

СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕМОГЛОБИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ МИКРООРГАНИЗМОВ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ АНТИГЕМОГЛОБИНОВОЙ АКТИВНОСТИ

Щуплова Е.А.¹, Фадеев С.Б.¹

¹ *Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Уральское отделение РАН (ИКВС УрО РАН), Оренбург, Россия (460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11), e-mail: Khanina83@yandex.ru*

Цель работы – спектральный анализ структуры гемоглобина под действием микроорганизмов с разным уровнем антигемоглобиновой активности. Материал и методы. Для оценки влияния микроорганизмов на гемоглобин определяли оптические спектры проб (сканирующий спектрофотометр «Genesys 5», США), состоящих из 2 мл супернатанта суточной исследуемой культуры штамма и 0,5 мл взвеси отмытых донорских эритроцитов человека (в концентрации 106 кл/мл) через 2, 6 и 24 ч с момента приготовления указанной пробы. В работе использовались 30 штаммов стафилококков, обладающих антигемоглобиновой активностью. Результаты. Под влиянием супернатантов штаммов стафилококков происходило снижение оптической плотности проб, содержащих гемолизат эритроцитов, в диапазонах 220-450 нм. Наиболее выраженное снижение оптической плотности происходило под действием супернатантов штаммов с высокой антигемоглобиновой активностью ($p < 0,05$), особенно в диапазоне 398-422 нм (порфириновый карман). Это указывает на то, что стафилококки с высоким уровнем АнтиHbA нарушают белковую структуру гемоглобина в большей степени, чем микроорганизмы с низкими показателями активности. В диапазонах 500-700 нм, характерных для гемовой части гемоглобина, наблюдали повышение оптической плотности опытных проб в сравнении с контрольными. Наибольшее увеличение этого показателя отмечено при длине волны 619 нм под влиянием штаммов с высоким уровнем АнтиHbA, ($p < 0,05$), что указывает на повышение доли метгемоглобина в 3,3 раза (до 13%). Таким образом, спектральный анализ структуры гемоглобина под действием микроорганизмов с разным уровнем антигемоглобиновой активности показал, что продукты жизнедеятельности бактерий способны нарушать конформационную структуру белковой части гемоглобина, а также влиять на гем, увеличивая долю метгемоглобина.

Ключевые слова: эритроциты, гемоглобин, бактерии, спектральный анализ.

SPECTRAL ANALYSIS OF HEMOGLOBIN BY MICROORGANISMS WITH DIFFERENT LEVELS OF ANTI – HEMOGLOBIN ACTIVITY

Schuplova E.A.¹, Fadeev S.B.¹

¹*The institute for cellular and intracellular symbiosis*

The aim - spectral analysis of hemoglobins structure by microbial action with different levels antihemoglobin activity. Materials and methods. The optical spectra of the samples (scanning spectrophotometer “Genesys 5”, USA), including 2 ml of the supernatant of daily culture of microorganisms strains and 0.5 ml suspension of washed donor human erythrocytes (concentration 106 cells / ml) 2h, 6h and 24h of preparation said sample were measured. 30 strains of Staphylococcus with antihemoglobin activity, was used in this study. Results. The decrease of the optical density of samples containing red blood cells hemolysate, in the range of 220-450 nm was influenced by the supernatants of strains of Staphylococcus. The most expressed decrease in the optical density under the supernatants of strains with high antigemoglobin activity ($p < 0.05$), especially in the range of 398-422 nm (porphyrin pocket) were detected. This indicates that staphylococcus high AntiHbA violate the protein structure of hemoglobin more than microorganisms with low activity. In the ranges of 500-700 nm, characteristic of the heme part of hemoglobin, increased optical density of the test samples compared to control was founded. The largest increase in this index at a wavelength of 619 nm under the influence of strains with high AntiHbA, ($p < 0.05$) were detected. This indicates the increase in the proportion of methemoglobin in 3.3 times (to 13%). Conclusion. Spectral analysis of the structure of hemoglobin by microbial action with different levels of antihemoglobin activity revealed that bacterial products can damage the conformational structure of the protein component of hemoglobin, as well as affect the heme, increasing the proportion of methemoglobin.

Key words: erythrocytes, hemoglobin, bacterias, spectral analysis.

