

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛЮКОЗЫ С ГЕМОГЛОБИНОМ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Скоростецкая Л.А., Смиян П.И., Литвинко Н.М.

Скоростецкая Л.А.

*Старший научный сотрудник лаборатории прикладной энзимологии Государственного научного учреждения
«Институт биоорганической химии НАН Беларуси»,
г. Минск, Беларусь
E-mail: lydiask@mail.ru*

Смиян П.И.

*Младший научный сотрудник лаборатории прикладной энзимологии Государственного научного учреждения
«Институт биоорганической химии НАН Беларуси»,
г. Минск, Беларусь
E-mail: smiyanpoli@gmail.com*

Литвинко Н.М.

*Доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией прикладной энзимологии Государственного научного учреждения
«Институт биоорганической химии НАН Беларуси»,
г. Минск, Беларусь
E-mail: litvinko@iboch.by*

*В данной статье изучаются *in vitro* спектральные изменения гемоглобина (метформа) в полосе Соре ($405 < A < 423$ нм) и точно при поглощении на 423 нм (что указывает на появление в среде супероксидистеля – феррильного радикала гемоглобина $\bullet\text{HbFe(IV)=O}$). Исследование проводится в условиях возрастающей концентрации глюкозы (от 1 до 500 мкМ) с уменьшением насыщенности среды кислородом за счет его замещения азотом, в качестве модели гипоксии. Показано, что в условиях гипоксии Hb менее восприимчив к воздействию глюкозы, так как прогрессивное снижение интенсивности спектров гемопротеина под влиянием возрастающей концентрации глюкозы наблюдается только в нормальных условиях. Установлено в азотсодержащей среде увеличение оптического поглощения Hb при 423 нм при повышении концентрации глюкозы от 250 до 500 мкМ. Следовательно, в условиях гипоксии при максимальных концентрациях глюкозы появляется реактивная форма феррилгемоглобина, которая, если экстраполировать эти результаты на живой организм, может вызвать нежелательные последствия окислительного характера.*

Ключевые слова: гемоглобин; спектроскопия; глюкоза; гипоксия

INTERACTION OF GLUCOSE WITH HEMOGLOBIN UNDER HYPOXIA

Skorostetskaya L.A.

Senior Researcher, Laboratory of Applied Enzymology, State Scientific Institution "Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,"

Minsk, Belarus

Email: lydiask@mail.ru

Smiyan P.I.

Junior Researcher, Laboratory of Applied Enzymology, State Scientific Institution "Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,"

Minsk, Belarus

E-mail: smiyanpoli@gmail.com

Litvinko N.M.

Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Applied Enzymology, State Scientific Institution "Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus," Minsk, Belarus

Academy of Sciences of Belarus," Minsk, Belarus

E-mail: litvinko@iboch.by

In this article the spectral changes of hemoglobin (metform) in the Soret band ($405 < A < 423$ nm) and pointwise at absorption at 423 nm (give thought to the appearance of a superoxidizer in the medium – the hemoglobinferryl radical •HbFe(IV)=O), are studied in vitro. The investigation was carried out under conditions of increasing glucose concentrations (from 1 to 500 μ M) with a decrease in the saturation of the medium with oxygen due to its replacement with nitrogen, thus modeling hypoxia. It has been established that under hypoxic conditions, Hb is less susceptible to the effects of glucose, because a progressive decrease in the intensity of the hemo-protein spectra under the influence of increasing glucose concentrations is observed only under normal conditions. In a nitrogen-containing medium, a raise in the optical absorption of Hb at 423 nm was established with an increase in the glucose concentration from 250 to 500 μ M. Consequently, under hypoxic conditions at maximum glucose concentrations, a reactive form of ferrylhemoglobin appeared, which, if these results are extrapolated to a living organism, can cause undesirable oxidative consequences.

Key words: *hemoglobin; spectroscopy; glucose; hypoxia*

Введение. Согласно отчетам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), диабетом страдают 347 миллионов человек во всем мире [1]. В основу современного способа диагностики диабета положена способность гемоглобина (Hb) взаимодействовать с глюкозой с образованием гликозилированного (гликированного) химического аддукта – HbA1c (рис. 1). Считается, что уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) отражает гликемический показатель человека за последние два-три месяца (средняя продолжительность жизни эритроцитов), и этот показатель коррелирует с наступлением диабета 2 типа [2]. Гипергликемия, развивающаяся при диабете, ведет к избытку активной формы кислорода (АФК), что вызывает денатурацию белков и повреждение мембран эритроцитов в результате окислительного стресса.

