

## БИМОЛЕКУЛЯРНАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ МОЛЕКУЛЫ КИСЛОРОДА С ЗОЛЬ-ГЕЛЬ ИНКАПСУЛИРОВАННЫМ ГЕМОГЛОБИНОМ В НЕРАВНОВЕСНОЙ ОКСИГЕНИРОВАННОЙ T-КОНФОРМАЦИИ

С. В. Лепешкевич\*, М. В. Пархоц, Б. М. Джагаров

УДК 543.422:547.963.4

<https://doi.org/10.47612/0514-7506-2023-90-2-165-173>

Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь; e-mail: s.lepeshkevich@ifanbel.bas-net.by

(Поступила 2 февраля 2023)

Разработана методика золь-гель инкапсулирования гемоглобина в дезоксигенированной T-конформации с последующим насыщением белка молекулярным кислородом ( $O_2$ ). Создана установка для золь-гель инкапсулирования гемоглобина в анаэробных условиях. Методом лазерной кинетической абсорбционной спектроскопии впервые зарегистрирована кинетика бимолекулярной рекомбинации  $O_2$  с инкапсулированным гемоглобином, стабилизированным преимущественно в оксигенированной T-конформации (ансамбле оксигенированных T-конформеров). Разработанная методика позволяет детально изучить  $O_2$ -связывающие свойства неравновесных конформационных состояний гемоглобина, что внесет существенный вклад в понимание механизма регуляции связывания  $O_2$  как нативным гемоглобином человека, так и искусственными переносчиками кислорода.

**Ключевые слова:** гемоглобин, золь-гель, инкапсулирование, молекулярный кислород.

A method has been developed for sol-gel encapsulation of hemoglobin in the deoxygenated T-conformation followed by saturation of the protein with molecular oxygen ( $O_2$ ). A set-up for sol-gel encapsulation of hemoglobin under anaerobic conditions has been made. Kinetics for the bimolecular recombination of  $O_2$  with encapsulated hemoglobin stabilized predominantly in the oxygenated T-conformation (in an ensemble of oxygenated T-conformers) was recorded for the first time by time-resolved absorption spectroscopy. The developed method allows to study in detail the  $O_2$ -binding properties of non-equilibrium conformational states of hemoglobin, which will make a significant contribution to understanding the mechanism of regulation of  $O_2$  binding by both native human hemoglobin and artificial oxygen carriers.

**Keywords:** hemoglobin, sol-gel, encapsulation, molecular oxygen.

**Введение.** Гемоглобин крови человека (hHb) является главным компонентом эритроцитов и выполняет в организме важнейшую биологическую функцию — транспорт молекулярного кислорода ( $O_2$ ) [1]. hHb состоит из двух димеров, образованных двумя неидентичными  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами. Эти четыре полипептидные субъединицы образуют сфероидную молекулу, в которой каждая субъединица имеет контакт с тремя другими. Методом рентгеноструктурного анализа установлено существование различных конформаций четвертичной структуры тетрамера hHb: T- и R-конформации — нелигандированная и лигандированная формы белка [2, 3]. Каждая субъединица гемоглобина содержит активный центр — гем b (Fe-протопорфирин IX), обратимо связывающий  $O_2$ . В отсутствие лиганда гемоглобин, содержащий двухвалентное гемовое железо, называют дезоксигемоглобином (Hb), в связанном с  $O_2$  состоянии — оксигемоглобином (HbO<sub>2</sub>). Гем b спрятан внутри белковой матрицы (рис. 1). Образование и разрыв химической связи гемовое железо– $O_2$  происходят в матрице белка. Лигандирование hHb сопровождается изменениями третичной структуры белка [4, 5]. В частности, при связывании лиганда атом железа, который в Hb выступает на 0.6 Å из плоскости гемового кольца, втяги-

## BIMOLECULAR RECOMBINATION OF MOLECULAR OXYGEN WITH SOL-GEL ENCAPSULATED HEMOGLOBIN IN A NON-EQUILIBRIUM OXYGENATED T-CONFORMATION

S. V. Lepeshkevich\*, M. V. Parkhats, B. M. Dzhagarov (B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; e-mail: s.lepeshkevich@ifanbel.bas-net.by)

вается в эту плоскость. Вслед за атомом железа ближе к гему перемещается и проксимальный гистидин F8 (рис. 1), а также связанные с ним соседние аминокислотные остатки [6, 7]. Изменения в третичной структуре белка вызывают изменения четвертичной структуры: происходит переход из нелигандированной *T*-конформации в лигандированную *R*-форму. При таком переходе возможно заселение короткоживущих неравновесных конформационных состояний: лигандированной *T*-конформации и нелигандированной *R*-формы. Таким образом, лигандирование белка, а также обратная ей реакция — делигандирование — являются триггерами конформационных переходов. Параметры связывания лиганда определяются как конформацией, так и динамикой белка.

