

УДК 547.963

ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІГАНДНИХ ФОРМ ГЕМОГЛОБІНУ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОННОЇ ОПТИЧНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ

К. Дудок, Р. Білий, А. Федорович

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

Виконано спектрофотометричні дослідження дезокси-, окси-, карбокси- та метгемоглобінів і розраховано енергії електронних переходів. З'ясовано, що в дезоксигемоглобіні не лише йон заліза Fe (II), а й атоми азоту виходять з площини порфіринового кільця. В оксигемоглобіні утворюються зв'язки між d_{xz} -орбіталями Fe(II) та π -орбіталями O₂. Розрахована енергія електронних переходів у метгемоглобіні досить незначна – 190 кДж/моль, і її можна віднести до низькоенергетичного $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходу, зумовленого утворенням йон-радикального комплексу протопорфіринового кільця й окисненої форми заліза Fe³⁺.

Ключові слова: гемоглобін, оксигемоглобін, дезоксигемоглобін, електронні переходи.

Відомо, що молекула гемоглобіну складається з чотирьох субодиниць (дві α - і дві β -субодиниці, які містять, відповідно, по 141 і 146 амінокислотних залишків, специфічно вкладених навколо плоского залізовмісного кільця гему – феропротопорфірину [5]. У центрі гему міститься йон заліза Fe(II), який утворює чотири зв'язки з атомами азоту пірольних кілець: два ковалентні і два донорно-акцепторні. Оскільки координаційне число Fe²⁺ – шість, то два інші зв'язки розташовані перпендикулярно до площини кільця протопорфірину. Один із них утворює зв'язок з глобіном через атом азоту проксимального (His F8) гістидину. З протилежного боку від атома заліза на значно більшій відстані розміщений дистальний гістидин (His E7). Ділянка між дистальним гістидином та залізом є вільною і може бути зайнята ліпофільною молекулою ліганда, що має шосте координаційне положення атома заліза. Залежно від типу молекули (O₂, CO, NO, H₂S), відповідно, утворюються оксигемоглобін (HbO₂), карбоксигемоглобін (HbCO), нітрозогемоглобін (HbNO) та сульфгемоглобін (SHb).

Зміна ліганда в молекулі гемоглобіну супроводжується зміною як магнітних властивостей, так і просторової будови молекули. В молекулі дезоксигемоглобіну (RHb) атом заліза в протопорфіриновому кільці перебуває у високоспіновому стані, він розташований над площиною протопорфіринового кільця й утворює з його площиною піраміду (рис. 1, А), у цьому разі координаційний зв'язок з гістидином

F8 не зрівноважений взаємодією з лігандом. Це, відповідно, веде до зміни конформатції молекули: помітним є зближення поліпептидних ланцюгів у місцях зв'язування α - і β -спіралей.

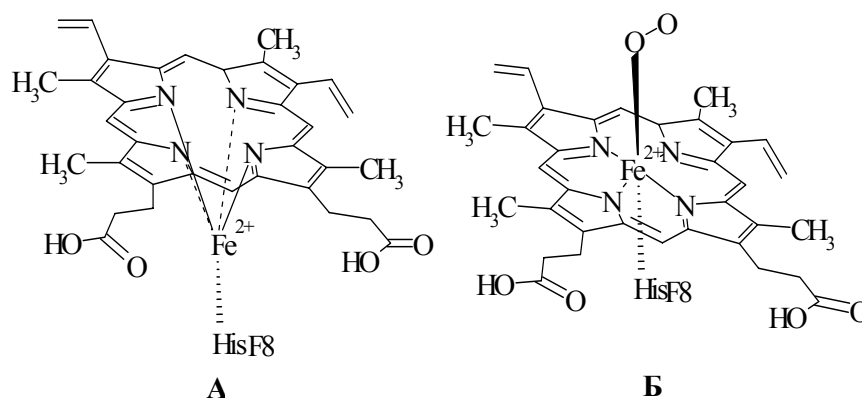


Рис. 1. Будова гемової компоненти дезокси- (А) та окси- (Б) гемоглобіну.

