



УДК 612. 11. 14: 615. 849. 5

## Комплексное применение методов диск-электрофореза и гель-фильтрации для анализа влияния оксида углерода на структуру молекул оксигемоглобина человека

Калаева Е.А., Путинцева О.В., Артюхов В.Г.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 14.05.2009 г.

### Аннотация

Исследованы хроматографические и электрофоретические свойства образцов окси- и карбоксигемоглобина человека и их смесей в соотношении 9:1, 5:5 и 1:9 соответственно. Совместное применение методов диск-электрофореза в ПААГ и гель-фильтрации на сефадексе позволило установить, что присутствие оксида углерода способствует сворачиванию апобелкового компонента молекул гемоглобина. Замена  $O_2$  на  $CO$  приводит к снижению гетерогенности состава гембелка: на электрофореграммах карбоксигемоглобина человека обнаружена только одна фракция, оксигемоглобин был представлен четырьмя фракциями. В препаратах основной фракции смесей  $HbO_2$  и  $HbCO$  не было обнаружено димеров, характерных для карбоксигемоглобина, в них присутствовали тетрамерные и мономерные формы, как у оксигемоглобина, т.е. проявлялись эффекты, обусловленные присутствием  $HbO_2$ , несмотря на девятикратное преобладание карбоксиформы гемоглобина в смеси гембелков.

**Ключевые слова:** гель-фильтрация, гемоглобин, диск-электр

Chromatographic and electrophoretic properties of samples of human oxy- and carboxyhemoglobin and their mixes in the ratio 9:1, 5:5 and 1:9 accordingly has been investigated. Joint application of methods of PAAG disc-electrophoresis and gel-filtration on sephadex has allowed to establish, that carbon oxide presence promotes turning apoprotein component of hemoglobin molecules. Replacement  $O_2$  on  $CO$  results in decrease of heterogeneity of protein structure: at the electrophoregrammes of  $HbCO$  one fraction is found out only,  $HbO_2$  has been represented by four fractions. In preparations of main fraction of  $HbO_2$  and  $HbCO$  mixes dimeres peculiar to carboxyhemoglobin was not revealed, in them prevailed tetrameric and monomeric forms similar like at  $HbO_2$ . Thus, the effects caused by presence of  $HbO_2$ , despite of ninefold prevalence hemoglobin carboxyform in a mixture of hemoproteins were shown.

**Key words:** gel-filtration, hemoglobin, PAAG disc-electrophoresis, molecular weight, oligomeric protein, carbon oxide, fraction composition

### Введение

Оксид углерода является продуктом нормальной жизнедеятельности организма, образуясь при распаде гемоглобина и ряда гемсодержащих белков. В зависимости от ряда условий величина физиологического содержания карбоксигемоглобина ( $HbCO$ ) в крови может колебаться в значительных пределах:

нижняя граница находится на уровне 1,5 %, а верхняя – не превышает 9 %. Средняя величина содержания HbCO в организме человека составляет 5-6 % [1,2]. Повышение концентрации CO в атмосферном воздухе городов представляет серьезную угрозу здоровью и жизни населения. Высокое сродство оксида углерода к Fe<sup>2+</sup> гемоглобина, которое почти в 300 раз превосходит сродство гемоглобина к O<sub>2</sub>, обуславливает его сильное токсическое действие. Для того чтобы разрабатывать меры защиты от интоксикации оксидом углерода, следует изучить его действие на физико-химические свойства молекул белков, с которыми он связывается в организме человека.

Для выявления структуры и полиморфизма биологических макромолекул, наблюдения за их конформационными превращениями под воздействием различных физико-химических факторов в молекулярной биологии и биофизике широкое распространение получили многочисленные разновидности хроматографических и электрофоретических методов. Одной из основных характеристик физико-химического состояния белков является величина их молекулярной массы. Особенно важное значение имеет данный параметр для олигомерных белков, состоящих из двух и более полипептидных цепей (субъединиц) и склонных при изменении ближайшего микроокружения или под действием физико-химических факторов образовывать более крупные агрегаты или распадаться на исходные субъединицы. Изменение молекулярной массы сложных белков влечет за собой изменение конформации белковой глобулы и, как следствие этого, изменение их функциональной активности.