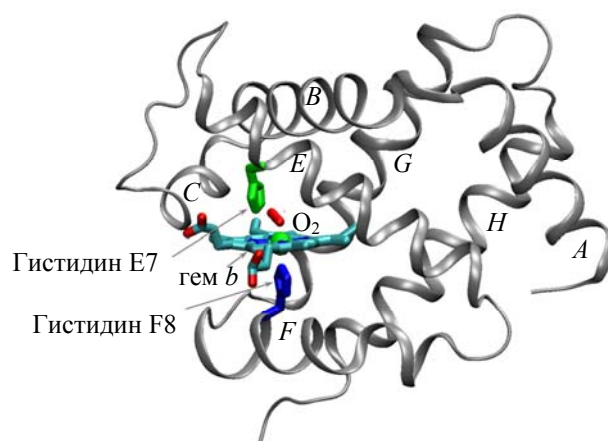


Рис. 1. Структура  $\alpha$ -субъединицы оксигемоглобина человека (PDB код 2DN1) [3] в ленточном представлении; дистальный гистидин E7, проксимальный гистидин F8, молекула гема *b* с ионом железа внутри, молекула кислорода ( $O_2$ ), координированная к иону железа, показаны скелетными моделями; гем *b* находится между спиралями *E* и *F*

Для описания физиологического процесса — транспорта  $O_2$  — необходимо определить индивидуальные свойства  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц в составе тетрамера гемоглобина, находящегося в различных конформационных формах. Эта проблема может быть решена путем детального исследования процесса связывания  $O_2$  как из внутренних областей белка (геминальная рекомбинация), так и из внешней среды — растворителя (бимолекулярная рекомбинация). Для изучения реакции связывания  $O_2$  с белком используется явление фотоиндуцированной диссоциации, когда с помощью лазерных импульсов в фиксированный момент времени разрывается связь железо- $O_2$  и далее, в максимуме дифференциального спектра поглощения дезокси-оксигемоглобина, регистрируется кинетика повторного связывания [8—11]. При фотовозбуждении  $HbO_2$  фотофизические процессы завершаются к 40 пс [12]. Спектральные изменения после 40 пс обусловлены повторным связыванием  $O_2$ . Для выяснения молекулярных механизмов кооперативной оксигенации hHb изучены индивидуальные свойства  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц в составе данного белка в *R*-конформации [12]. С этой целью созданы оксицианометвалентные гибриды hHb  $\alpha_2(Fe^{2+}-O_2)\beta_2(Fe^{3+}-CN)$  и  $\alpha_2(Fe^{3+}-CN)\beta_2(Fe^{2+}-O_2)$ , в которых только один тип субъединиц ( $\alpha$  или  $\beta$ ) может связывать  $O_2$ . Методом лазерной кинетической абсорбционной спектроскопии исследованы процессы связывания  $O_2$  и конформационной релаксации  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц во всем временном диапазоне протекания данных реакций (от 40 пс до 800 мкс включительно). Предложена кинетическая модель, учитывающая повторное связывание  $O_2$  из внутренних областей белка, миграцию  $O_2$  между внутрибелковыми сайтами, а также релаксацию третичной структуры белка. Впервые установлена неэквивалентность  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц тетрамера hHb в *R*-конформации как в связывании  $O_2$  из внутренних областей белка, так и в сопутствующей конформационной релаксации указанных субъединиц. Обнаружено, что релаксация третичной структуры обеих субъединиц приводит к уменьшению констант скоростей геминальной рекомбинации  $O_2$  с индивидуальными  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами в составе hHb, причем этот эффект более чем на порядок больше для  $\beta$ -субъединиц по сравнению с  $\alpha$ -субъединицами. Наблюдаемые изменения обусловлены уменьшением внутренней реакционной способности гема, которая в свою очередь регулируется геометрией комплекса гемовое железо—проксимальный гистидин F8 (рис. 1).

Наряду со значительными успехами в изучении термодинамически равновесной оксигенированной *R*-конформации отсутствует согласие по вопросу о реакционном различии  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц в составе тетрамера hHb в неравновесных оксигенированных *T*-конформациях. Для изучения этих состояний необходимо разработать методы их стабилизации или, по крайней мере, увеличения времени их существования настолько, чтобы оно было соизмеримо со временем проведения эксперимента, что позволило бы детально исследовать их индивидуальные свойства. Для стабилизации термодинамически неравновесных конформационных состояний предложен метод помещения (инкапсулирования) hHb изначально в равновесной дезоксигенированной *T*-конформации в нанопоры прозрачной золь-гель матрицы с последующим переводом белка в неравновесную лигандированную *T*-форму [13—16]. При этом для лигандирования белка использовался оксид углерода (CO) и в дальнейшем изучался процесс рекомбинации CO с инкапсулированным hHb в неравновесной карбонмоноокси-*T*-конформации. Показано [17], что инкапсулирование hHb способно существенно замедлить переходы между конформационными состояниями.

В настоящей работе для лигандирования белка использован молекулярный кислород, что позволило стабилизировать hHb в неравновесной окси-*T*-конформации. Цель настоящей работы — разработка метода стабилизации неравновесной оксигенированной *T*-конформации гемоглобина с последующим изучением его O<sub>2</sub>-связывающих свойств методом лазерной кинетической спектроскопии.

**Эксперимент.** Использована донорская кровь человека. Оксигемоглобин выделяли из предварительно отмытых от плазмы эритроцитов с разрушением мембран осмотическим лизисом и осаждением их центрифугированием. Для получения гомогенного hHb, свободного от органических фосфатов, проводилась дальнейшая очистка на колонке (65×1.5 см), заполненной ДЭАЭ-сефадексом А-50 [18].