Гипоксия играет важную роль как в возникновении, так и в течении многих заболеваний, поскольку любое патологическое состояние связано с нарушением насыщения организма кислородом [4]. Однако, постепенная акклиматизация к гипоксии у экспериментальных мышей коррелировала с резким падением уровня глюкозы в крови, уменьшение концентрации гемоглобина в кровотоке при этом улучшало гомеостаз глюкозы и понижало уровень инсулинорезистентности [5].

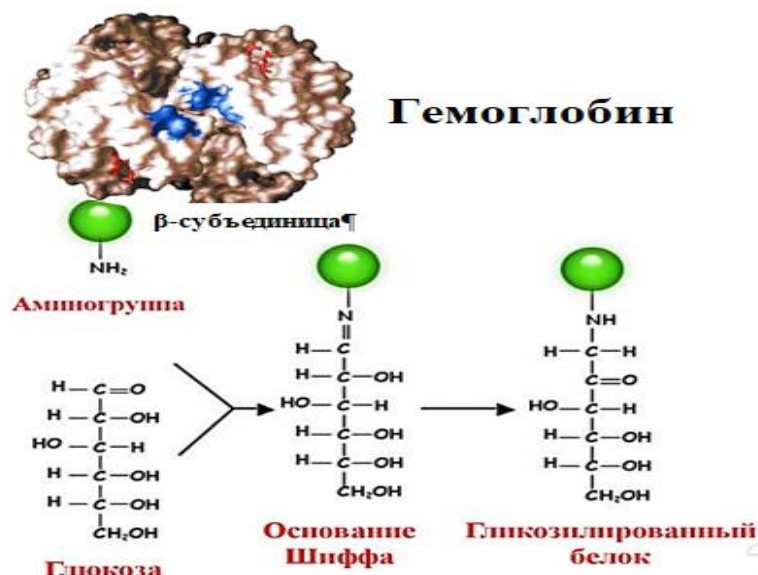


Рис. 1. Образование гликозилированного (гликированного) гемоглобина

Известна также пониженная заболеваемость диабетом у жителей высокогорных районов, однако физиологический механизм этого эффекта не вполне понятен. Ввиду этих парадоксальных эффектов, изучение взаимодействия Hb и свободной глюкозы в условиях пониженного содержания кислорода в среде представляет вполне практически обусловленный интерес. В данной работе исследуются *in vitro* спектральные изменения в области полосы Core, что позволяет зафиксировать возможные сдвиги максимума поглощения при переходе в другие формы Hb на примере метгемоглобина (metHb) – гемоглобина в трехвалентном состоянии (Fe^{3+}) – в условиях повышающихся концентраций глюкозы при снижении насыщенности среды кислородом, моделирующим гипоксию. В норме MetHb в некотором количестве постоянно образуется из Hb, повышенное содержание его является маркером окислительного стресса. *In vivo* Hb (Fe^{+2}) в результате процессов автоокисления частично превращается из оксиформы в метформу ($\text{HbFe(II)O}_2 \rightarrow \text{HbFe(III)} + \text{O}_2^{\cdot-}$) с образованием активной формы кислорода (АФК) – супероксидного аниона ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Последний способен далее превращаться либо с образованием перекиси водорода ($2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$), либо инициировать по каскадному принципу массивное окисление клеточных биоструктур, приводящее к разнообразным патологиям. Хорошо известно, что в биологических системах гемоглобин, помимо выполнения функции переносчика кислорода, может также действовать как фермент – пероксидаза (так называемая псевдопероксидазная активность). Постоянно образующаяся в живом организме

перекись водорода взаимодействует с метформой гемоглобина и может путем гетеролитического расщепления пероксидной связи O-O, координированной с железом гема ($\text{HbFe(III)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \bullet\text{HbFe(IV)=O} + \text{H}_2\text{O}$), приводить к образованию двухэлектронного продукта окисления, гемоглобинферрильного радикала $\bullet\text{HbFe(IV)=O}$, также обладающего повышенной реакционной способностью к окислению биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, углеводов) или низкомолекулярных биорегуляторов (липидов, жирных кислот, аминов и стероидных гормонов) [6]. О появлении феррилгемоглобина HbFe(IV)=O можно судить по увеличению поглощения гемопротеида при 423 нм – максимум поглощения этой формы.

