвуковом поле, практически совпадают (рис. 2). Удовлетворительно совпадают и  $p_{50}\text{O}_2$  исходного Hb и гемоглобина, полученного из метHb NaBH<sub>4</sub>. Как следует из рис. 2 и табл. 1, в начальный период озвучивания (30 мин.) структура молекулы Hb по связыванию кислорода не нарушена и оксигенация протекает полностью.

Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии определена температура денатурации HbO<sub>2</sub>, HbCO и метHb, а также метHb после окисления этих ферроформ в

УЗ поле. Анализируя кривые теплопоглощения, можно заключить, что тепловая стабильность метНв, полученного окислением НвО<sub>2</sub> в метНв и метНв, полученного окислением НвСО в УЗ поле практически совпадают (рис. 3). Это также свидетельствует об отсутствии существенных нарушений в четвертичной структуре белка, отсутствии конформационных изменений при окислении ферроформ свободными радикалами, генерируемыми в УЗ поле.

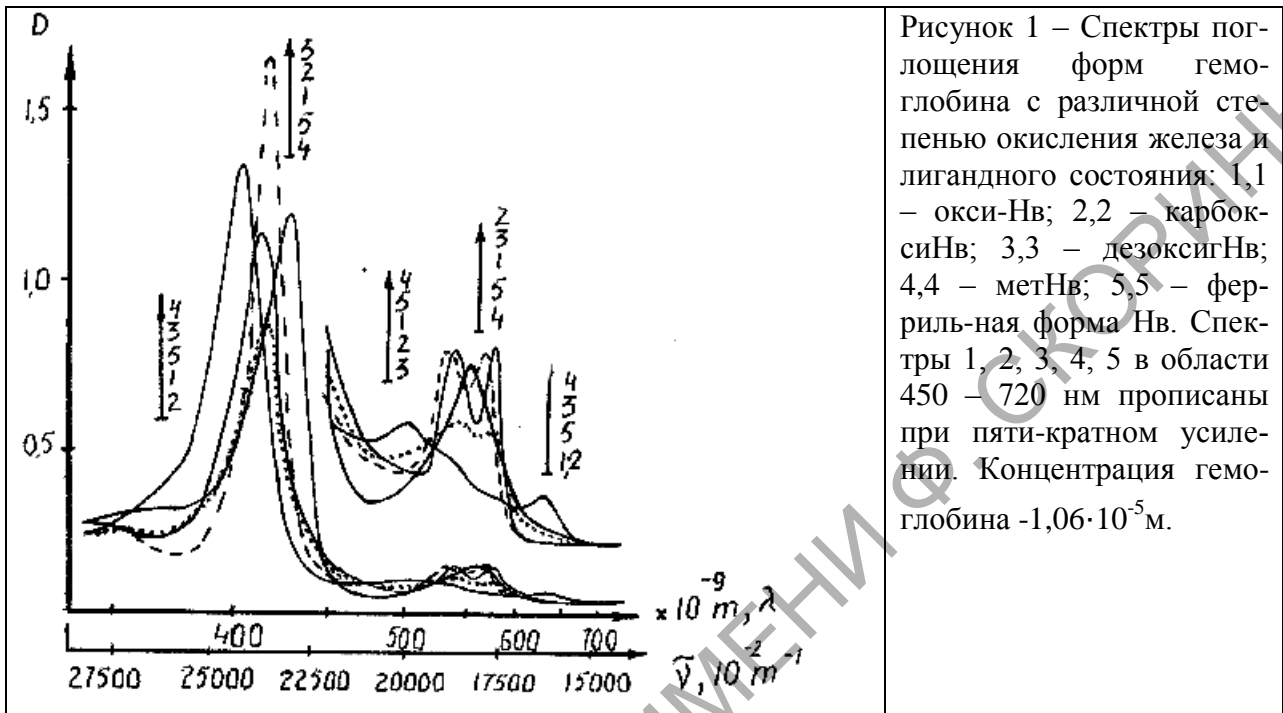


Рисунок 1 – Спектры поглощения форм гемоглобина с различной степенью окисления железа и лигандного состояния: 1,1 – окси-Нв; 2,2 – карбоксиНв; 3,3 – дезоксигНв; 4,4 – метНв; 5,5 – ферриль-ная форма Нв. Спектры 1, 2, 3, 4, 5 в области 450 – 720 нм прописаны при пяти-кратном усилении. Концентрация гемоглобина  $1,06 \cdot 10^{-5}$  м.