Этапы золь-гель процесса содержат в себе ряд химических и физических процессов, формирующих базовую техническую схему (рис. 2, *а*): гидролиз тетраметилортосиликата (ТМОС); образование золя; литье золя в формы; поликонденсация и гелеобразование; созревание гидрогеля. Известно [19], что на скорость гидролиза влияют многие факторы, в частности температура, pH, концентрация растворителя. В области малых pH (кислотный гидролиз) скорость гидролиза наибольшая, а поликонденсации и деполимеризации — наименьшие. Максимальная по времени устойчивость золь с наиболее продолжительным периодом гелеобразования наблюдается при pH 1.5—3.0, тогда как минимальная устойчивость золь и быстро протекающий процесс образования золь-геля наблюдаются при pH 5—6. Свойства и структура золь-геля продолжают изменяться и после гелеобразования. Во время периода созревания (старения) золь-геля, которое происходит в течение довольно длительного времени (от нескольких часов до нескольких суток), продолжают процессы упрочнения сетки золь-геля за счет реакции поликонденсации и роста перешейков в структуре кремнекислородного каркаса и выдавливания интермицеллярной жидкости (синерезис). Вследствие капиллярного давления и усадки в золь-геле могут возникать значительные напряжения, приводящие к образованию трещин. Поэтому во избежание растрескивания золь-гель заливают буфером, где и происходит его созревание в стационарных условиях.

Для получения прозрачного золь-геля с инкапсулированным тетрамером hHb в неравновесной оксигенированной *T*-конформации гидролиз ТМОС с последующим формированием золя проводили в условиях кислотного катализа. Введение Hb в золь осуществляли в атмосфере инертного газа (аргона) (рис. 2, *а*). Для перевода белка в неравновесную оксигенированную *T*-конформацию золь-гель с инкапсулированным Hb промывали буферным раствором в присутствии кислорода.

Для получения золя в пластиковой пробирке смешали 0.6 мл ТМОС, 0.128 мл дистиллированной воды и 18 мкл 20-мМ HCl (кислотный катализатор). При тщательном перемешивании реактивов в течение 70 мин при температуре 2 °С осуществляется гидролиз ТМОС и образуется золь. Для получения образцов прозрачного золь-геля с инкапсулированным Hb в *T*-конформации необходимо проводить реакцию золь-гель образования в обескислороженной атмосфере (атмосфере инертного газа), поэтому создана установка для инкапсулирования белка в анаэробных условиях (рис. 2, *б*), состоящая из кюветы 1, двухгорлой круглодонной колбы 4, цилиндрической воронки 7 с впаянной газоотводной трубкой 8, трехгорлой круглодонной колбы 12 и промывной склянки 11. На начальной стадии процесса гелеобразования, когда золь представляет собой однородный прозрачный раствор, обладающий свойствами ньютоновской жидкости, золь (0.6 мл) и раствор HbO<sub>2</sub> (0.9 мл) в 10-мМ фосфатном буфере, pH 6.4, охлаждали до температуры 2 °С и вливали в отдельные выступы охлажденной кюветы 1. Предварительно в третий выступ, представляющий собой оптическую кювету, помещали 5 мг дитионита натрия (ДН) (рис. 2, *б*). Выступы кюветы 1, содержащие золь и раствор HbO<sub>2</sub>, помещали в бас-

сейн с охлаждающей жидкостью (2 °С). В трехгорлую круглодонную колбу 12 засыпали 626 мг ДН, 100 мл промывочного буфера (10-мМ фосфатный, pH 6.4) вливали в цилиндрическую воронку 7 при закрытом кране 9. При открытом канале *c-b* и закрытом канале *a-b* трехходового крана 15, открытых кранах 2 и 6, закрытом кране 9 через аппарат пропускали медленный ток газа. Через 70 мин продувки инертным газом открывали кран 9. Промывочный буфер по трубке 10 стекал в трехгорлую колбу 12, где смешивался с ДН, вследствие чего из буфера удалялись остатки растворенного O<sub>2</sub>. Для перемешивания промывочного буфера и ДН применяли магнитную мешалку 14, находящуюся под колбой 12. Спустя 1 ч 20 мин после начала продувки системы инертным газом к ДН в кювете 1 приливали раствор hHb и перемешивали. Спустя несколько минут образовавшийся после смешивания с ДН раствор Hb добавляли к золю, плавно перемешивали и переливали в оптическую кювету. При введении в стабилизированный (pH 1.5—3.0) золь буферного раствора hHb (pH 6.4) происходила дестабилизация золя и ускорение процесса агрегации коллоидных частиц. В последующие 10 мин при температуре 2 °С на стенке кюветы образовался однородный прозрачный золь-гель с инкапсулированным Hb в *T*-конформации.

Одной из существенных проблем при получении прозрачного золь-геля с инкапсулированным HbO<sub>2</sub> является окисление белка. Основным окислителем hHb в порах золь-геля выступает метиловый спирт, образующийся в процессе гелеобразования. С целью уменьшения концентрации спирта в порах золь-геля незамедлительно после его образования проводили его тщательную промывку буферным раствором из колбы 12 в анаэробных условиях. Последняя порция буфера не удаляется из кюветы, а остается в ней и используется в качестве заливочного буфера для покрытия золь-геля. Далее золь-гель выдерживали в атмосфере инертного газа в промывочном буфере в течение одного дня при температуре 2 °С. На следующий день (2-й день созревания золь-геля) кран 2 кюветы 1 открыли и промыли золь-гель с инкапсулированным Hb буферным раствором (10-мМ фосфатный буфер, pH 6.4) в присутствии молекулярного кислорода. При этом hHb насыщается молекулярным кислородом и происходит переход Hb в оксигенированную *T*-форму. Состояние hHb контролировали спектрофотометрически. Созревание золь-геля проходило в течение восьми дней при температуре 2 °С. На 9-й день созревания образец нагрели до 21 °С. На 13-й день созревания золь-геля измерена кинетика бимолекулярной рекомбинации O<sub>2</sub> с hHb.