Методы. В работе использовали коммерческий препарат Hb человека (80 % метформы, Sigma-Aldrich, США). Для моделирования гипоксии через рабочий раствор (0,05 М Трис-HCl-буферный раствор, pH 8.0) в высоком цилиндре пропускали азот (N_2) на протяжении 3 минут, далее закрывали сосуд пробкой и оставляли на 15 минут для насыщения N_2 . Пропускание N_2 через раствор Hb непосредственно приводит к его агрегации и дальнейшему осаждению. Концентрированный раствор Hb (50 мкМ) разводили до концентрации 5 мкМ (по гемму), и быстро регистрировали абсолютный спектр на спектрофотометре Specord uv-vis (Германия), фиксируя положение максимума поглощения (Hb_0). В опытную кювету прибора, содержащую 5 мкМ раствор Hb, насыщенный N_2 , добавляли раствор глюкозы минимальной концентрации (0,001 мМ) и через 1 минуту снова регистрировали спектр поглощения, а затем на спектрофотометре Солар 1251С (Беларусь) регистрировали показания A_{423} против буферного раствора. Данная процедура повторялась на свежей порции Hb с другой концентрацией глюкозы. Кривую зависимости от логарифма концентрации глюкозы сравнивали с контрольными значениями, полученными на интактном буферном растворе с естественным содержанием газов (21 % кислорода и 78 % азота).

Результаты и обсуждение. Мы предположили, что определение спектральных изменений гемоглобина в полосе Soret и отдельно поглощения при 423 нм в среде, насыщенной азотом, в присутствии свободной глюкозы, позволит выяснить влияние гипоксии на проявление псевдопероксидазной активности последнего, обусловленной образованием гемоглобинферрильного радикала $\bullet\text{HbFe(IV)=O}$, в отношении их взаимодействия.

Для исследования этого вопроса нами было изучено *in vitro* воздействие свободной глюкозы на спектральные характеристики Hb в видимой области ($405 < \lambda < 423$ нм) в условиях нормального содержания кислорода в среде и искусственно сниженного, имитирующего состав венозной крови, с использованием коммерческих препаратов Hb человека и глюкозы.

Спектроскопические измерения показывают свою высокую чувствительность и стабильный характер, а в области полосы Soret позволяют регистрировать малейшие изменения этого гемопротеида. А также требуется очень небольшое количество материала для анализа [9].

Об изменениях в состоянии Hb следили по развивающимся абсолютным спектрам Hb в видимом диапазоне в области полосы Soret ($405 < \lambda < 423$ нм), а

также при фиксированном значении при длине волны 423 нм, отражающей появление в растворе Нв реакционноспособной формы феррилНв ($\bullet\text{Нв Fe(IV)=O}$). На рисунке 2 представлены абсолютные спектры Нв, регистрируемые в области полосы Сорс (сплошная верхняя линия), с добавленной в нормальных условиях (н.у.) глюкозы (конечная концентрация 0,1 мМ, крупный пунктир, средняя линия) и той же концентрации глюкозы в среде, насыщенной азотом (мелкий пунктир, нижняя линия). Как видно из представленного рисунка, общая интенсивность спектра снижается при добавлении глюкозы без смещения положения максимума.

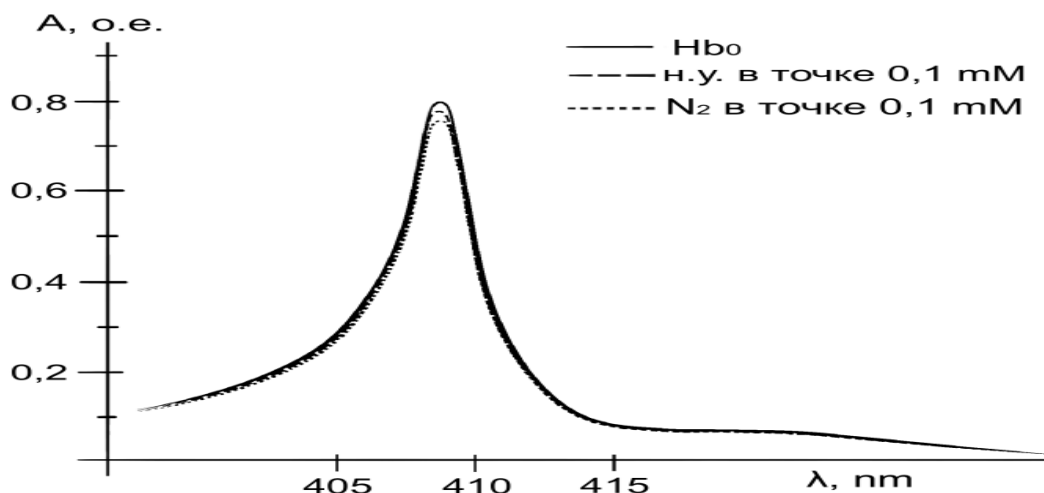


Рис. 2. Спектры Нв (полоса Сорс): до добавления глюкозы (сплошная верхняя линия), после добавления глюкозы в нормальных условиях (конечная концентрация, 0,1 мМ, крупный пунктир, средняя линия), и после добавления глюкозы в условиях насыщения N_2 (0,1 мМ, мелкий пунктир, нижняя линия)