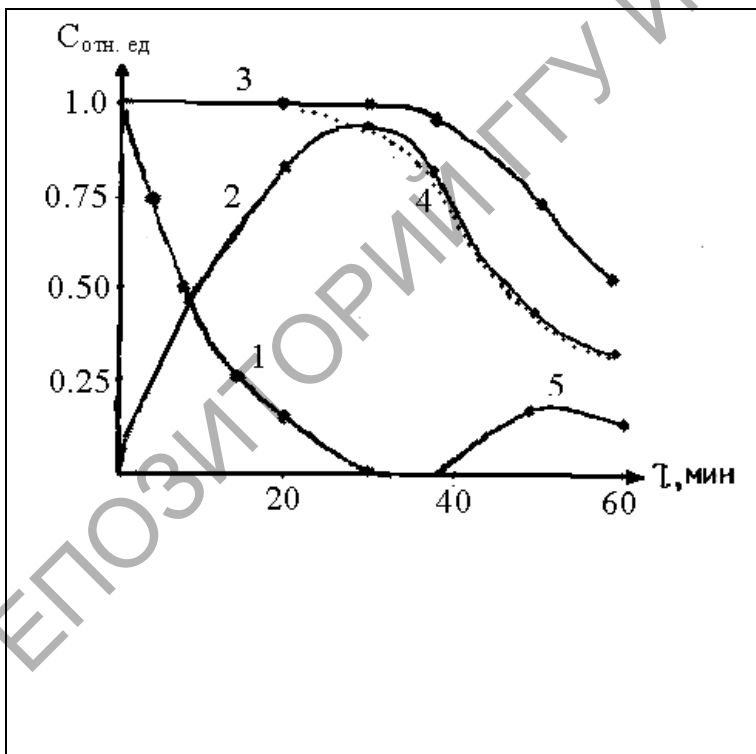


Рисунок 2 – Кинетика убыли в УЗ поле в атмосфере воздуха НвСО (1) образования метНв (2), деструкции гемина (3), образования оксиНв из метНв после восстановления NaBH<sub>4</sub> (Спектрофотометрически определяли на 630 нм концентрацию полученного метНв из НвСО, а затем добавляли избыток K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> переводя оставшийся НвСО в метНв. Суммарный метНв обрабатывали NaBH<sub>4</sub>) (4), дальнейшего превращения метНв (5) (разность между 3 и 4). Концентрация исходного НвСО  $1 \cdot 10^{-5}$  м, водный раствор, рН=7,0, С – измеряемая концентрация Нв и гемина, за единицу принята первоначальная концентрация оксиНв. Интенсивность УЗ 2 Вт/см<sup>2</sup>.