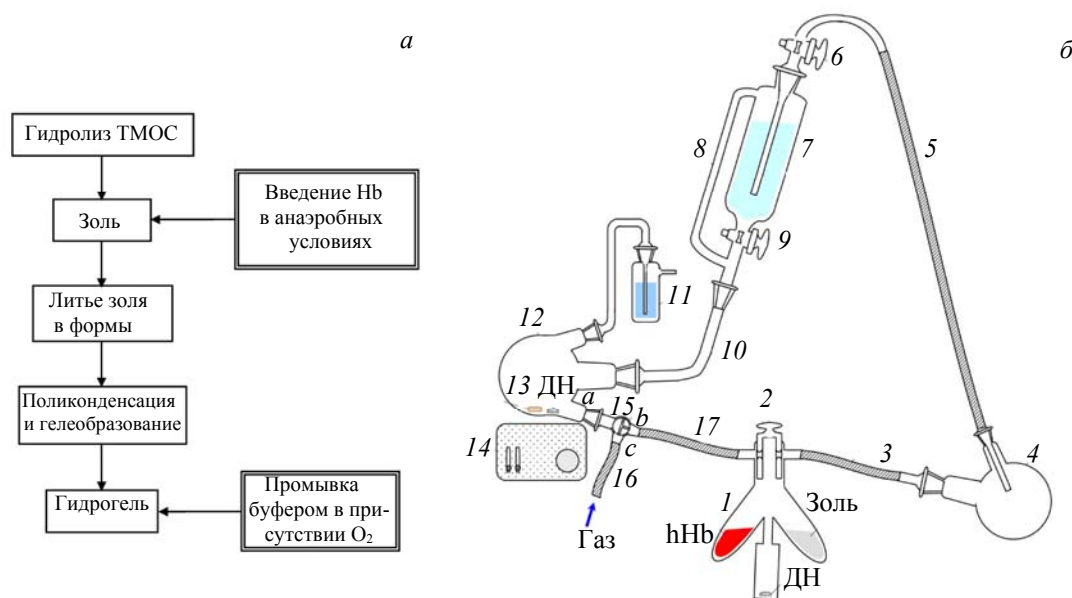


Рис. 2. Схема золь-гель инкапсулирования гемоглобина (а) и установка для инкапсулирования тетрамера Hb в *T*-конформации в нанопоры прозрачного золь-геля (б): 1 — кювета; 2 — кран кюветы; 3, 5, 17 — трубки резиновые; 4 — двухгорлая круглодонная колба; 6, 9 — краны цилиндрической воронки; 7 — цилиндрическая воронка; 8 — газоотводная трубка; 10 — трубка для стока буфера; 11 — промывная склянка; 12 — трехгорлая круглодонная колба; 13 — железный стержень, запаянный в пластик; 14 — магнитная мешалка; 15 — трехходовой кран; 16 — газоподводящая резиновая трубка; ДН — дитионит натрия; hHb — раствор гемоглобина

Согласно [20], переключению между конформационными состояниями hHb в буферных растворах способствует аллостерический эффектор — инозитол гексафосфат (ИНР). Введение в буферный раствор ИНР в присутствии  $O_2$  должно способствовать появлению hHb в оксигенированной *T*-конформации. Для исследования возможности получения такой конформации проведены эксперименты по влиянию различных концентраций ИНР на кинетику бимолекулярной рекомбинации  $O_2$  с hHb в буферных средах. Концентрация эффектора варьировалась в диапазоне 37—1250 мкМ при постоянной концентрации hHb (100 мкМ по гемю) в 12-мМ Tris HCl буфере, pH 7.5, 21 °С. При всех концентрациях эффектора зарегистрированы кинетики рекомбинации  $O_2$  с hHb.

Измерения кинетик выполнены во временном диапазоне от единиц микросекунд до единиц миллисекунд включительно на установке лазерной кинетической абсорбционной спектроскопии [21, 22]. В качестве светового импульса возбуждения использовалось излучение второй гармоники (532 нм) YAG:Nd-лазера (LS-2132U, LOTIS ТП, Беларусь). Длительность импульса 6—8 нс. В качестве источника зондирующего постоянного света применялась галогенная лампа накаливания КГМ24-150 с питанием от источника постоянного тока Б5-21. Лучи возбуждения и зондирования направлялись в образце навстречу друг другу под углом  $9 \pm 1^\circ$ . Излучение лампы фокусировалось на образец и далее на щель регистрирующего монохроматора, за выходной щелью которого располагался приемник оптического излучения. В качестве фотоприемника использован фотоэлектронный умножитель ФЭУ-84. Оцифровка, отображение и измерение сигналов фотолиза с фотоприемника осуществлялись посредством цифрового осциллографического блока BORDO 110 (“Унитехпром БГУ”, Беларусь). Описанная установка позволяла регистрировать изменения оптической плотности от  $10^{-5}$  отн. ед. с временным разрешением  $\sim 1$  мкс. Длина волны регистрации 430 нм выбрана вблизи максимума дифференциального спектра поглощения дезокси-оксигемоглобина (рис. 3).

