

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ГАЛОПЕРИДОЛА

Макеева А.В.¹, Лущик М.В.¹, Болотских В.И.¹

ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко Минздрава России», Воронеж, Россия (394036, Воронеж, ул. Студенческая 10) e-mail:makeeva81@mail.ru.

Проведено исследование влияние галоперидола на структуру и функциональные свойства оксигемоглобина человека. Установлено, что лекарственное вещество оказывает воздействие на кислородтранспортные свойства гемоглобина. Показано, что под влиянием галоперидола повышается сродство гембелка к кислороду, при этом модифицирующее действие нейролептика носит выраженную концентрационную зависимость. Характер изменений величины P_{50} и α позволяет предположить, что при использовании высоких концентраций галоперидола преимущественную роль приобретают конформационные перестройки третичной структуры гембелка. При воздействии галоперидола целостность (тетрамерность) структуры гемоглобина не нарушается, что подтверждается отсутствием разрывов связей между субъединицами гемопротеида. Также в результате проведенных исследований выявлено, что в присутствии галоперидола структурным превращениям подвергается как гемовый, так и глобиновый компонент молекулы оксигемоглобина.

Ключевые слова: оксигемоглобин, галоперидол, кривые диссоциации оксигемоглобина (КДО)

STUDY OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES OF HUMAN HEMOGLOBIN UNDER THE INFLUENCE OF HALOPERIDOL

Makeeva A.V.¹, Lushchik M.V.¹, Bolotskikh V.I.¹

Voronezh State Medical Academy named after N.N. Burdenko the Ministry of health of the Russian Federation (394036, Voronezh, 10 Studencheskaya Street, Russian Federation) e-mail:makeeva81@mail.ru

The study of the effect of haloperidol on the structure and functional properties of oxyhemoglobin person. It is established that the medicinal substance affect colortransparent properties of hemoglobin. It is shown that under the influence of haloperidol increases the affinity Gambella to oxygen, thus modifying effect of neuroleptic is pronounced concentration dependence. The character of changes in the values of P_{50} and α suggests that the use of high concentrations of haloperidol become the predominant role of conformational rearrangement of the tertiary structure hemoglobin. When exposed to haloperidol integrity (tetrameres) structure of hemoglobin is not disturbed, as evidenced by the absence of a disconnection between the subunits of hemoproteins. It is revealed that in the presence of haloperidol structural transformations exposed as hamowy and glubinoy component molecules of oxyhemoglobin.

Keywords: oxyhemoglobin, haloperidol, curves of oxyhemoglobin dissociation (COD)

Гемоглобин – гемопротеид, является основной составной частью эритроцитов и обеспечивает дыхательную функцию крови, осуществляя перенос кислорода от легких к тканям и обратный транспорт углекислого газа от тканей в органы дыхания [1]. Молекула гемоглобина состоит из белка – глобина (96% от массы молекулы) и небелковой простетической группы, называемой гемом (4% от массы молекулы). Гемоглобин – олигомерный белок, состоит из четырех полипептидных цепей, молекулярная масса гембелка составляет 66.800–68.000 Да [2].

В настоящее время актуальными являются исследования, направленные на выявление воздействия разных физико-химических агентов, а также лекарственных средств на структурно-функциональные свойства белков в организме. Лекарственные средства можно рассматривать как своеобразные реагенты, которые, будучи введенными в организм,

способны вызывать изменения в структуре ферментов, клеточных мембран, рецепторов и других биополимеров, составляющих молекулярную основу жизни. Детальное исследование взаимодействия лекарства с белками-ферментами и их надмолекулярными комплексами имеет большое значение для выявления механизмов их лекарственного и побочного действия на биосистемы.

Гемоглобин является удобной моделью для изучения влияния различных агентов на белки, в частности на ферменты, так как простетическую группу данного гемопротеида – гем – можно рассматривать как аналог активного центра. Галоперидол – антипсихотический препарат, применяемый при шизофрении, бредовых расстройствах и других заболеваниях, сопровождающихся галлюцинациями, психомоторным возбуждением. Фармакологический эффект галоперидола связан с блокадой центральных дофаминовых, серотониновых и альфа-адренергических рецепторов в мезокортикальных и лимбических структурах головного мозга. Легкость проникновения лекарства через мембрану определяется липофильностью галоперидола [4]. Так как один из этапов пребывания галоперидола в организме связан с поступлением его в кровь и связыванием с ее белками и форменными элементами, целесообразным представляется исследование влияния данного нейролептика на функционирование гемоглобина.