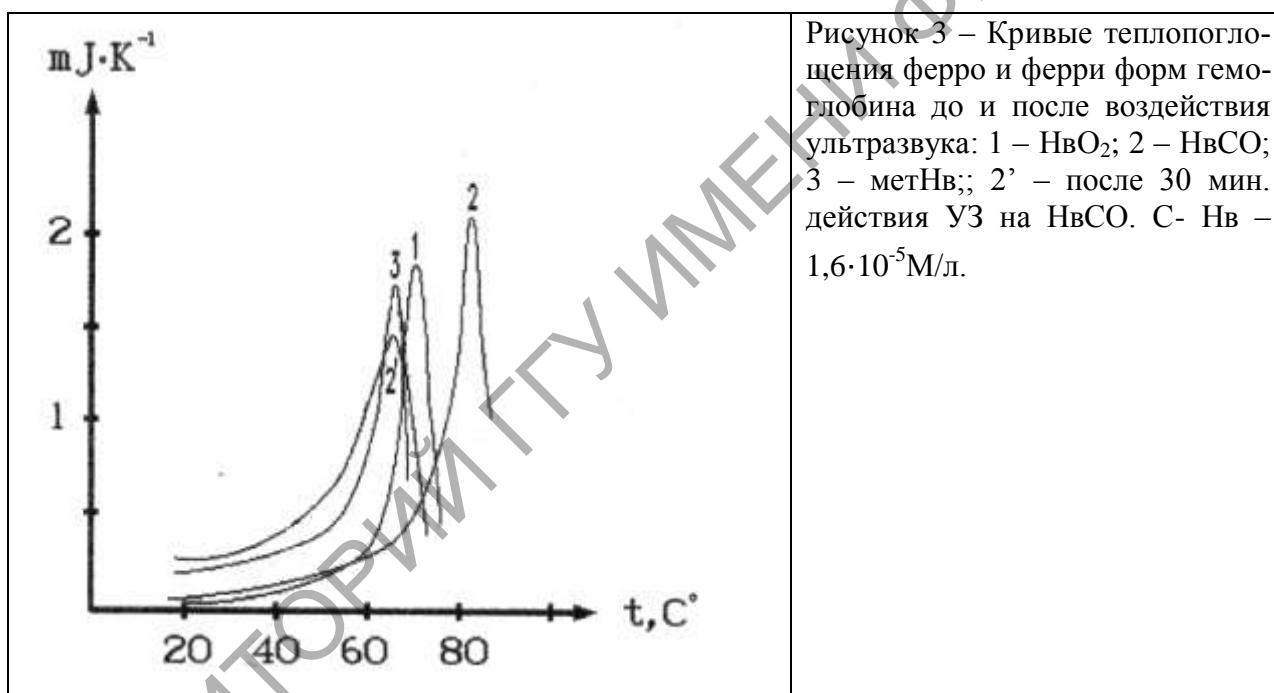
Ускорение окисления НвСО в метНв в УЗ поле наблюдали только после повышения температуры до 60°C, когда начинаются процессы денатурации и агрегации белка. Можно полагать, что окисление ферроформ Нв в метНв в УЗ поле происходит под действием свободных радикалов, а не вызвано повышением температуры и усиливающимися при этом процессами аутоокисления.

Таблица 1. Изменение  $p_{50O_2}$  коэффициента Хилла гемоглобина, после действия ультразвука и последующей обработкой  $NaBH_4$ .

	$p_{50} O_2$ мм.рт.ст	n- константа Хилла	$t^0$ C среды	РН среды
Исходный НвО <sub>2</sub>	14	2,7	18	6,7
*НвСО после 22,5 мин действия УЗ и обработки $NaBH_4$	14	2,7	18	6,7
*НвСО после 37,5 мин действия УЗ и обработки $NaBH_4$	11	2,5	18	6,7
*НвСО после 57,5 мин действия УЗ и обработки $NaBH_4$	5	1,2	18	6,7

Примечание: Концентрация НвО<sub>2</sub>-  $1 \cdot 10^{-5}$  М. Интенсивность УЗ 1 Вт/см<sup>2</sup>.  $p_{50}$  определяли по зависимости изменения спектров поглощения НвО<sub>2</sub> при образовании его из дезоксигемоглобина.

\*Спектрофотометрически определяли ( $\lambda = 630$  нм) концентрацию полученного метНв из НвСО, а затем добавляли избыток  $K_3 [Fe(CN)_6]$ , переводя оставшийся НвСО в метНв. От избытка  $K_3 [Fe(CN)_6]$  освобождались на колонке с сефадексом G-25. Суммарный метНв обрабатывали  $NaBH_4$ .



Дальнейшее воздействие УЗ на метНв приводит к образованию новой неустойчивой формы Нв, максимум поглощения полосы Сорс которой сдвинут в длинноволновую область и отличается по положению максимумов от спектров поглощения НвО<sub>2</sub> или НвСО. Полученный спектр более похож на спектр поглощения метНв сразу после добавления перекиси водорода (рис.1, кривая 5), когда образуется феррильная форма Нв.

Зависимость выхода метНв от мощности ультразвукового воздействия на водный раствор ферроНв приведена на рис. 4 (кривая 2). Аналогичный характер имеет зависимость окисления ионов Fe (II) до Fe (III) в ультразвуковом поле от мощности УЗ.