Гель-фильтрация — это особый вид распределительной хроматографии, в процессе которой осуществляется фракционирование веществ, основанное на различиях в размерах и форме белковых молекул. Метод отличается простотой, высокой чувствительностью и хорошей воспроизводимостью результатов [3]. Он позволяет исследовать третичную и четвертичную структуры белков, весьма полезен при наблюдениях за изменениями конформации белковых молекул под воздействием внешних агентов. С помощью метода гель-хроматографии на сефадексах возможно разделение биополимеров на отдельные фракции и одновременное определение их молекулярной массы. Метод вертикального диск-электрофореза в неоднородной (прерывистой) буферной среде с применением в качестве носителя полиакриламидного геля (ПААГ) отличается высокой разрешающей способностью, хорошей воспроизводимостью результатов, простотой и быстротой разделения [4].

По функциональной активности и физико-химическим свойствам гемоглобины резко отличаются друг от друга в зависимости от лигандных формы. Вместе с тем работ, направленных на выявление связи между соотношением содержания окси- и карбоксигемоглобина в смеси и структурными характеристиками гемопротеида, не проводилось. Все вышеизложенное стимулировало нас к осуществлению систематических исследований подобного рода.

## Эксперимент

В опытах использовали водные растворы оксигемоглобина, полученного из эритроцитов крови доноров методом осмотического гемолиза [5,6].

Перевод HbO<sub>2</sub> в карбоксиформу осуществляли, как описано нами ранее [7]. При выборе концентраций HbCO в анализируемых смесях исходили из имеющихся в литературе сведений о том, что насыщение крови HbCO на 10 % соответствует верхней границе нормы; на 20 % - приводит к возникновению негативной общемозговой симптоматики, на 30 % - отравлению средней степени тяжести; на 50

% - тяжелому отравлению; на 80 % - почти во всех случаях к летальному исходу [2,8,9].

Полученные образцы гемопротеида подвергали вертикальному диск-электрофорезу в ПААГ на установке фирмы "Reanal" (Венгрия). В экспериментах применяли 7 %-й концентрирующий и 5,5 %-й разделяющий гель и трис-глициновый электродный буфер, рН 8,3. Для изучения физико-химических характеристик отдельных фракций гемопротеида сразу после окончания электрофореза фракции белка экстрагировали в 2,5 мл трис-глицинового буфера в течение 18-20 часов.

Гель-фильтрацию образцов гемопротеида и его электрофоретических фракций проводили по методу Детермана [3] на хроматографической колонке высотой 50 см и диаметром 1 см, упакованной сефадексом G-100 и уравновешенной трис-глициновым буфером, рН 8,3.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакета прикладных программ "Stadia". Достоверность различий контрольных и опытных значений сравниваемых показателей определяли по t-критерию Стьюдента.

### Обсуждение результатов

Экспериментальные данные по исследованию хроматографических свойств оксигемоглобина, карбоксигемоглобина и смесей гембелка, содержащих окси- и карбоксиформу в соотношениях, равных 9:1, 5:5 и 1:9, представлены в табл. 1.

Таблица 1. Кажущиеся молекулярные массы препаратов гемоглобина с различным содержанием окси- и карбоксиформ

Образцы гемоглобина	Кажущаяся молекулярная масса, кДа
HbO <sub>2</sub>	65,1 ± 0,4
HbO <sub>2</sub> : HbCO (9:1)	64,3 ± 0,1*
HbO <sub>2</sub> : HbCO (8:2)	64,2 ± 0,3*
HbO <sub>2</sub> : HbCO (5:5)	63,5 ± 0,6*
HbO <sub>2</sub> : HbCO (1:9)	62,9 ± 0,5*
HbCO	62,1 ± 1,7*

Примечание: \* - отличия от контроля статистически достоверны.

Видно, что исходные растворы оксигемоглобина и карбоксигемоглобина человека элюировали из хроматографической колонки одной фракцией с молекулярными массами, близкими по величине к тетрамерной форме гембелка и равными соответственно 65,1±0,4 и 62,1±1,7 кДа. После гель-фильтрации на сефадексе все исследуемые нами смеси окси- и карбоксиформы гемоглобина сохраняли свою гомогенность и были представлены также одной гемсодержащей белковой фракцией. Молекулярные массы образцов смесей были близки к таковым тетрамеров гемоглобина и незначительно отличались от молекулярных масс исходных форм. При этом с увеличением количества HbCO в исследуемых образцах отмечалось постепенное статистически достоверное снижение кажущихся молекулярных масс от 64,3±0,1 до 62,9±0,5 кДа.

Анализ данных, полученных при изучении электрофоретических свойств интактных образцов окси- и карбоксигемоглобина и их смесей, взятых в соотношениях 9:1, 5:5 и 1:9, позволил выявить следующее.