Унікальна властивість гемоглобіну – його здатність зворотно зв'язувати O_2 . У разі зв'язування O_2 радіус йона Fe^{2+} зменшується, він переходить у більш низькоспіновий стан. В оксигемоглобіні основний стан є діаманітним [1]. Йон Fe^{2+} розміщується від His F8 на 0,06 нм у площину протопорфіринового кільця, займаючи більш енергетично вигідне положення (рис. 1, Б). З'ясовано [3], що в оксигемоглобіні кисень перебуває у вигляді супероксидйону O_2^- , а йон Fe^{2+} переходить з високоспінового стану у низькоспіновий, не зазнаючи окиснення до Fe^{3+} . Згідно з даними рентгеноструктурного аналізу кисень утворює з йоном Fe^{2+} монодентантний комплекс, у якому молекула кисню координована з йоном заліза лише одним атомом (рис. 1, Б) [4].

Хоча електронна структура гемоглобіну і, зокрема, порфірину, що міститься в ньому, складна, його електронний спектр поглинання досить простий. Це пояснюється тим, що ароматична система порфірину високосиметрична, D_{4h} . З літератури відомо, що в гемоглобіні можливі такі енергетичні переходи: $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходи порфірину, $d \rightarrow d$ -переходи заліза, переходи з d -рівня атома заліза на π^* -рівень порфірину та з π -рівня порфірину на d -рівень заліза [7].

Ми спробували знайти кореляції між змінами просторової будови гемоглобіну та особливостями будови електронних спектрів.

Для цього детально досліджено електронні спектри різних лігандних форм гемоглобіну та розраховано енергії електронних переходів, пов'язаних з введенням ліганду в молекулу.

Дослідження проводили на гемоглобіні, виділеному за методом Драркіна [8] з еритроцитів донорської крові людини, взятої у Львівському відділенні станції переливання крові. Спектри поглинання записували на спектрофотометрі Spcorgd

M40 в діапазоні 350-450 і 450-750 нм. Різні форми гемоглобінів отримували за відомими методами [2]. Енергію переходів розраховували згідно з описаним методом [11]. Результати досліджень наведені в таблиці.

З'ясовано, що для дезоксигемоглобіну в ділянці 450-750 нм характерне інтенсивне поглинання при 430 нм ($\epsilon = 119\,000$), смуга Соре (рис. 2), і майже на порядок менш інтенсивне поглинання при 558 нм ($\epsilon = 13\,500$), що відповідає α -смузі (рис. 3). Виконані розрахунки енергій переходу для смуги Соре дали значення 278 кДж/моль, а для α -смузи – 214 кДж/моль (див. таблицю). Різниця в енергіях переходів становить 64 кДж/моль. Поглинання в ділянці 430 нм можна зачислити до електронних переходів у протопорфіриновому ядрі, а в ділянці 558 нм – до $\pi \rightarrow \pi^*$ -збудженого електронного стану, що виникає внаслідок взаємодії протопорфіринових π - і d -орбіталей йона заліза Fe^{2+} [7, 9].

У молекулі оксигемоглобіну переміщення атома заліза в площину гему приводить до врівноваження взаємодій зв'язків His F8 і O_2 з комплексоутворюючим йоном. У спектрах поглинання молекули оксигемоглобіну це призводить до гіпсохромного зсуву смуги Соре (415 нм) і збільшення інтенсивності поглинання ($\epsilon = 135\,000$) (рис. 2).

Спектрофотометричні характеристики різних лігандних форм гемоглобіну

Сполука	α -Смуга			β -Смуга			Смуга Соре		
	λ , нм	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	E , кДж/моль	λ , нм	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	E , кДж/моль	λ , нм	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	E , кДж/моль
Гем [2]	565	6,1	–	–	–	–	396	39,6	–
RHb	558	13,5	214	–	–	–	430	119	278
HbO ₂	577	14,6	207	542	13,8	221	415	135	288
HbCO	569	3,4	210	539	13,4	222	418	191	286
MetHb	630	3,85	190	502	8,9	238	405	251	295

Розрахована енергія цього електронного переходу становить 288 кДж/моль (див. таблицю), вона зростає порівняно з дезоксигемоглобіном на 10 кДж/моль, що еквівалентно енергії водневого зв'язку. Це можна пояснити так. У молекулі оксигемоглобіну, на відміну від дезоксигемоглобіну, переміщення йона Fe^{2+} у площину гему супроводжується зменшенням поляризації молекули та збільшенням спряження між атомами протопорфіринового кільця. У молекулі дезоксигемоглобіну переміщення йона Fe^{2+} з площини гему сприяє частковому зміщенню з цієї площини атомів азоту, що зменшує спряження, зсуває максимум поглинання у видиму ділянку і відносно дестабілізує молекулу. Про це свідчить збільшення енергії електронного переходу.