На рисунке 3 представлена зависимость спектральных изменений Нв, отнесенных к исходной величине поглощения Нв, от концентрации глюкозы (в логарифмических единицах) в нормальных условиях и после пропускания через среду азота. В нормальных условиях при увеличении концентрации глюкозы наблюдается прогрессивное падение интенсивности спектров, начиная с минимальной концентрации (1 мкМ). В противоположность этому в атмосфере N_2 интенсивность спектра мало изменяется во всем диапазоне концентраций, оставаясь сниженной по сравнению с исходным значением. В максимальной из исследованных концентраций (0,5 мМ) для нормальных условий снижение интенсивности спектра достигает 6 % от исходного значения.

В случае замены естественного состава газов на азот минимальное значение A_{423} (5 %) наблюдается при концентрации глюкозы 0,1 мМ. Однако с ростом концентрации глюкозы от 250 до 500 мкМ в условиях гипоксии эта тенденция сменяется на рост этого показателя до 5 % выше нормы (рис. 4).

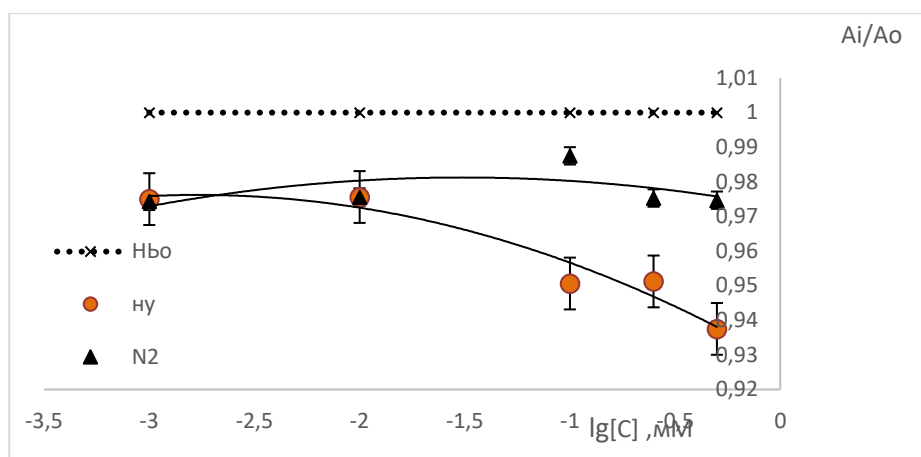


Рис. 3. Зависимость спектральных изменений НЬ, отнесенных к исходной величине поглощения НЬ, от логарифма концентрации глюкозы в нормальных условиях и в атмосфере азота

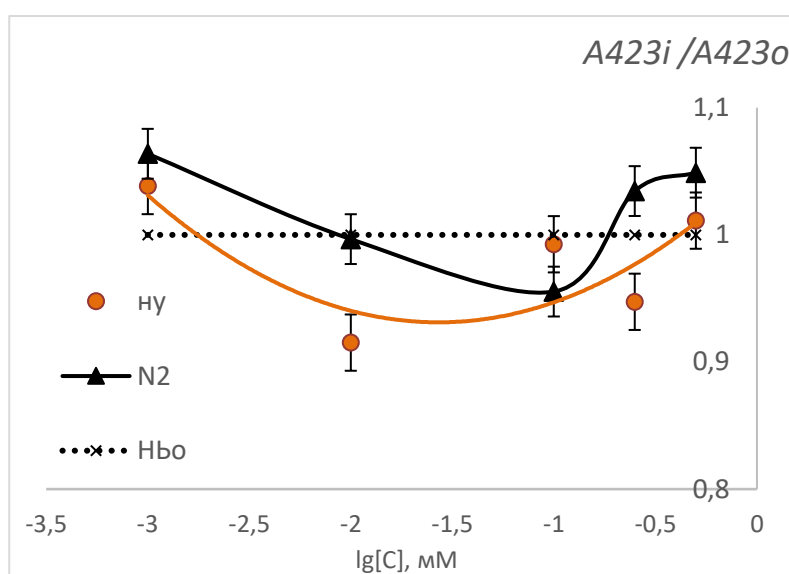


Рис. 4. Зависимость изменений поглощения НЬ при 423 нм, отнесенных к исходной величине поглощения НЬ, от логарифма концентрации глюкозы в нормальных условиях и в атмосфере азота. Каждая точка является средним значением не менее 3-5 измерений