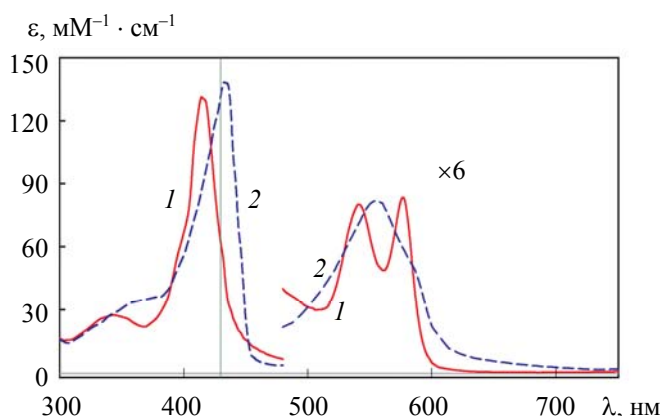


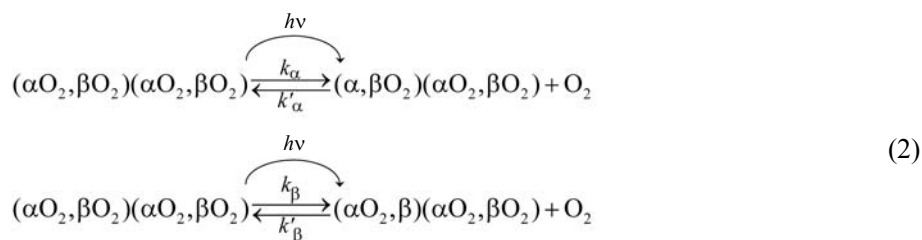
Рис. 3. Электронные спектры поглощения окси- (1) и дезоксигемоглобина (2) в видимой области; вертикальная линия — длина волны регистрации ( $\lambda = 430$  нм) при измерении кинетик бимолекулярной рекомбинации  $O_2$  с гемоглобином

При работе с лампой накаливания регистрировалось изменение сигнала  $\Delta I$  (в единицах тока), вызванное фотолизом, и отдельно (до и после измерения) постоянная компонента  $I_0$ . Изменения оптической плотности  $\Delta A(t)$ , обусловленные фотоиндуцированными процессами, рассчитывались как:

$$\Delta A(t) = -\lg \left( 1 + \frac{\Delta I(t)}{I_0} \right). \quad (1)$$

При нестационарном поглощении сигнал фотолиза  $\Delta I$  взят с отрицательным знаком.

**Результаты и их обсуждение.** Фотоиндуцированное повторное связывание  $O_2$  с тетрамером hHb изучалось при незначительном ( $\leq 1\%$ ) выходе молекул  $O_2$  из лигандированного белка. Такие условия фотовозбуждения соответствуют случаю, когда от каждой молекулы hHb статистически отрывается по одной молекуле  $O_2$ . По сути, после фотодиссоциации в среде, где расположен hHb, инициируются одновременно две реакции: одна осуществляется с участием  $\alpha$ -субъединицы тетрамера, вторая — с участием  $\beta$ -субъединицы. В случае полностью оксигенированного тетрамера эти реакции можно представить в виде:



где  $(\alpha\text{O}_2, \beta\text{O}_2)(\alpha\text{O}_2, \beta\text{O}_2)$  обозначает молекулу  $\text{HbO}_2$ ; оксигенированные субъединицы указаны вместе с молекулой  $\text{O}_2$ , дезоксигенированные — без  $\text{O}_2$ ; правая часть описывает ситуацию, когда фотодиссоциированная молекула  $\text{O}_2$  покинула белок и вышла в растворитель;  $k'_\alpha$  и  $k'_\beta$  — бимолекулярные константы скорости ассоциации  $\text{O}_2$  с  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами тригандированного белка;  $k_\alpha$  и  $k_\beta$  — мономолекулярные константы скорости диссоциации  $\text{O}_2$  в  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицах  $\text{hHb}$ .

В условиях эксперимента при лазерном облучении концентрация дезоксигенированных субъединиц создавалась на два порядка меньшей, чем концентрация растворенного  $\text{O}_2$ . При таких условиях бимолекулярную рекомбинацию  $\text{O}_2$  с любой субъединицей можно рассматривать как реакцию псевдопервого порядка, которая описывается простым экспоненциальным законом. Следовательно, с учетом неэквивалентности  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц кинетика бимолекулярной рекомбинации  $\text{O}_2$  с тригандированным  $\text{hHb}$ , находящимся только в одной конформации, описывается биэкспоненциальным законом:

$$\Delta A_{\text{норм}}(t) = a_\alpha \exp(-t/\tau_\alpha) + a_\beta \exp(-t/\tau_\beta), \quad (3)$$

где  $\Delta A_{\text{норм}}(t)$  — нормированное изменение оптической плотности образца как функция времени;  $a_\alpha$ ,  $a_\beta$ ,  $\tau_\alpha$  и  $\tau_\beta$  — амплитуды бимолекулярных процессов и характеристические времена повторного связывания  $\text{O}_2$  с  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами. Для амплитуд справедливо условие нормировки:  $a_\alpha + a_\beta = 1$ . Характеристическое время  $\tau$  рекомбинации  $\text{O}_2$  с исследуемой субъединицей определяется как константой скорости ассоциации  $k'$ , так и константой скорости диссоциации  $k$  [1, 23]:  $\tau = (k'[\text{O}_2] + k)^{-1}$ , где  $[\text{O}_2]$  — концентрация растворенного  $\text{O}_2$ . Эффективность выхода из белка определялась методом, описанным ранее [18, 24]. Если  $\text{hHb}$  во время повторного связывания лиганда находится в нескольких конформационных состояниях, рассматриваемая кинетика бимолекулярной рекомбинации  $\Delta A_{\text{норм}}(t)$  может быть описана функцией распределения времен [25, 12]:

$$\Delta A_{\text{норм}}(t) = A_0 \int_{-\infty}^{+\infty} g(\log \tau) e^{-t/\tau} d \log \tau, \quad (4)$$

где  $A_0$  — нормировочный множитель. Аппроксимация кинетических данных функцией распределения времен (4) выполнена с применением метода максимальной энтропии с привлечением программы MetExr (версия 3.0) [26, 27].