Зміни в електронному спектрі поглинання, пов'язані з уведенням молекули кисню, особливо характерні для низькоенергетичних $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходів α - і β -смуз. В оксигемоглобіні α -смуга (рис. 3) зазнає порівняно з дезоксигемоглобіном батохромного зсуву (577 нм), для неї також характерне зростання інтенсивності погли-

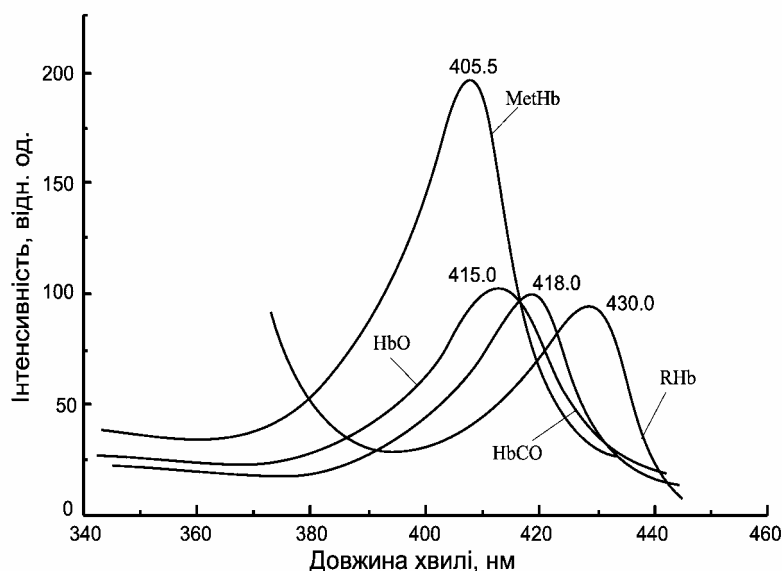


Рис. 2. Електронні спектри поглинання різних лігандних форм гемоглобіну в ділянці 350-450 нм.

нання порівняно з дезоксиформою ($\epsilon = 14\,600$). Головною відмінністю спектральних характеристик оксигемоглобіну від дезоксигемоглобіну є поява β -смуги в ділянці 542 нм (рис. 3). Інтенсивність її поглинання дещо нижча, ніж для α -смуги ($\epsilon = 13\,800$). Розраховані енергії електронних переходів становлять, відповідно, 207 і 221 кДж/моль для α - і β -смуг. Причиною появи β -смуги в електронному спектрі оксигемоглобіну є додаткове зв'язування з утворенням нового π -зв'язку. Поява нової смуги поглинання, на нашу думку, свідчить про утворення зв'язку між атомами Fe і O внаслідок перекривання d_{xz} -орбіталі Fe^{2+} і π -орбіталі O_2 . Розрахунків енергій переходу для α - і β -смуг (див. таблицю) доводить, що вони умірні з енергією π -зв'язку.

Електронний спектр поглинання молекули карбоксигемоглобіну близький до спектра поглинання молекули оксигемоглобіну. Смуга Соре порівняно з дезоксигемоглобіном зміщена в короткохвильову ділянку довжин хвиль (418 нм) і має ще більшу інтенсивність ($\epsilon = 191\,000$) (рис. 2). У більш довгохвильовій ділянці наявні дві смуги поглинання – α - (569 нм) і β -смуга (539 нм), які мають однакову інтенсивність ($\epsilon = 13\,400$) (рис. 3). Можна зафіксувати значний гіпсохромний зсув для α -смуги порівняно з оксигемоглобіном – на 8 нм. Близькі спектральні характеристики окси- і карбоксигемоглобіну свідчать про незначні структурні зміни в разі заміни одного ліганду іншим. Це пояснює високу спорідненість гемоглобіну до CO і здатність оксиду вуглецю (II) замішувати кисень в оксигемоглобіні. Вірогідно, що