Целью исследования явилось изучение структурно-функциональных изменений гемоглобина, индуцированных воздействием галоперидола.

Материалы и методы

В опытах использовали растворы оксигемоглобина (HbO_2) в 0,1 моль/л натрий-фосфатном буфере ($\text{pH} = 7,4$), полученные из крови взрослых доноров, и растворы галоперидола в натрий-фосфатном буфере ($\text{pH} 7,4$) с концентрациями модификатора 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} моль/л соответственно. Буферные растворы HbO_2 имели концентрацию 1×10^{-4} моль/л. Для получения растворов оксигемоглобина использовали метод Драбкина с модификацией Блюменфельда [3]. Регистрацию кривых диссоциации оксигемоглобина (КДО) осуществляли спектрофотометрическим методом при $\lambda = 430$ Нм (полоса Соре дезоксиформы). В качестве образца сравнения использовали светорассеивающую пластину, что позволило исключить вклад рассеяния света суспензией [2]. Образцы хранили в холодильнике при $t +4^{\circ}\text{C}$ не более 2 ч. Регистрацию спектров поглощения нативного и модифицированного галоперидолом гемоглобина проводили спектрофотометрически на СФ-26. Определение молекулярной массы проводили с помощью метода гель фелитрации на сефадексе G-100 [5].

Полученные результаты и их обсуждение

Регистрация КДО – метод, позволяющий получить ценную информацию о структурно-функциональном состоянии гемоглобина. Поэтому данный метод нашел широкое применение в различных областях биологии и медицины. КДО показывает зависимость насыщения гемоглобина O_2 от парциального напряжения O_2 . Важными показателями, характеризующими процесс обратимого связывания кислорода гемоглобином, являются значения P_{50} , т.е. парциальное давление кислорода, при котором гемоглобин насыщен им на 50%, и константа Хилла (α), отражающая степень гем-гемового взаимодействия субъединиц в олигомере [2].

Нами были зарегистрированы КДО оксигемоглобина, модифицированного галоперидолом при соотношении молекул 1:1.

Анализ данных, представленных на рисунке 1, показывает, что добавление галоперидола в указанных концентрациях повышает сродство гембелка к кислороду, при этом модифицирующее действие нейролептика носит выраженную концентрационную зависимость. Минимальная из использованных концентраций галоперидола индуцирует снижение значения P_{50} с $22,8 \pm 1,04$ до $17,5 \pm 0,51$ мм рт. столба. Последующее увеличение концентрации до 1×10^{-5} и 1×10^{-4} моль/л приводит к дальнейшему повышению сродства гембелка к кислороду (P_{50} составляет $13,1 \pm 1,3$ и $12,6 \pm 2,5$ мм рт. столба соответственно). Вероятно, под воздействием данного лекарственного вещества усиливается способность кислорода связываться с железом гема.