Ранее было показано [18, 24, 28—31], что кинетика бимолекулярной рекомбинации  $\text{O}_2$  с  $\text{hHb}$  в  $R$ -конформации в буферных растворах при комнатных температурах (рис. 4, кривая 1) аппроксимируется биэкспоненциальной функцией вида (3). Экспоненциальные временные зависимости соотношены с двумя параллельными процессами оксигенации  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц в составе тетрамерной  $R$ -формы  $\text{hHb}$ . Для  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц бимолекулярные константы скоростей ассоциации составляют  $30 \pm 3$  и  $66 \pm 3$   $\text{мкМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ . Показано [32], что функцией вида (3) аппроксимируется также кинетика бимолекулярной рекомбинации  $\text{O}_2$  с  $\text{hHb}$ , инкапсулированным в золь-гель матрицу в окси- $R$ -форме (рис. 4, кривая 2). Анализ кинетик бимолекулярной рекомбинации  $\text{O}_2$  с  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами в составе  $R$ -формы  $\text{hHb}$ , находящегося как в буферных средах (рис. 4, кривая 1), так и в нанопорах золь-геля (кривая 2), показывает, что инкапсулирование  $\text{hHb}$  в  $R$ -конформации приводит к заметным изменениям параметров бимолекулярной рекомбинации. В частности, показано [32], что для  $\alpha$ -субъединицы в составе  $\text{hHb}$  при инкапсулировании уменьшается константа скорости ассоциации  $k'_\alpha$  в 1.4 раза при неизменной эффективности выхода  $\text{O}_2$  из белка. Аналогичные изменения в кинетических параметрах для  $\alpha$ -субъединицы наблюдаются в буферных средах при модификации  $\text{hHb}$  хлоридом натрия и пиридоксаль-5'-фосфатом [30]. На основании приведенных данных можно сделать вывод, что в экспериментах с инкапсулированным  $\text{hHb}$  матрица золь-геля выступает в качестве эффектора, заметно модулирующего  $\text{O}_2$ -связывающие свойства белка. Можно предположить, что влияние на инкапсулированный  $\text{hHb}$  оказывают несконденсированные группы  $\equiv \text{Si}-\text{O}^-$ . Предполагается также, что эти ионизированные группы, “выстилающие” поры золь-геля, взаимодействуют с  $\text{hHb}$  в области фосфатных сайтов [2], расположенных в центральной полости тетрамера  $\text{hHb}$  между его  $\beta$ -субъединицами.



Исследования буферных растворов  $\text{HbO}_2$  с различной концентрацией ИНР показывают, что при концентрации 50 мкМ наблюдается максимальное замедление кинетики бимолекулярной рекомбинации  $\text{O}_2$ , которое указывает на появление конформационных состояний, обладающих более слабыми  $\text{O}_2$ -связывающими свойствами по сравнению с  $R$ -состоянием hHb. Кинетика рекомбинации  $\text{O}_2$  с hHb при данной концентрации ИНР представлена на рис. 4 (кривая 3). Необходимо отметить, что для описания данной кинетики требуется более сложная функция, чем функция вида (3), описывающая повторное связывание лиганда с индивидуальными  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами в составе hHb в фиксированной конформации. Рассматриваемая кинетика 3 на рис. 4 может быть аппроксимирована функцией распределения времен (уравнение (4)).

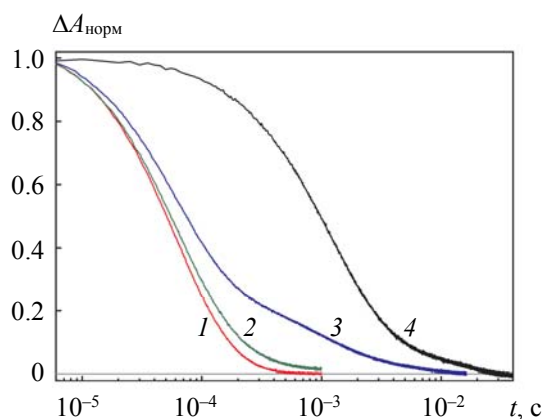


Рис. 4. Нормированные кинетики бимолекулярной рекомбинации  $\text{O}_2$  с hHb в буферном растворе (1, 3) и золе-гель матрице, в которую hHb инкапсулирован в окси- $R$ -форме (2), в дезокси- $T$ -форме и в последующем насыщен молекулярным кислородом (4); условия: 5—25-мМ Tris HCl буфер, pH 6.8—8.5 (1); золе-гель, 2 дня созревания, 25-мМ Tris HCl буфер, pH 7.4—8.5 (2); 12-мМ Tris HCl буфер, pH 7.5, 50-мкМ ИНР (3); золе-гель, 13-й день созревания, 10-мМ фосфатный буфер, pH 6.4 (4); концентрация hHb по гемму 100 мкМ;  $T = 21^\circ\text{C}$ ; максимальные изменения оптической плотности  $\Delta A \leq 0.013$