На электрофореграммах нативного оксигемоглобина было выявлено четыре фракции (рис. 1а, табл. 2-4) с электрофоретическими подвижностями, равными  $1,01 \pm 0,02$ ;  $0,58 \pm 0,03$ ;  $0,40 \pm 0,02$  и  $0,32 \pm 0,02$ . Ширина полос фракций составила  $0,08 \pm 0,01$ ;  $1,00 \pm 0,01$ ;  $0,22 \pm 0,02$ ;  $0,20 \pm 0,02$  см, содержание белка -  $1,0 \pm 0,1$ ;  $95,4 \pm 0,1$ ;  $2,2 \pm 0,1$  и  $1,5 \pm 0,1$ %. Нативные образцы НbСО состояли из электрофоретически однородных молекул: в условиях эксперимента была выделена одна фракция с электрофоретической подвижностью (ЭП), равной  $0,53 \pm 0,02$ , и шириной полосы  $0,45 \pm 0,02$  см (рис. 1 б).

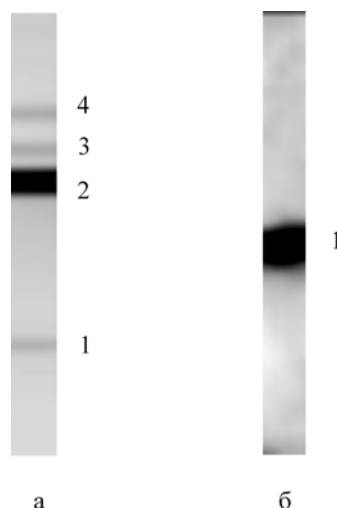


Рис. 1. Электрофореграммы окси- (а) и карбоксигемоглобина (б) человека. Обозначения: 1-4 – электрофоретические фракции.

На денситограммах смесей НbO<sub>2</sub> и НbСО с соотношением 9:1, как и у образцов интактного оксигемоглобина, было обнаружено четыре фракции гембелка (табл. 2 - 4).

Таблица 2. Относительная электрофоретическая подвижность фракций препаратов гемоглобина с различным соотношением окси- и карбоксиформ

НbO <sub>2</sub> : НbСО	1-я фракция	2-я фракция	3-я фракция	4-я фракция
НbO <sub>2</sub>	$1,01 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,02$
9:1	$0,97 \pm 0,08$	$0,56 \pm 0,08$	$0,37 \pm 0,08$	$0,28 \pm 0,02$
5:5	$0,94 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,02$	-	-
1:9	$1,00 \pm 0,03$	$0,56 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,08$	$0,26 \pm 0,05$
НbСО	-	$0,53 \pm 0,02$	-	-

ЭП фракций исследуемого препарата были близки к таковым фракций НbO<sub>2</sub>, но количество белка в 1-й фракции возросло с 1,0 до 13,9 %, а во 2-й фракции снизилось с 95,4 до 77,4 %. На денситограммах смесей с равным содержанием молекул НbO<sub>2</sub> и НbСО было выявлено только две фракции (рис. 2б). Содержание белка в 1-й быстро идущей фракции (ЭП= $0,94 \pm 0,02$ ) составило 5,1 %, а во 2-й фракции (ЭП= $0,53 \pm 0,02$ ) – 94,9 % (табл. 2 - 4).

Таблица 3. Содержание белка во фракциях препаратов гемоглобина с различным соотношением окси- и карбоксиформ

HbO <sub>2</sub> :HbCO	1-я фракция	2-я фракция	3-я фракция	4-я фракция
HbO <sub>2</sub>	1,0±0,1	95,4±0,1	2,2±0,1	1,5±0,1
9:1	13,9±1,1	77,0±0,8	3,6±0,2	5,5±0,8
5:5	5,1±0,1	94,9±1,1	-	-
1:9	10,6±0,2	83,2±5,1	2,8±0,2	3,3±0,2
HbCO		100	-	-

Смеси с 9-кратным преобладанием HbCO в ходе электрофореза разделялись на четыре фракции (рис. 2в). 1-я, очень быстрая фракция (ЭП=1,00±0,03) содержала 10,6 % белка. Величины ЭП 2-й основной, 3-й и 4-й минорных фракций были сравнимы с ЭП аналогичных фракций оксигемоглобина человека. Количество белка в основной фракции составило 83,2%, в 3-й фракции – 2,8 %, а в 4-й – 3,3 %.