Введение

Гемоглобин эритроцитов представляет собой гетерогенную систему, включающую не только его производные (сульфгемоглобин, метгемоглобин, цианметгемоглобин), но и ряд продуктов необратимой окислительной деградации гемоглобина, причем соотношение между компонентами этой системы может меняться под воздействием различных экзогенных и эндогенных факторов. На молекулярном уровне эти изменения могут вызывать конформационные перестройки четвертичной структуры белковой части гемоглобина, влиять на состояние его протетической группы, изменять спиновое состояние гемового железа, степень его окисления (образования метгемоглобина), а также влиять на структурно-функциональные системы эритроцита [6]. Данные процессы взаимосвязаны и могут снижать сродство тетрамерной молекулы гемоглобина к кислороду, что в конечном итоге способствует развитию тканевой гипоксии и связанных с ней клеточных повреждений [4]. При развитии инфекционных процессов, сопровождающихся бактериемией, может наблюдаться феномен инвазии микроорганизмов внутрь эритроцитов [2]. При этом между эритроцитами, а точнее консолидированными компонентами крови и бактериями может происходить конкурентная борьба за гемовое железо, являющееся важным компонентом биохимических процессов, обеспечивающих рост, размножение бактериальных клеток и образование факторов патогенности [10]. Особенности влияния микроорганизмов на систему гемоглобина изучены недостаточно.

Цель настоящей работы – спектральный анализ структуры гемоглобина под действием микроорганизмов с разным уровнем антигемоглобиновой активности.

Материал и методы

В работе использовали 30 клинических штаммов рода *Staphylococcus* (виды: *S.epidermidis*, *S.saprophyticus*, *S.cohni* и др.), выделенные из очагов гнойно-воспалительных заболеваний различной локализации [7], из них 15 штаммов с высоким уровнем (>3 г/л) антигемоглобиновой активности [3] и 15 – с низким (<3 г/л).

Для оценки влияния микроорганизмов на гемоглобин определяли оптические спектры пробы (сканирующий спектрофотометр «Genesys 5», США), состоящей из 2 мл супернатанта суточной исследуемой культуры штамма и 0,5 мл взвеси отмытых донорских эритроцитов человека (в концентрации 10^6 кл/мл) через 2, 6 и 24 ч с момента приготовления указанной пробы. В качестве контрольной использовали пробу, состоящую из 2 мл мясо-пептонного бульона (МПБ) и 0,5 мл взвеси эритроцитов в той же концентрации. Исследования проводили при постоянном температурном режиме 37 °С. Для проведения каждого измерения 0,5 мл исследуемой пробы смешивали с 0,5 мл дистиллированной воды с целью гемолиза эритроцитов. Оптическую плотность (ОП) определяли в диапазоне 450-700 нм. Полученные данные трактовали как изменение гемовой части гемоглобина [9]. Для оценки

изменений в белковой части гемоглобина, вышеуказанную часть пробы дополнительно разводили дистиллированной водой в 2 раза и определяли оптическую плотность исследуемого раствора в диапазоне 220-450 нм [9].

Для оценки спектральных параметров метгемоглобина рассчитывали разностные спектры, которые строили относительно модельного спектра, содержащего оксигемоглобин [4]. Для нивелирования отличий спектральных характеристик, обусловленных разной концентрацией гемоглобина в пробах, вычисляли разностные спектры по нормированным спектрам относительно поглощения проходящего света с длиной волны 576 нм [6]. При оценке полученных графиков анализировали точки (диапазоны длин волн), соответствующие частотным интервалам поглощения проходящего света метгемоглобином и различными аминокислотами. Частотные интервалы метгемоглобина составляли для видимой области спектра: 502-505; 538-542; 560-565; 619-620; 629-632 нм и для ультрафиолетовой части спектра - 252; 268-272; 408-415 [4].

Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке в компьютерной оболочке Windows с помощью процессора электронных таблиц Microsoft Office Excel 2007 с вычислением средней арифметической (M); средней ошибки (m); критерия значимости (t) Стьюдента. Различия считались значимыми (достоверными) при $p < 0,05$ [5].