Добавление в водный раствор спиртов приводит к защитному эффекту, усиливающемуся с увеличением концентрации спиртов, серосодержащих соединений, а также белков, например, сывороточного альбумина (рис. 5), причем в последнем деструкции в основном подвергаются S-S связи. При достаточно высоких концентрациях спиртов оксиНв не окисляется в ультразвуковом поле за промежутки времени, в течение которых в отсутствии спиртов наблюдали полное превращение ферроНв в ферриНв. Причем добавление одинаковых мо-

лярных концентраций соединений ловушек вызывало повышение стабильности НвСО к окислению в УЗ поле, которое хорошо коррелировало со значениями констант скоростей взаимодействия 'ОН радикалов с указанными спиртами [3]. Вследствие образования из спиртов окиси углерода происходит быстрое превращение НвО<sub>2</sub> в НвСО, как известно, гемоглобин обладает в 360 раз более высоким сродством к СО, чем к О<sub>2</sub> [4].

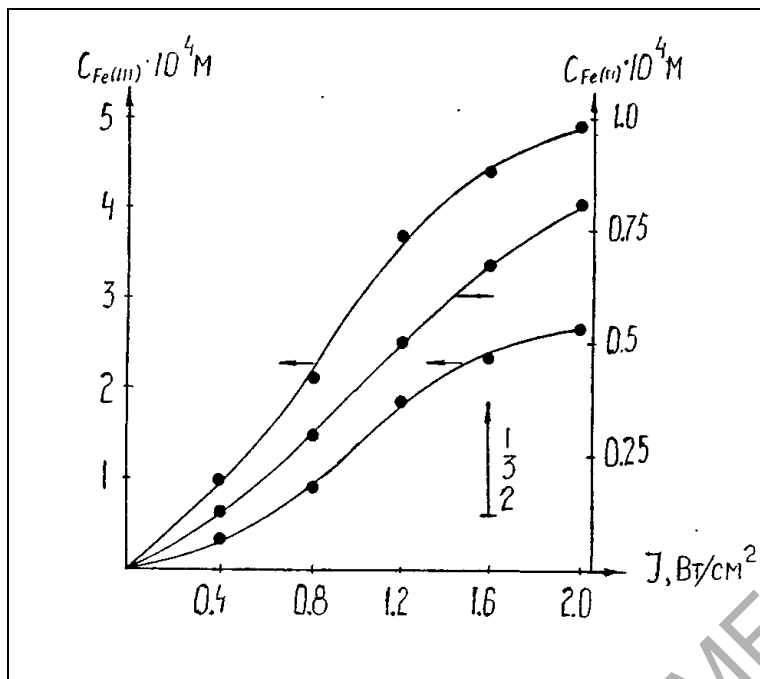


Рисунок 4 – Зависимости окисления ферроформ водного раствора закиси железа (1) и оксиНв (2) в ферриформы и восстановления ферри-ионов в ферроформу (3) радикалами этанола от интенсивности УЗ поля. Кривая, характеризующая образование ацетальдегида, с точностью до 10% совпадает с кривой 3.. Кривые 1 и 2 получены в атмосфере воздуха, 3 – в атмосфере азота, в десятипроцентном водно-этанольном растворе. Время озвучивания растворов 5 мин. Концентрация ионов Fe (II) в составе оксиНв  $5 \cdot 10^{-4}$  м, FeSO<sub>4</sub> –  $10^{-3}$  м, этанола – 2м, Na – фосфатный буфер, pH – 6,8 (0,01 М).

Окисление двухвалентного железа в трехвалентное в ультразвуковом поле обусловлено действием промежуточных радикалов, возникающих в воде при действии ультразвуковых колебаний. Молекулы воды внутри кавитационной полости переходят в возбужденное состояние и распадаются на радикалы 'Н и 'ОН [1, 5, 7, 10]. Предполагается также возможность образования гидратированных электронов ( $e_{ag}^-$ ) [1, 10]. В атмосфере кислорода или воздуха первоначально образовавшиеся радикалы Н и  $e_{ag}^-$  с высокой скоростью взаимодействуют с О<sub>2</sub>:

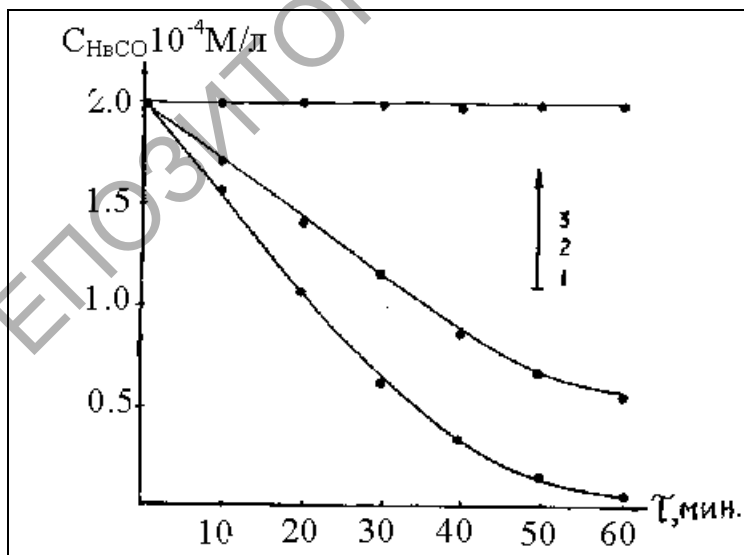


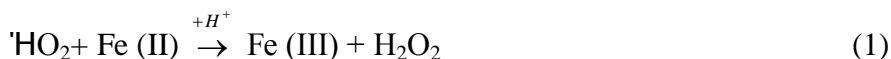
Рисунок 5 – Кинетика окисления НвСО в метНв под действием УЗ в отсутствие защитных реагентов (1), в присутствии сывороточного альбумина (2) и этилового спирта (3). Концентрация НвСО  $2 \cdot 10^{-4}$  м, САЧ –  $5 \cdot 10^{-3}$  м, этанола – 2 м, Na – фосфатный буфер pH – 6,8 (0,01 м), интенсивность ультразвука 2Вт/см<sup>2</sup>, частота 880 кГц.

Константы скорости этих реакций  $2 \cdot 10^{10} \text{ м}^{-1} \text{ с}^{-1}$  [2] и следовательно, основными продуктами sonoлиза воды являются 'НО<sub>2</sub>, 'О<sup>-2</sup>, Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>.

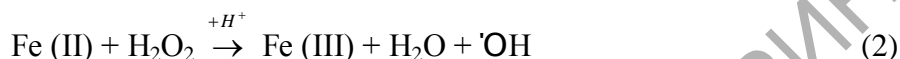
Гидратированные электроны очень эффективно ( $K=2,3 \cdot 10^{10} \text{ м}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ) реагируют с ионами  $\text{H}^+$  [2]  

$$e_{\text{ag}}^- + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow \text{H} + \text{H}_2\text{O},$$

поэтому в кислой среде промежуточные продукты сонолиза воды –  $\text{HO}_2$  реагируют с  $\text{Fe (II)}$ , давая в конечном итоге пероксид водорода [3]



Пероксид водорода, образовавшийся в ультразвуковом поле, например, при дисмутации  $\text{O}_2^-$  или  $\text{HO}_2$ , вследствие рекомбинации радикалов  $\text{OH}$  или же вследствие реакции (1), окисляет ионы двухвалентного железа давая  $\text{Fe (III)}$  и радикалы  $\text{OH}$  [2, 3]



Константа скорости этой реакции относительно невелика: [2, 9]  $K_2 = 76 \text{ м}^{-1} \text{ с}^{-1}$

Гидроксильные радикалы, образовавшиеся при разложении пероксида по реакции (2) или в ультразвуковом поле, окисляют с высокой скоростью ионы двухвалентного железа:



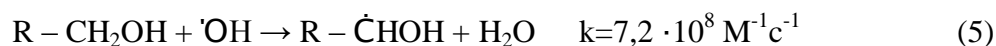
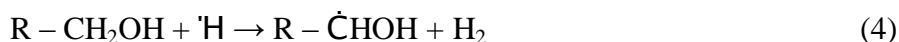
Константа скорости этой реакции  $K_3 = 3 \cdot 10^8 \text{ м}^{-1} \text{ с}^{-1}$ . Реакции (1) и (2) относительно медленные, а константа скорости реакции (3) высока, следовательно, ионы  $\text{Fe (II)}$  будут в основном окисляться до  $\text{Fe (III)}$  радикалами  $\text{OH}$ .