Таблица 4

Ширина полос электрофоретических фракций препаратов гемоглобина с различным соотношением окси- и карбоксиформ

HbO <sub>2</sub> : HbCO	1-я фракция	2-я фракция	3-я фракция	4-я фракция
HbO <sub>2</sub>	0,08±0,01	1,00±0,01	0,22±0,02	0,20±0,02
9:1	0,26±0,08	0,84±0,01	0,18±0,06	0,27±0,01
5:5	0,34±0,03	1,42±0,02	-	-
1:9	0,46±0,06	1,22±0,01	0,28±0,06	0,33±0,06
HbCO	-	0,45±0,02	-	-

Результаты исследования электрофоретических свойств препаратов гемоглобина человека с различным содержанием окси- и карбоксиформ указывают на то, что модификация состава исследуемой смеси в сторону увеличения количества HbCO приводила к изменениям числа выделенных фракций и их характеристик.

На электрофореграммах всех исследуемых образцов присутствовала основная фракция гембелка, ЭП которой варьировала от 0,53 (препараты с соотношением HbO<sub>2</sub>:HbCO = 5:5 и HbCO) до 0,58 (препараты HbO<sub>2</sub>). Количество белка в этой фракции изменялось от 100 % (HbCO) до 77,0 % (смеси, содержащие 90% HbO<sub>2</sub> и 10% HbCO). С увеличением содержания HbCO в смесях постепенно возрастала ширина основной фракции гембелка, достигая максимальной величины 1,42 см при соотношении HbO<sub>2</sub> и HbCO, равном 5:5. Рост ширины электрофоретической фракции обусловлен присутствием в ней разнородных по величине суммарного поверхностного заряда молекул HbO<sub>2</sub> и HbCO. Отмечена асимметричность пика этой фракции в основном за счет увеличения содержания в ней более медленно передвигающихся молекул гемопотеида, по-видимому, принадлежащих его карбоксиформе, так как ЭП карбоксигемоглобина несколько меньше таковой HbO<sub>2</sub>.

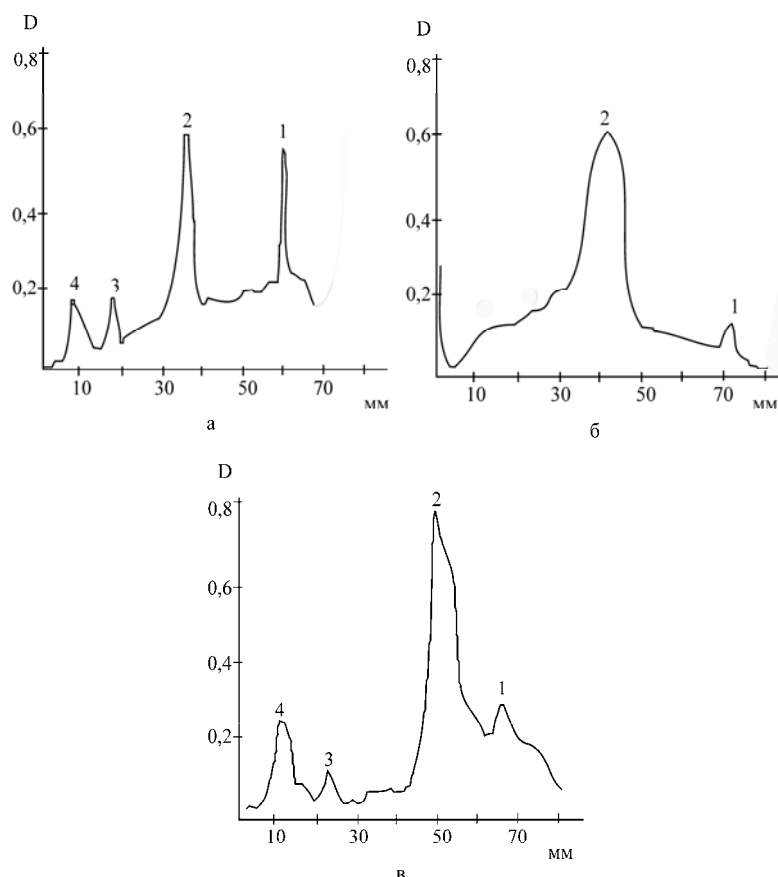


Рис. 2. Денситограммы образцов смесей гемоглобина человека с различным соотношением окси- и карбоксиформы  
 Обозначения: а –  $\text{HbO}_2:\text{HbCO}$  (9:1), б –  $\text{HbO}_2:\text{HbCO}$  (5:5), в –  $\text{HbO}_2:\text{HbCO}$  (1:9).