Результаты исследования

На первом этапе спектрального анализа гемоглобина под действием супернатантов исследуемых штаммов было установлено, что после 2 часов инкубации проб регистрировалось повышение значений оптической плотности в спектральном диапазоне (230-450 нм), соответствующем белковой части гемоглобина. При этом наибольшие значения ОП ($0,130 \pm 0,001$ ед.) регистрировались под действием штаммов с высоким уровнем АнтиНвА при длине волны 252 нм, что соответствует спектру поглощения ароматических аминокислот. При действии супернатантов штаммов с низким уровнем АнтиНвА, при равных условиях, значения ОП исследуемых проб ($0,037 \pm 0,001$ ед. ОП; $p < 0,05$) было в 3,5 раза меньше. В контрольной пробе показания оптической плотности стремились к 0 (в сравнении с разностными спектрами), что свидетельствовало об отсутствии конформационных перестроек в белковой части гемоглобина.

При оценке спектра ОП контрольной и опытных проб через 6 ч инкубации с эритроцитами особое внимание обращали на диапазоны 246-270 нм, соответствующие полосам поглощения света аминокислотами белковой части гемоглобина и 398-422 нм – характерных для «порфиринового кармана». Показания оптической плотности проб в диапазоне, соответствующем аминокислотам (246-270 нм), под действием штаммов с высоким уровнем АнтиНвА снижались до отрицательных значений (рис. 1). Это может

свидетельствовать о том, что гемовая часть в молекуле гемоглобина становится менее «защищенной» белковой структурой гемоглобина. Под действием штаммов с низким уровнем АнтиНвА наблюдали менее выраженное понижение значений оптической плотности проб в аналогичном интервале до $-0,137 \pm 0,003$ ед. ОП, однако в диапазоне 271-350 нм ОП увеличивалась до $0,225 \pm 0,002$ ед. Такое изменение оптической плотности под действием штаммов с низким уровнем АнтиНвА свидетельствует о конформационных перестройках в белковой части гемового кармана. В контрольной пробе в диапазонах 254-366 нм (область, характерная для задержки проходящего света ароматическими и серосодержащими аминокислотами) значения ОП также оставались близкими к 0, т.е. структурные изменения белковой части гемоглобина не происходили. Под действием штаммов с высоким уровнем АнтиНвА в диапазоне 398-422 нм наблюдали снижение ОП до уровня $-0,198 \pm 0,002$ ед. При увеличении длины волны проходящего света регистрировалось повышение ОП этой же пробы до значения $0,063 \pm 0,006$ ед. ОП ($p < 0,05$). Такая существенная разница, по-видимому, свидетельствует о том, что наибольшие значения оптической плотности, соответствующие гемовой части гемоглобина, «смещаются» из коротковолновой в длинноволновую часть спектра. Данные изменения, вероятнее всего, связаны с тем, что микроорганизмы, изменяя белковую часть гемоглобина, затрагивают «порфириновый карман», где в гемовой части может происходить окисление железа, реализующееся в увеличении доли метгемоглобина в исследуемых пробах.

Под действием штаммов с низким уровнем АнтиНвА наблюдали аналогичные изменения ОП, которые характеризовались более низкими значениями: от $-0,134 \pm 0,001$ до $0,045 \pm 0,001$ ед., свидетельствующие о меньшем воздействии на «порфириновый карман» и накоплении метгемоглобина.

При анализе спектральных характеристик опытных проб через 24 ч инкубации супернатантов исследуемых штаммов с эритроцитами наблюдали незначительное волнообразное изменение ОП, что говорило о дальнейших конформационных изменениях в белковой части гемоглобина. В контрольной пробе в диапазонах 230-290 нм наблюдали отрицательные значения оптической плотности.