Ферриформа Нв, в свою очередь, окисляется до феррипероксидных форм  $\text{HvFe(IV)}$  радикалом  $\text{OH}$  или пероксидом водорода до  $\text{Fe (V)}$  [12].

В спектре поглощения ферри Нв после действия УЗ в длинноволновой области спектра за полосой Сорс наблюдаются изменения, характерные для феррипероксидной формы  $\text{Fe (IV)}$  миоглобина [12]. Кинетическая кривая образования ионов  $\text{Fe (III)}$  при облучении ультразвуком водного раствора  $\text{FeSO}_4$  в зависимости от мощности излучения близка по форме кинетической кривой окисления ферроНв в ферриНв. Симбатность хода кривых 1 и 2 на рис. 4 свидетельствует, что окисление  $\text{HvO}_2$  в метНв протекает под действием свободных радикалов, образовавшихся вследствие расщепления молекул воды в присутствии атмосферного воздуха, а эффективность захвата радикалов  $\text{OH}$  свободными ионами железа и в комплексе с протопорфирином IX сравнимы между собой по порядку величин. Еще одним доказательством того, что  $\text{HvO}_2$  и  $\text{HvCO}$  окисляются в метНв под действием свободных радикалов, служит защитный эффект спиртов, являющихся "перехватчиками" свободных радикалов. В то же время спирты значительно уменьшают тепловую устойчивость гемоглобина табл.2. Таблица 2. Значения температуры денатурации оксиНв, карбоксиНв и метНв в 0,02 М, К – фосфатном буфере и оксиНв в водно-спиртовых растворах.

Образец	$t_{\text{д}}^0, \text{ C}$
оксиНв ( $\text{HvO}_2$ )	71.0
КарбоксиНв ( $\text{HvCO}$ )	82.0
МетНв ( $\text{Hv H}_2\text{O}$ )	67.0

При взаимодействии радикалов  $\text{OH}$  и  $\text{H}$  со спиртами возможно образование радикальных продуктов спиртов вследствие отрыва атома водорода:

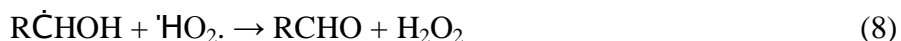


Радикалы спиртов рекомбинируют также между собой, образуя следующие продукты:



В атмосфере кислорода первоначально образовавшиеся радикалы  $\text{H}$  и  $e_{\text{ag}}^-$  с наиболь-

шей скоростью реагируют с  $O_2$  с образованием  $'O_2'$  и  $'HO_2'$ . Поэтому возможно взаимодействие радикалов спиртов, например, с  $'HO_2'$  с образованием



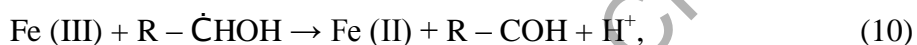
Следует отметить, что радикалы  $'OH$  и  $'H$  достаточно эффективно взаимодействуют с функциональными группами белка, особенно эффективно с остатками цистеина или цистина, образуя радикалы макромолекул. Действительно, добавляя в избытке сывороточный альбумин, можно существенно уменьшить скорость окисления оксиHв в метHв (рис. 5).

Радикалы спиртов взаимодействуют с радикалами макромолекул и образуют сшивки:



Однако стационарные концентрации радикалов спирта и белков малы, и поэтому число образовавшихся сшивок относительно мало.

Можно предположить, что метHв, образовавшийся в ультразвуковом поле вследствие окисления ферроформ Hв (реакции (1) – (3)), восстанавливается обратно в дезоксиHв радикалами спиртов в следующей реакции:



аналогичной реакции ионов Fe(III) в водно-спиртовых средах (рис.4 кривая 3).

#### Заключение

Рассмотренная модель окисления HвCO гидроксильным радикалом до метHв, а затем при помощи  $NaBH_4$  восстановление метHв до дезокси гемоглобина и при поглощении кислорода до  $HвO_2$  хорошо реализуется в растворах гемоглобина и гемолизатах эритроцитов.