Во всех образцах, содержащих оксиформу гемоглобина, была обнаружена быстро мигрирующая электрофоретическая фракция, ЭП которой варьирует от 0,94 до 1,00. С ростом содержания карбоксиформы гемоглобина в исследуемых препаратах белка, а именно при соотношении 5:5, количество выделенных фракций снижалось до двух. Это указывает на возможность взаимодействия небольшой части молекул  $\text{HbO}_2$  и  $\text{HbCO}$  друг с другом, что приводило к образованию новых минорных электрофоретических фракций, свойства которых отличались от таковых исходных форм гембелка.

С целью выяснения структуры биомолекул, входящих в состав электрофоретических фракций препаратов гемоглобина с различным содержанием окси- и карбоксиформы, нами были изучены их хроматографические свойства и определены величины кажущихся молекулярных масс (табл. 5).

1-я электрофоретическая фракция исходного раствора оксигемоглобина в процессе гель-фильтрации выявила свою однородность: она элюировала из хроматографической колонки одной фракцией с кажущейся молекулярной массой, приближающейся по своей величине к массе мономерной формы гембелка ( $22,0 \pm 1,6$  кДа). Основная 2-я электрофоретическая фракция  $\text{HbO}_2$  разделялась на две хроматографические подфракции с молекулярными массами, равными  $65,0 \pm 1,5$  и  $18,3 \pm 1,3$  кДа. Белки 3-й и 4-й минорных электрофоретических фракций  $\text{HbO}_2$  были однородными по своему составу, их молекулярные массы равнялись соответственно  $20,1 \pm 1,2$  и  $18,4 \pm 1,4$  кДа.

Единственная электрофоретическая фракция HbCO в результате гель-фильтрации разделялась на две хроматографические подфракции: одна по молекулярной массе соответствовала тетрамерной ( $61,0 \pm 0,8$  кДа), а другая – димерной ( $39,0 \pm 0,9$  кДа) формам гемопротейда.

Во всех исследуемых нами смесях окси- и карбоксиформы гемоглобина сохранялась гетерогенность состава 2-й основной электрофоретической фракции: в процессе хроматографии она всегда разделялась на две подфракции. Величины молекулярных масс 1-й подфракции были близки к тетрамерам, а 2-й подфракции – к мономерам (табл. 5).

Величины кажущихся молекулярных масс 3-й и 4-фракций препарата гемоглобина, содержащего 90 % HbO<sub>2</sub> и 10 % HbCO, были одинаковыми ( $20,9 \pm 1,4$  кДа). Следовательно, разделение молекул этих фракций в процессе электрофореза произошло только благодаря различию в величине их суммарного поверхностного заряда. Молекулярная масса белков самой быстрой (1-й) фракции была очень близка по своей величине к мономерной форме гемопротейда ( $17,8 \pm 0,7$  кДа).

Таблица 5. Величины кажущихся молекулярных масс электрофоретических фракций препаратов гемоглобина с различным соотношением окси- и карбоксиформы

HbO <sub>2</sub> :HbCO	1-я фракция	2-я фракция		3-я фракция	4-я фракция
		1-я подфракция	2-я подфракция		
HbO <sub>2</sub>	$22,0 \pm 1,6$	$65,0 \pm 1,5$	$18,3 \pm 1,3$	$20,1 \pm 1,2$	$18,4 \pm 1,4$
9:1	$17,8 \pm 0,7$	$66,0 \pm 1,9$	$19,5 \pm 1,4$	$20,9 \pm 1,4$	$20,9 \pm 1,4$
5:5	$17,7 \pm 0,5^*$	$64,7 \pm 0,8$	$17,5 \pm 0,5$	-	-
1:9	$17,6 \pm 0,5$	$64,1 \pm 0,5$	$17,3 \pm 0,6$	$17,5 \pm 1,2^*$	$17,5 \pm 1,2$
HbCO	-	$61,0 \pm 0,8^*$	$39,0 \pm 0,9$	-	-

Примечание: \* - отличия от контроля (HbO<sub>2</sub>) статистически достоверны.

Минорные электрофоретические фракции (1-я, 3-я и 4-я) препаратов гемоглобина с соотношением HbO<sub>2</sub>:HbCO = 1:9 имели схожие величины молекулярных масс ( $17,6$  и по  $17,5$  кДа соответственно).