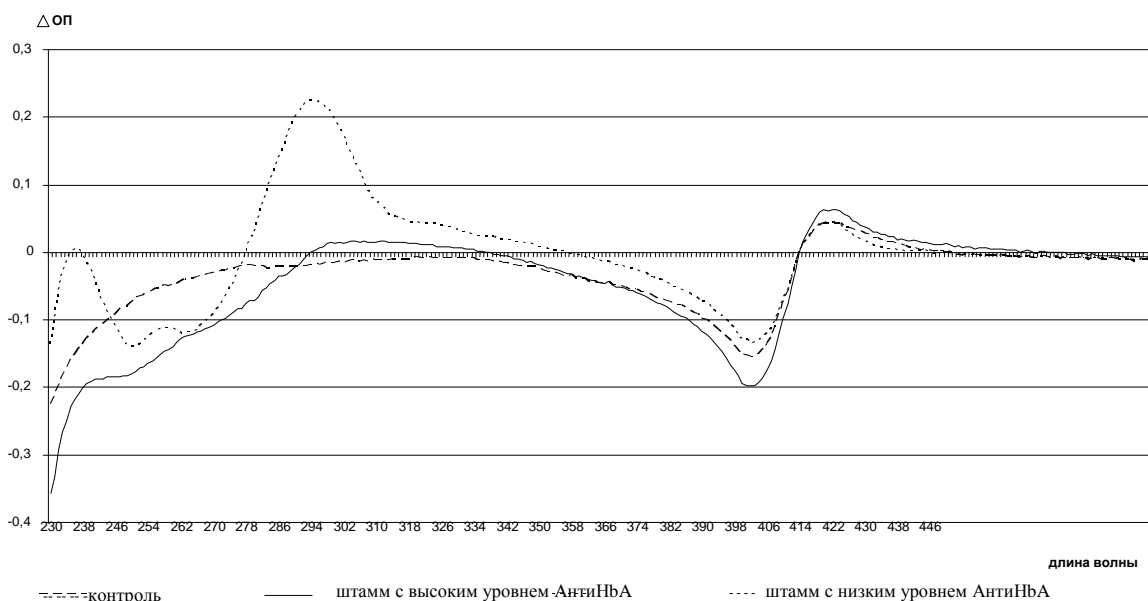


Рисунок 1 - Изменения спектров белковой части гемоглобина в эритроцитах под действием супернатантов исследуемых штаммов (6 ч инкубации)

Второй этап исследований заключался в проведении спектрального анализа гемоглобина под действием супернатантов исследуемых культур в видимой области спектра (450-700 нм), позволяющего оценить долю образовавшегося метгемоглобина (MetHb). Через 2 ч инкубации происходило более выраженное увеличение оптической плотности опытных проб при длине волны проходящего света 560 нм (спектр поглощения, характерный для метгемоглобина) под действием штаммов с высоким уровнем АнтиHbA, чем с низким ($0,024 \pm 0,001$ против $0,019 \pm 0,001$ ед. ОП; $p < 0,05$; при пересчете на долю метгемоглобина - 6% против 4%). В контрольной пробе через 2 часа выявлялись отрицательные значения спектральных параметров полос поглощения света (при 502 нм - $-0,025 \pm 0,001$ ед. ОП; при 630 нм - $-0,020 \pm 0,001$ ед. ОП), что свидетельствует о снижении уровня метгемоглобина.

В ходе спектральной оценки образования метгемоглобина (при соответствующей длине волны проходящего света 502 нм) было установлено, что ОП проб после шестичасовой инкубации эритроцитов с супернатантами штаммов с высокой АнтиHbA характеризовались большими значениями, чем после воздействия на эритроциты штаммов с низким уровнем АнтиHbA ($0,144 \pm 0,003$ ед. ОП против $-0,063 \pm 0,002$ ед. ОП, $p < 0,05$; при пересчете на долю образующего метгемоглобина оказалось 9% против 4%). Спектральная оценка при длине волны 562 нм показала, что влияние штаммов с высоким уровнем АнтиHbA на образование метгемоглобина привело к большему снижению оптической плотности проб ($0,032 \pm 0,001$ ед. ОП; в пересчете на долю метгемоглобина - 8%), чем при воздействии изолятов с низким

уровнем АнтиНвА ($0,040 \pm 0,001$ ед. ОП; при пересчете на долю метгемоглобина - 10%). Продолжение измерений при большей длине волны 632 нм выявило, что штаммы с высоким уровнем АнтиНвА, напротив, повышали оптическую плотность проб ($0,070 \pm 0,004$ ед. ОП; 9% MetHb), по сравнению со штаммами, обладающими низким уровнем АнтиНвА ($0,047 \pm 0,001$ ед. ОП; $p < 0,05$; 5% - MetHb). В контрольной пробе значения спектральных параметров гемоглобина оказались отрицательными, что свидетельствует о наименьшем образовании метгемоглобина.