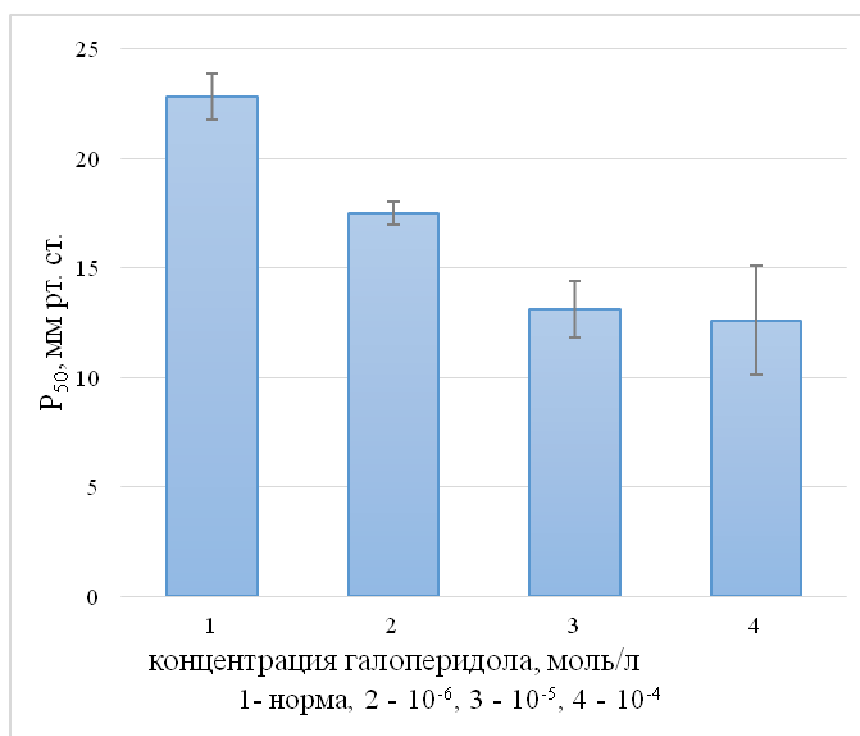


Рис.1. Изменение значений P_{50} при действии галоперидола

Модификация HbO_2 галоперидолом находит отражение и в уровне кооперативного взаимодействия субъединиц в составе тетрамера. Зависимость значения константы Хилла от концентрации нейролептика носит сложный характер (рис. 2).

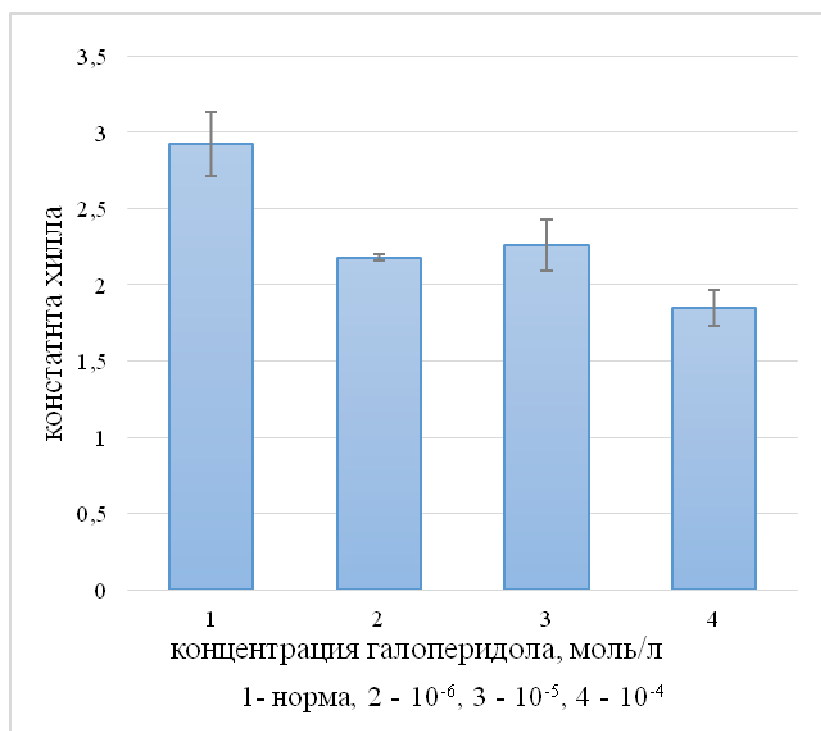


Рис. 2. Изменение значений константы Хилла α при действии галоперидола

При использовании галоперидола в концентрации 1×10^{-6} моль/л величина α снижается с $2,92 \pm 0,21$ (контроль) до $2,18 \pm 0,02$. Последующее увеличение концентрации модификатора до 1×10^{-5} моль/л не вызывает статистически достоверных изменений α , которое составляет $2,26 \pm 0,17$. В случае использования максимальной из использованных концентраций галоперидола наблюдается существенное снижение константы Хилла α до $1,85 \pm 0,12$. Понижение величины α свидетельствует об ослаблении кооперативного эффекта, что может быть объяснено структурными нарушениями в области контакта субъединиц.