Распределения времен  $\tau$ , найденные при аппроксимации кинетик рекомбинации  $\text{O}_2$  с hHb в буферных средах как в отсутствие ИНР, так и при 50-мкМ ИНР, представлены на рис. 5 (кривые 1 и 2). В отсутствие ИНР hHb находится в  $R$ -конформации, а кинетика рекомбинации  $\text{O}_2$  с данной формой белка описывается распределением времен с двумя максимумами в диапазоне от  $5 \cdot 10^{-5}$  до  $\sim 10^{-4}$  с (кривая 1), что хорошо согласуется с результатами аппроксимации биэкспоненциальной функцией (3). При введении ИНР в распределении времен (кривая 2) возникают два дополнительных максимума при  $8 \cdot 10^{-4}$  и  $3 \cdot 10^{-3}$  с. Вклад данных максимумов в распределение времен  $\leq 25\%$ . Ранее [23] для  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц в составе металлических гибридов hHb, для которых свойственна преимущественно  $T$ -конформация, были определены индивидуальные константы скоростей ассоциации  $k'$  и диссоциации  $k$ . На основании этих данных можно определить нижнюю границу времен  $\tau_{\text{тр}}$ , характеризующих рекомбинацию  $\text{O}_2$  с hHb в  $T$ -конформации. Для наших условий эксперимента  $\tau_{\text{тр}} = 5 \cdot 10^{-4}$  с. Как видно из рис. 5, в распределении 2 присутствуют два максимума правее данной границы и один — левее. Следовательно, в рассматриваемых буферных средах в присутствии ИНР имеется смесь  $R$ - и  $T$ -конформационных форм hHb, причем вклад  $T$ -форм в кинетику бимолекулярной рекомбинации  $\leq 25\%$ . Дальнейшее повышение концентрации ИНР не приводит к увеличению вклада  $T$ -конформационных форм hHb в кинетику повторного связывания  $\text{O}_2$ . Таким образом, введение ИНР не позволяет получить преимущественно оксигенированную  $T$ -форму hHb в буферных средах.

Кинетика бимолекулярной рекомбинации  $\text{O}_2$  с инкапсулированным hHb в золе-гель матрице, в которую hHb изначально инкапсулирован в дезокси- $T$ -форме и в последующем насыщен молекулярным кислородом, представлена на рис. 4 (кривая 4). Распределение времен  $\tau$ , полученное для данной кинетики при аппроксимации функцией вида (4), приведено на рис. 5 (кривая 3). Как видно, данное распределение имеет максимумы при  $1.2 \cdot 10^{-3}$  и  $12 \cdot 10^{-3}$  с. Вклады рассматриваемых компонент

составляют 88 и 12 %. Компоненты с большим и меньшим вкладами характеризуются в  $\sim 10$  и  $100$  раз большим временем повторного связывания  $O_2$  по сравнению с характерными временами для hHb в  $R$ -конформации (рис. 5, кривая 1). Обе компоненты в распределении времен (кривая 3) лежат правее границы  $\tau_{gr}$  и, следовательно, можно утверждать, что наблюдаемая кинетика (рис. 4, кривая 4) описывает процесс рекомбинации  $O_2$  с hHb в  $T$ -конформации. Наличие в распределении времен двух максимумов с характеристическими временами, различающимися на порядок, может быть обусловлено существованием нескольких  $T$ -конформеров (ансамбля  $T$ -конформеров), а также наличием двух неэквивалентных  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц в оксигенированной  $T$ -конформации hHb с различающимися  $O_2$ -связывающими свойствами. Таким образом, зарегистрирована кинетика бимолекулярной рекомбинации  $O_2$  с hHb, стабилизированной преимущественно в термодинамически неравновесной лигандированной  $T$ -конформации (ансамбле лигандированных  $T$ -конформеров).

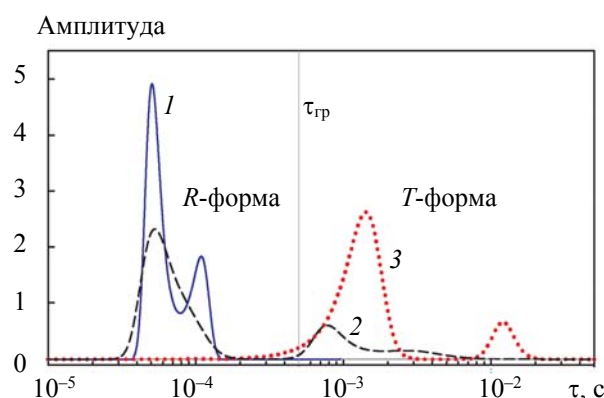


Рис. 5. Распределения времен  $\tau$ , полученные при аппроксимации кинетик бимолекулярной рекомбинации  $O_2$  с hHb в буферном растворе (1, 2) и золь-гель матрице (3), в которую hHb инкапсулирован в дезокси- $T$ -форме и в последующем насыщен молекулярным кислородом; условия: 5—25-мМ Tris HCl буфер, pH 6.8—8.5 (1); 12-мМ Tris HCl буфер, pH 7.5, 50-мкМ INP (2); золь-гель, 13-й день созревания, 10-мМ фосфатный буфер, pH 6.4 (3); вертикальной линией отмечена нижняя граница времен  $\tau_{gr}$ , характеризующих рекомбинацию  $O_2$  с hHb в  $T$ -конформации

**Заключение.** Создана установка для инкапсулирования гемоглобина в золь-гель матрицу в анаэробных условиях. Разработана методика инкапсулирования гемоглобина, изначально находящегося в дезоксигенированной  $T$ -конформации, с последующим насыщением белка молекулярным кислородом. Методом лазерной кинетической спектроскопии зарегистрирована кинетика бимолекулярной рекомбинации  $O_2$  с инкапсулированным гемоглобином, стабилизированным преимущественно в оксигенированной  $T$ -конформации (ансамбле оксигенированных  $T$ -конформеров). Разработанная методика позволит детально изучить  $O_2$ -связывающие свойства неравновесных конформационных состояний гемоглобина, что внесет существенный вклад в понимание механизма регуляции связывания  $O_2$  как нативным гемоглобином человека, так и искусственными переносчиками кислорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ Республики Беларусь “Фотоника и электроника для инноваций” (2021–2025 гг.) (задание № 1.8) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Ф07М-056).