После 24 ч инкубации опытных проб наблюдали наиболее выраженные изменения значений спектров, соответствующих метгемоглобину, под действием штаммов с высоким уровнем АнтиНвА, чем с низким уровнем данного свойства (рис. 2).

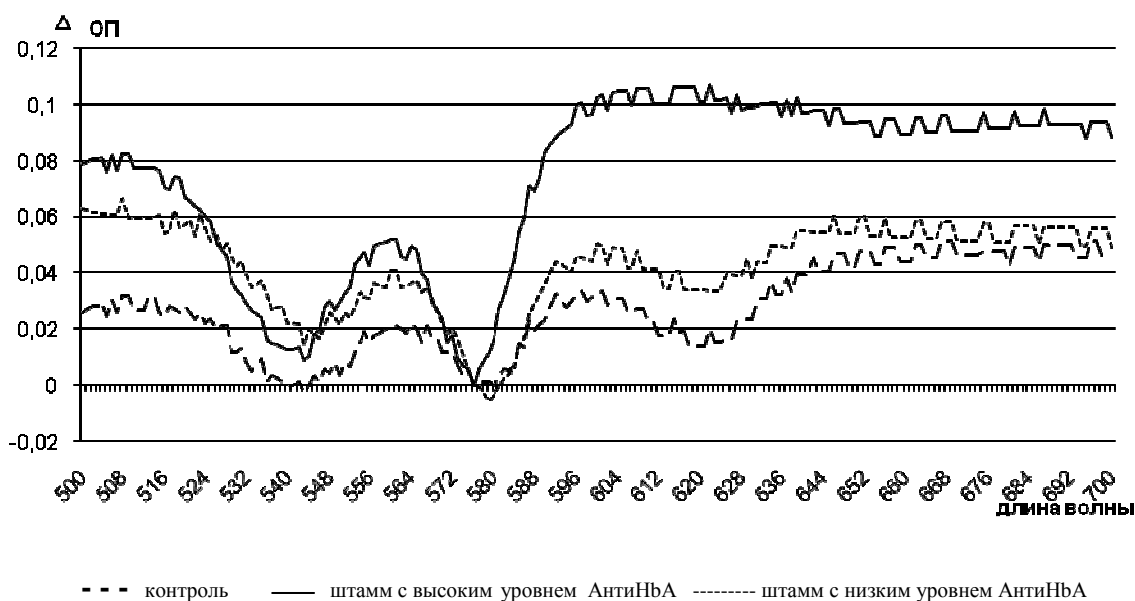


Рисунок 2 - Изменения спектров гемовой части гемоглобина в эритроцитах под действием супернатантов исследуемых штаммов (24 ч инкубации)

При длине волны 619 нм наблюдали максимальные значения оптической плотности спектров проб под действием штаммов с высоким уровнем АнтиНвА, что в 3,1 раза выше, чем спектральные параметры проб под действием штаммов с низким уровнем данного свойства ($0,106 \pm 0,001$ против $0,034 \pm 0,001$ ед. ОП; $p < 0,05$), что указывает на значимое повышение долей метгемоглобина (в 3,3 раза, 13% против 4% соответственно). Спектральные характеристики контрольной пробы показали незначительное повышение оптической плотности полос поглощения света, что при пересчете на долю метгемоглобина составило 2-2,2%.

Обсуждение полученных результатов

Инфекционные процессы, сопровождающиеся транзиторной или постоянной бактериемией, как правило, клинически характеризуются развитием гипохромной анемии.

Однако только в последние годы стало уделяться внимание взаимодействию гемоглобина и бактерий. Как известно, гемоглобин обладает антимикробным действием [2]. С другой стороны, микроорганизмы содержат широкий спектр средств защиты от факторов неспецифической противoinфекционной резистентности, в том числе и антигемоглибиновую активность [2]. Важным моментом во взаимодействии микроорганизмов с эритроцитами является возможность получения гемового железа при внутриклеточном персистировании.