## Заключение

На основании анализа комплексного исследования хроматографических и электрофоретических свойств смесей с различным содержанием окси- и карбоксиформ гемоглобина человека можно сделать следующее заключение. Присутствие оксида углерода в координационной сфере атома железа гема способствовало сворачиванию апобелкового компонента молекул гемоглобина, что вызывало уменьшение кажущихся молекулярных масс гемопротейда при увеличении содержания HbCO в образце. Замена лиганда O<sub>2</sub> на CO приводила к снижению гетерогенности состава белка: на электрофореграммах карбоксигемоглобина человека была обнаружена только одна фракция, в то время как оксигемоглобин в аналогичных условиях был представлен четырьмя фракциями. Разделение образцов гемопротейда на электрофоретические фракции обусловлено различиями, как величин молекулярных масс, так и суммарного поверхностного заряда белковых глобул. Процесс электрофореза в ПААГ в щелочной среде

приводил к ослаблению связей между субъединицами части тетрамерных молекул 2-й (основной) электрофоретической фракции оксигемоглобина, карбоксигемоглобина и их смесей. В изученных образцах образовывались нестабильные формы молекул гембелка, которые при последующей гель-фильтрации на сефадексе диссоциировали с образованием димеров у HbCO и мономеров у HbO<sub>2</sub> и смесей этих двух дериватов гемоглобина. Следовательно, более компактные молекулы карбоксигемоглобина демонстрировали большую прочность субъединичных контактов между α- и β-полипептидными цепями. В препаратах смесей HbO<sub>2</sub> и HbCO не было обнаружено димеров, характерных для карбоксигемоглобина: в них преобладали тетрамерные и мономерные формы, как у оксигемоглобина, проявлялись эффекты, обусловленные присутствием HbO<sub>2</sub>, несмотря на девятикратное преобладание карбоксиформы гемоглобина в смеси гембелков. Таким образом, совместное применение двух методов исследования, дополняющих друг друга, позволило установить, что физико-химические свойства смесей отдельных дериватов гемоглобина не являются простой суперпозицией характеристик входящих в их состав компонентов, а определяются их взаимодействием. Это необходимо учитывать при анализе наблюдаемых эффектов.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 09-04-97503-р-центр-а «Анализ и прогнозирование молекулярно-клеточных реакций биосистем на антропогенное загрязнение».*

### Список литературы

1. Тиунов Л.А. Окись углерода. Промышленные, выхлопные и взрывные газы, содержащие окись углерода // Руководство по гигиене труда. М., 1963. Т. 2. С. 264-272.
2. Тиунов Л.А., Кустов В.В. Токсикология окиси углерода. Л., 1969. 288 с.
3. Детерман Г. Гель-хроматография. М., 1970. 252 с.
4. Маурер Г. Диск-электрофорез. М., 1971. 247 с.
5. Drabkin D.L. The chromatographic and optical properties of haemoglobin of man in comparison with those of other species // J. Biol. Chem. 1946. V. 164, № 5. P. 703-723.
6. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода. М., 1957. 132 с.
7. Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Калаева Е.А. Оценка степени фотоповреждения хромофоров гемового и глобинового компонентов УФ-облученных молекул и электрофоретических фракций карбоксигемоглобина человека // Радиационная биология. Радиоэкология. 2000- Т. 40, № 4. С. 439-445.
8. Вредные вещества в промышленности / под ред. Лазарева Н.В., Гадаскиной И.Д. Л., 1977. Т. 3. С. 240-253.
9. Лужников Е.А., Костомарова Л.Г. Острые отравления. М., 1989. 432 с.

---

**Артюхов Валерий Григорьевич** – Заслуженный деятель науки РФ, д.б.н., проф., зав. кафедрой биофизики и биотехнологии, Воронежского государственного университета, Воронеж

**Artyukhov Valery G.** - the Honored worker of a science of the Russian Federation, Dr. Sci. Biol., professor, the head of the department of biophysics and biotechnology, the dean of the biological and soil-science faculty of Voronezh State University, Voronezh



**Калаева Елена Анатольевна** – к.б.н., асс. кафедры биофизики и биотехнологии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

**Путинцева Ольга Васильевна** – д.б.н., проф. кафедры биофизики и биотехнологии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

**Kalaeva Elena A.** - Cand.Biol.Sci., the assistant of the department of biophysics and biotechnology of the biological and soil-science faculty of Voronezh State University, Voronezh, e-mail: [kalaevae@gmail.com](mailto:kalaevae@gmail.com)

**Putintseva Olga V.** - Dr. Sci. Biol., professor of the department of biophysics and biotechnology of the biological and soil-science faculty of Voronezh State University, Voronezh