Наряду с  $'OH$  радикалом в качестве агента способного перевести HвCO в метHв можно использовать озон. Эта радикальная молекула при взаимодействии с CO превращает последнюю в  $CO_2$



При взаимодействии озона с HвCO, последний окисляется до метHв с образованием  $CO_2$ .

Вопрос восстановления оксигенации гемоглобина лежит в возможности ухода от кооперативного и рН эффектов при связывании лигандов, а в лучшем случае и невозможности связывании их с гемоглобином.

**Резюме.** Изучены окислительно-восстановительные процессы карбоксигемоглобина. Предлагаемая модель включает в себя три основных этапа: окисление карбоксигемоглобина в метгемоглобин при действии гидроксильных радикалов в водной среде, порожденных ультразвуковой частотой 880 кГц; дальнейшее превращение метгемоглобина в дезоксигемоглобин при действии  $NaBH_4$ ; окисление дезоксигемоглобина в оксигемоглобин кислородом. Было установлено, что белковый компонент в карбоксигемоглобине сопротивляется ультразвуковой фазе более эффективно, чем в оксигемоглобине.

**Abstract.** The consecutive process of carboxyhemoglobin oxidation-reduction into oxihemoglobin is studied in the paper. The suggested model involves three main steps: carboxyhemoglobin oxidation into methemoglobin by hydroxyl radicals in aqueous medium generated by ultrasound with the frequency of 880 Hz; methemoglobin reduction into deoxyhemoglobin by  $NaBH_4$ ; deoxyhemoglobin oxidation into oxyhemoglobin by oxygen. The investigation reveals that protein component in carboxyhemoglobin resists ultrasonic phase more efficiently than that of oxyhemoglobin.

#### Литература

1. Маргулис, М.А. Звукохимические реакции и сонолюминесценция / М.А. Маргулис. – М.: Химия, 1986, с.285.
2. Пратт, Дж. Методы и достижения биореорганической химии / Дж. Пратт. – М.: Мир. 1978, с. 133.

3. Своллоу, А. Радиационная химия / А. Своллоу. – М.: Атоиздат. 1976, с. 277.
4. Уайт, А. Основы биохимии / А. Уайт, Ф. Хандлер, Э. Смит Р., Р. Хилл, И. Леман – М.: Мир. 1981, т. 3, с. 1878.
5. Фендлер, Е. Методы и достижения в физико-органической химии / Е. Фендлер, Дж. Фендлер. – М.: Мир, 1973, с. 221.
6. Шарпатый, В.А. Радиационная химия биополимеров / В.А. Шарпатый. – М.: Энергоиздат, 1981, с.167.
7. Эльпинер, И.Е. Биофизика ультразвука / И.Е. Эльпинер. – М.: Наука, 1973, с.383.
8. Benesch, R. E. Affinity labeling of the polyphosphate binding site of hemoglobin / R. E. Benesch, R. Benesch, R. D. Renthal, N. Maeda. – Biochemistry, 1972, v. 11, N 19, p. 3576-3582.
9. Chance, M. X-ray absorption studies of myoglobin peroxide reveal functional differences between globins and heme enzymes / M. Chance, L. Powers, G. Kumar and B. Charice. – Biochemistry, 1986, v.25, p.1259-1265.
10. Christnan, C.L. Evidence for free radicals produced in aqueous solutions by diagnostic ultrasound / C.L. Christnan, A.J. Carmichael, M.M. Mossoba, P. Riesz. – Ultrasonics, 1987, v. 25, N 1, p. 31-34.
11. Van Kampen, E. J. Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives / E. J. Van Kampen, W.G. Zijlstra. – Adv. Cl in. Chem., 1983, v. 23, p.199-257.
12. Whitburn, K.D. Redox transformations in ferrimyoglobin induced by radiation generated free radicals in aqueous solution / K.D. Whitburn, D. Kevin, J.J. Shiek, R.M. Sellers, M.Z. Hoffman. – J.Biol.Chem., 1982, v.257, N 4, p.1860-1869.

Гомельский государственный  
университет им. Ф. Скорины

Поступило 03.02.09