В настоящей работе показано, что продукты жизнедеятельности стафилококков могут вызывать конформационные изменения белковой части гемоглобина, делая для бактерий доступным «порфириновый карман», содержащий собственно гем. Причем стафилококки с высоким уровнем АнтиНбА нарушают белковую структуру гемоглобина в большей степени, чем микроорганизмы с низкими показателями активности. Следующий момент воздействия бактерий на гемоглобин заключается в повышении доли его производного – метгемоглобина, содержащего не двух-, а трехвалентные ионы железа. Неспособность метгемоглобина рыхло и обратимо связывать кислород в конечном итоге может быть одним из факторов развития тканевой гипоксии. При этом штаммы с высоким уровнем АнтиНбА более «успешны», под их действием доля метгемоглобина увеличивается до 13%, тогда как под влиянием стафилококков с низкой АнтиНбА доля метгемоглобина через 6 часов инкубации достигает 10%, а к 24-м часам снижается до 4%. В последнем случае трансформация гемоглобина носит отчасти обратимый характер. В целом полученные результаты раскрывают первые этапы взаимодействия микроорганизмов с эритроцитами человека – нарушение конформационной структуры белковой части гемоглобина, «открытие» порфиринового кармана, переход оксигемоглобина в метгемоглобин. Все это дает возможность бактериям захватывать железо непосредственно из гема и использовать его для собственного бактериального метаболизма. Аналогичные результаты были получены зарубежными авторами при изучении влияния протеазы *Prevotella intermedia* на образование метгемоглобина [8]. В других работах были показаны изменения в молекуле гемоглобина под действием УФ-света, также приводящие к повышению образования метгемоглобина [1; 6].

Таким образом, спектральный анализ структуры гемоглобина под действием микроорганизмов с разным уровнем антигемоглибиновой активности показал, что продукты жизнедеятельности бактерий способны нарушать конформационную структуру белковой части гемоглобина, а также влиять на гем, увеличивая долю метгемоглобина.

Авторы выражают благодарность к.б.н. Икрянниковой С.В. и д.м.н., профессору Красикову С.И. (кафедра медицинской и фармацевтической химии ОрГМА) за помощь в проведении исследований.

Список литературы

1. Артюхов В.Г., Вашанов Г.А., Козлова И.Е. УФ-чувствительность димеров гемоглобина в свободном состоянии и в составе гибридов валентности: модификация серотонином // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2001. - Т. 41, № 2. - С. 190-194.
2. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Ханина Е.А. Взаимодействие бактерий и эритроцитов // Журн. микробиол. - 2005. - № 4. - С. 89-96.
3. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Ханина Е.А. Определение антигемоглобиновой активности микроорганизмов : патент России № 2262705.2005. Бюл. № 19.
4. Икрянникова С.В. Влияние экологических факторов на антиоксидантный статус и спектральные характеристики гемоглобина жителей промышленного города : дис. ... канд. биол. наук. – Оренбург, 2006. - 119 с.
5. Ланг Т.А., Сесик М. Как описывать статистику в медицине. Аннотированное руководство для авторов, редакторов и рецензентов / пер. с англ. под ред. В.П. Леонова. - М. : Практическая медицина, 2011. - 480 с. : ил.
6. Путинцева О.В., Артюхов В.Г., 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.
7. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М.О. Биргер. - М. : Медицина, 1982. - 462 с.
8. Byrne D.P. Role of the cysteine protease interpain A of *Prevotella intermedia* in breakdown and release of hem from hemoglobin // J. Biochemistry. - 2010. - Vol. 425. - P. 257–264.
9. Perutz M.F., Heedner E.J., Zadner J.E. et al. Influence of globin structure on the state of the heme III changes in heme spectra accompanying allosteric transitions in methemoglobin and their implications for heme-heme interaction // J. Biochemistry. - 1974. - Vol. 13. - P. 2187-2200.
10. Pishchany G., Skaar E. P. Taste for Blood: Hemoglobin as a Nutrient Source for Pathogens // PLoS Pathogens. - 2012. – V. 8. - P. 1-4.

Рецензенты:

Карташова О.Л., д.б.н., профессор кафедры микробиологии и заразных болезней ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный аграрный университет», г. Оренбург.

Чайникова И.Н., д.м.н., профессор кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВПО «Оренбургская медицинская академия», г. Оренбург.