- [1] E. Antonini, M. Brunori. Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands, North-Holland Publication Co., Amsterdam, London (1971)
- [2] M. F. Perutz. Nature, **228** (1970) 726—739
- [3] S.-Y. Park, T. Yokoyama, N. Shibayama, Y. Shiro, J. R. H. Tame. J. Mol. Biol., **360** (2006) 690—701
- [4] S.-I. Adachi, S.-Y. Park, J. R. H. Tame, Y. Shiro, N. Shibayama. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, N 12 (2003) 7039—7044
- [5] N. Shibayama, A. Sato-Tomita, M. Ohki, K. Ichianagi, S.-Y. Park. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **117** (2020) 4741—4748



- [6] J. Baldwin, C. Chothia. *J. Mol. Biol.*, **129** (1979) 175—220
- [7] F. Schotte, H. S. Cho, J. Soman, M. Wulff, J. S. Olson, P. A. Anfinsen. *Chem. Phys.*, **422** (2013) 98—106
- [8] Q. H. Gibson. *Biochemistry*, **38**, N 16 (1999) 5191—5199
- [9] W. A. Eaton, L. K. Hanson, P. J. Stephens, J. C. Sutherland, J. B. R. Dunn. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, N 16 (1978) 4991—5003
- [10] B. I. Greene, R. M. Hochstrasser, R. B. Weisman, W. A. Eaton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, N 11 (1978) 5255—5259
- [11] J. S. Olson. *Mol. Asp. Med.*, **84** (2022) 101024(1—15)
- [12] S. V. Lepeshkevich, I. V. Sazanovich, M. V. Parkhats, S. N. Gilevich, B. M. Dzhagarov. *Chem. Sci.*, **12**, N 20 (2021) 7033—7047
- [13] I. Khan, C. F. Shannon, D. Dantsker, A. J. Friedman, J. P.-G. de Apodaca, J. M. Friedman. *Biochemistry*, **39** (2000) 16099—16109
- [14] U. Samuni, D. Dantsker, L. J. Juszczak, S. Bettati, L. Ronda, A. Mozzarelli, J. M. Friedman. *Biochemistry*, **43** (2004) 13674—13682
- [15] C. Viappiani, S. Bettati, S. Bruno, L. Ronda, S. Abbruzzetti, A. Mozzarelli, W. A. Eaton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, N 40 (2004) 14414—14419
- [16] C. Viappiani, S. Abbruzzetti, L. Ronda, S. Bettati, E. R. Henry, A. Mozzarelli, W. A. Eaton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, N 35 (2014) 12758—12763
- [17] T. K. Das, I. Khan, D. L. Rousseau, J. M. Friedman. *Biospectroscopy*, **5** (1999) S64—S70
- [18] С. В. Лепешкевич, Н. В. Коновалова, Б. М. Джагаров. *Биохимия*, **68**, № 5 (2003) 676—685  
[S. V. Lepeshkevich, N. V. Konovalova, B. M. Dzhagarov. *Biochem. Mosc.*, **68**, N 5 (2003) 551—558]
- [19] Е. Н. Подденежный, А. А. Бойко. Золь-гель синтез оптического кварцевого стекла, УО “ГГТУ им. П. О. Сухого”, Гомель, Беларусь (2002)
- [20] L. Ronda, S. Bruno, S. Faggiano, S. Bettati, A. Mozzarelli. *Method Enzymol.*, **437** (2008) 311—328
- [21] S. V. Lepeshkevich, B. M. Dzhagarov. *Biochim. Biophys. Acta*, **1794** (2009) 103—109
- [22] S. V. Lepeshkevich, M. V. Parkhats, A. S. Stasheuski, V. V. Britikov, E. S. Jarnikova, S. A. Usanov, B. M. Dzhagarov. *J. Phys. Chem. A*, **118**, N 10 (2014) 1864—1878
- [23] S. Unzai, R. Eich, N. Shibayama, J. S. Olson, H. Morimoto. *J. Biol. Chem.*, **273**, N 36 (1998) 23150—23159
- [24] S. V. Lepeshkevich, J. Karpiuk, I. V. Sazanovich, B. M. Dzhagarov. *Biochemistry*, **43**, N 6 (2004) 1675—1684
- [25] S. V. Lepeshkevich, S. A. Biziuk, A. M. Lemeza, B. M. Dzhagarov. *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, N 10 (2011) 1279—1288
- [26] P. S. Steinbach, R. Ionescu, C. R. Matthews. *Biophys. J.*, **82**, N 4 (2002) 2244—2255
- [27] P. J. Steinbach. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, **42**, N 6 (2002) 1476—1478
- [28] B. M. Dzhagarov, S. V. Lepeshkevich. *Chem. Phys. Lett.*, **390**, N 1-3 (2004) 59—64
- [29] S. V. Lepeshkevich, N. V. Konovalova, I. I. Stepuro, B. M. Dzhagarov. *J. Mol. Struct.*, **735-736** (2005) 307—313
- [30] S. V. Lepeshkevich, B. M. Dzhagarov. *FEBS J.*, **272**, N 23 (2005) 6109—6119
- [31] S. V. Lepeshkevich, S. N. Gilevich, M. V. Parkhats, B. M. Dzhagarov. *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, N 9 (2016) 1110—1121
- [32] S. V. Lepeshkevich, M. V. Parkhats, I. I. Stepuro, B. M. Dzhagarov. *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, N 12 (2009) 1823—1830