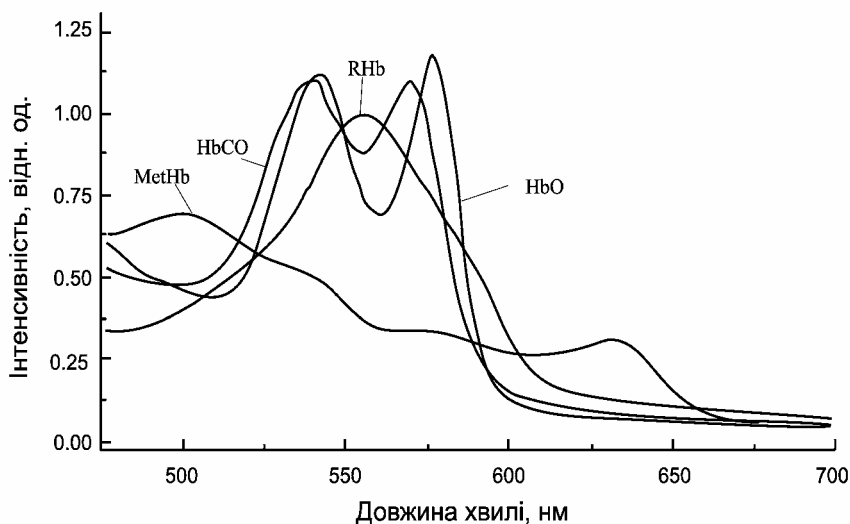


Рис. 3. Електронні спектри поглинання різних лігандних форм гемоглобіну в ділянці 450-700 нм.

у стабілізації карбоксигемоглобіну відіграє роль і утворення водневого зв'язку між атомом кисню карбонільного ліганду та атомом водню біля азоту дистального гістидину (His E7), як є для оксигемоглобіну [6]. Розрахунки енергій електронних переходів (див. таблицю) засвідчують незначне збільшення енергії для β - (222 кДж/моль) та α -смуг (210 кДж/моль). Можна припустити так: оскільки молекули O_2 і CO мають умірні розміри та геометрію, то більша нуклеофільна здатність атома вуглецю порівняно з атомом кисню повинна приводити до зміцнення зв'язування CO з іоном Fe^{2+} .

У метгемоглобіні атом заліза перебуває у вищому ступені окиснення – Fe^{3+} , тому співставлення смуг поглинання для метгемоглобіну порівняно з дезоксигемоглобіном зробити важко. В електронних спектрах поглинання молекули метгемоглобіну простежується інтенсивна смуга з максимумом при 405 нм (рис. 2). Інтенсивність цієї смуги значно перевищує інтенсивність поглинання смуги $Soret$ для відновлених форм гемоглобіну ($\epsilon = 251\ 000$), а максимум поглинання зсунутий у короткохвильову ділянку спектра. Значну відмінність електронного спектра поглинання гемоглобіну порівняно з описаними вище його відновленими формами, на нашу думку, можна пояснити тим, що атом заліза перебуває в більш окисненій формі. Очевидно, що в цьому випадку, як і для дезоксигемоглобіну, поглинання пов'язане з поляризацією молекули. Розрахована енергія електронного переходу в цій ділянці становить 295 кДж/моль (див. таблицю), що свідчить про дестабілізацію порфіринової ароматичної системи завдяки порушенню копланарності. В ділянці 450-650 нм електронного спектра метгемоглобіну наявна низка

смуг поглинання з чітко вираженими максимумами при 502 та 630 нм (рис. 3), а також простежується тенденція до розходження цих смуг у довго- та короткохвилюву ділянці порівняно зі смугами поглинання відновлених форм гемоглобіну. Розрахована енергія переходу для смуги 630 нм досить незначна – 190 кДж/моль, її можна зачислити до низькоенергетичного $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходу. Оскільки граничні орбіталі порфіринового циклу та d -орбіталі Fe^{3+} мають близькі енергії [2], то, на нашу думку, цей перехід зумовлений утворенням йон-радикального комплексу порфіринового кільця й окисненої форми заліза (Fe^{3+}). Такий висновок узгоджується з даними літератури [5, 10], у яких зазначають про утворення катіон-радикала порфірину внаслідок взаємодії з металами у вищому ступені окиснення.