Заключение. В данной работе исследованы *in vitro* в полосе Сорэ изменения абсолютного спектра metHb, находящегося в трехвалентном состоянии (Fe^{3+}), как маркера окислительного стресса, в условиях повышающихся концентраций глюкозы при насыщении среды азотом, моделирующим гипоксию.

В среде, насыщенной азотом, установлено отсутствие влияния повышения концентрации глюкозы от 1 до 500 μM на спектр НЬ, в то время как в нормальных условиях с ростом ее содержания наблюдается прогрессивное снижение его интенсивности. Это предполагает, что в условиях гипоксии НЬ менее подвержен воздействию свободной глюкозы.

Можно также сделать вывод, что глюкоза в нормальных условиях, в-целом, не вызывает значительного появления реакционноспособной формы феррилгемоглобина. Увеличение оптического поглощения НЬ при 423нм в среде, насыщенной азотом, показывает появление в условиях гипоксии реакционноспособной формы феррилгемоглобина в диапазоне концентраций от 250 до 500 μM

глюкозы, что может при экстраполяции на живой организм вызвать нежелательные последствия окислительного характера в кровотоке.

Таким образом, полученные результаты, действительно, показывают существенное влияние гипоксии на спектральные изменения Hb в присутствии свободной глюкозы в исследуемом диапазоне ее концентраций.

Список литературы

1. World Health Organization; 2010. www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf.
2. Qu, F. Visit-to-visit glycated hemoglobin A1c variability in adults with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis / F. Qu, Q. Shi, Y. Wang, Y. Shen, K. Zhou, E. R. Pearson, Sh. Li // *Chin. Med J.* – 2022. – 135(19). – P. 2294–2300. Doi: 10.1097/CM9.0000000000002073.
3. Damjanov, S. K. Glycated hemoglobin A1c as a modern biochemical marker of glucose regulation / M. Đerić, N. E. Kojić // *Med Pregl.* – 2014. – 67(9-10). – P. 339-344.
4. Николаева А. Г., Использование адаптации к гипоксии в медицине и спорте – Монография. – Витебск: ВГМУ. – 2015.-150 с.
5. Midha, A. D. Organ-specific fuel rewiring in acute and chronic hypoxia redistributes glucose and fatty acid metabolism / Y. Zhou, B. B. Queliconi, A. M. Barrios, A. G. Haribowo, B. T.L. Chew, C. O. Y. Fong, J. E. Blecha, H. VanBrocklin, Y. Seo, I. H. Jain. // *Cell Metabolism.* – 2023. –35. – P. 504–516.
6. Kanner J. Initiation of membranal lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin/ J. Kanner, S. Harel // *Arch Biochem Biophys.* – 1985. –237(2)– P. 314-321. Doi: 10.1016/0003-9861(85)90282-6.PMID: 3977316.
7. Cherni, I. Non-invasive and rapid diagnosis of type 2 diabetes mellitus based on the analysis of hair by front-face fluorescence spectroscopy / I. Cherni, R. Nour, H. Ghalila, M. Somaï, F. Daoued, Z. Aydi, S. Hamzaoui, F. Boussema, N. Jaïdane // *Appl Opt.* – 2022.–61(14). – P. 4022 – 4029. Doi: 10.1364/AO.454245.
8. Mitra I. Early developments toward HbA_{1c} determination in whole blood by high-speed sample preparation and LC–MS/MS analysis / I. Mitra, A. Leinenbach, A. Geistanger, A. Huber, T. Dülffer, S. Adam, L. Hillringhaus, M. Silvestre, H. Busskamp, S. Vopel // *Anal. Bioanal.Chem.* – 2024. – 416(29). – P. 6735–6744. Doi: 10.1007/s00216-024-05601-5.
9. Mallya M. Absorption spectroscopy for the estimation of glycated hemoglobin (HbA_{1c}) for the diagnosis and management of diabetes mellitus: a pilot study / M. Mallya, R. Shenoy, G. Kodyalamoole, M. Biswas, J. Karumathil, S. Kamath // *Photomed. Laser. Surg.* – 2013.– 31(5). – P. 219–224. doi: 10.1089/pho.2012.3421.