Отже, досліджені спектрофотометричні характеристики та виконані розрахунки енергій електронних переходів для дезокси-, окси-, карбокси- та метгемоглобінів дають змогу припустити, що для дезоксигемоглобіну є можливим часткове витягування з площини гему не лише йонів Fe^{2+} , а й атомів азоту протопорфіринового кільця, що зменшує спряження, зсуває максимум поглинання у видиму ділянку, загалом дестабілізує молекулу. У молекулі оксигемоглобіну утворюється π -зв'язок між йоном Fe^{2+} та киснем унаслідок перекривання d_{xz} -орбіталі Fe^{2+} і π -орбіталі O_2 . Близькі спектральні характеристики окси- і карбоксигемоглобіну свідчать про незначні структурні зміни в разі заміни одного ліганду іншим. Зміцнення зв'язування CO з йоном Fe^{2+} пов'язане з вищою нуклеофільною здатністю атома вуглецю порівняно з атомом кисню. Розрахована енергія електронного переходу для метгемоглобіну досить незначна – 190 кДж/моль, і її можна віднести до низькоенергетичного $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходу, зумовленого утворенням йон-радикального комплексу протопорфіринового кільця й окисненої форми заліза Fe^{3+} .

1. Волькенштейн М.В. Биофизика. М.: Наука, 1988. 452 с.
2. Коллмен Дж., Хигедас Л., Нортон Дж., Финке Р. Металлорганическая химия переходных металлов. М.: Мир, 1989. Т. 1. С. 199-200.
3. Сухомлинов В.К., Тиунов Л.А., Лукьянец В.М., и др. Спектрофотометрическое исследование системы лигандных форм гемоглобина в одной пробе крови // Вестн. Львов. ун-та. Сер. биол. 1988. Вып. 18. С. 36-42.
4. Федорова Н.А. Нормальное кроветворение и его регуляция. М.: Медицина, 1976. 543 с.
5. Almong J., Baldwin J.E., Huff J. Reversible oxygenation and autooxidation of a "capped" porphyrin iron (II) complex // J. Amer. Chem. Soc. 1975. Vol. 97. P. 227-228.
6. Collman J.P., Brauman J.L., Rose E., Suslick K.S. Cooperativity in O_2 binding to iron porphyrins // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. Vol. 75. P. 1052-1055.
7. Cordone L., Cupane A., Leone M., Vitrano E. Optical absorption spectra of deoxy- and oxygemoglobin in the temperature range 300-20 K relation with protein dynamics // Biophys. Chem. 1986. Vol. 24. P. 259-275

8. *Drabkin D.L.* A simplified technique for a large scale crystallization of human oxyhemoglobin. Isomorphous transformations of hemoglobin and myoglobin in the crystalline state // *Archives of Biochemistry*. 1949. Vol. 21. P. 224-231.
9. *Eaton W.A., Hanson L.K., Stephens P.J., et al.* Optical spectra of oxy- and deoxyhemoglobin // *J. Amer. Chem. Soc.* 1978. Vol. 100. P. 4991-5001
10. *Frieden F.* Non-covalent interactions // *J. Chem. Educ.* 1975. Vol. 52. P. 754-761.
11. *Keune H.* *Chimica. Ein Wissensspeicher.* Leipzig. 1972. 573 p.

INVESTIGATION OF DIFFERENT LIGAND FORMS OF HEMOGLOBIN BY THE METHOD OF ELECTRONIC SPECTROSCOPY

K. Dudok, R. Bilyi, A. Fedorovych

*Ivan Franko National University of L'viv,
Hrushevskogo st. 4, L'viv 79005, Ukraine,
e-mail: rbilyi@yahoo.com*

Spectrophotometrical characteristics of deoxy-, oxy-, carboxy- and methemoglobin were investigated. Energy calculations of electron transitions were carried out. In deoxyhemoglobin not only ion Fe(II) but also Nitrogen atoms move out of porphyrin plain. In oxyhemoglobin bond formation between Fe(II) d_{xz} -orbitals and π -orbitals of O₂. Calculated energy of electron transitions in methemoglobin is rather small. This suggest the $\pi \rightarrow \pi^*$ electron transition which take place when ion-radical complex of porphyrin ring and oxydized form of Fe(III) is formed.

Key words: hemoglobin, oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, electron transitions.

Стаття надійшла до редколегії 31.10.2001

Прийнята до друку 28.02.2002