С целью получения информации о структурном состоянии гемоглобина ($C = 1 \times 10^{-4}$ моль/л), модифицированного галоперидолом ($C = 1 \times 10^{-6}$, 1×10^{-5} , 1×10^{-4} моль/л), использовали метод гель-хроматографии, который является одним из современных хроматографических методов выделения, очистки и анализа биологических макромолекул. Результаты экспериментов показали, что модифицированный белок выходит из гель-фильтрационной колонки, упакованной сефадексом G-100 и уравновешенной 0,1 моль/л натрий-фосфатным буфером, pH 7,4, одной фракцией с молекулярной массой 66.000 ± 1000 Да.

Полученные данные свидетельствуют о сохранении целостности (тетрамерности) молекул гемоглобина, модифицированного лекарственным веществом, т.е. разрыва связей между субъединицами гемопротеида и образования низкомолекулярных форм не происходит.

Полученные данные показывают, что галоперидол оказывает воздействие на гемоглобин, что находит отражение в изменении основных макрохарактеристик его кислородсвязывающей способности. При этом выявленные нарушения функциональной активности гембелка при действии галоперидола обусловлены, по-видимому, конформационными перестройками апобелковой части молекулы, затрагивающей, вероятно, области субъединичных контактов.

С целью выявления молекулярных механизмов взаимодействия нейролептика с гемоглобином методом абсорбционной спектрофотометрии нами были исследованы спектральные свойства растворов оксигемоглобина, модифицированных галоперидолом в объемном соотношении 1: 1.

Спектр контрольного раствора оксигемоглобина характеризуется в видимой области тремя полосами поглощения, очень интенсивной при $\lambda = 412$ Нм (полоса Core) и менее интенсивными длинноволновыми полосами при $\lambda = 542$ и $\lambda = 576$ Нм. В УФ-области спектра регистрируются две отчетливые полосы при $\lambda = 278$ Нм и $\lambda = 342$ Нм. При анализе спектров поглощения в УФ и видимой области было отмечено, что галоперидол во всех выбранных концентрациях индуцирует снижение оптической плотности, т.е. интенсивность всех полос поглощения гемопротеида, однако смещения полос не происходит, так как $\lambda_{\max}$ не изменяется. При концентрации лекарства 1×10^{-4} моль/л снижение оптической плотности было более выражено для всех полос поглощения (таблица).

Значения величины оптической плотности (D) основных полос поглощения растворов

оксигемоглобина, модифицированного галоперидолом

в концентрациях 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} моль/л.

	D ₂₇₈ Нм	D ₃₄₂ Нм	D ₄₁₂ Нм	D ₅₄₂ Нм	D ₅₇₆ Нм
Нативный раствор HbO ₂	0,73±0,02	0,54±0,03	2,28±0,30	0,28±0,02	0,29±0,02
HbO ₂ + галоперидол (C = 1×10^{-6} моль/л)	0,61±0,03*	0,45±0,02*	1,90 ±0,20	0,25±0,03	0,27±0,03
HbO ₂ + галоперидол (C = 1×10^{-5} моль/л)	0,55±0,03*	0,41±0,03*	1,74±0,30	0,20±0,02*	0,25±0,02
HbO ₂ + галоперидол (C = 1×10^{-4} моль/л)	0,49±0,02*	0,39±0,02*	1,65±0,20*	0,18±0,01*	0,21±0,02*

Примечание: * — отличие от нормы достоверно (уровень значимости $P < 0,05$)

Регистрируемое снижение величины D при $\lambda = 278$ Нм указывает на уменьшение интенсивности глобиновой полосы поглощения, что может быть обусловлено возможным взаимодействием ароматических участков молекулы нейролептика с хромофорами белка. Результатом взаимодействия может быть частичное экранирование аминокислотных остатков тирозина, триптофана и фенилаланина, а также возможное перераспределение электронной плотности между взаимодействующими компонентами. Также было установлено, что действие галоперидола в использованных концентрациях не индуцирует образования метгемоглобина, так как характерных для метгемоглобина максимумов при $\lambda = 405$ Нм и $\lambda = 630$ Нм не зарегистрировано. Таким образом, галоперидол оказывает на молекулу гемоглобина модифицирующее действие, вызывая конформационные изменения в гембелке. Степень модификации гемоглобина зависит от концентрации лекарственного вещества.

Спад интенсивности поглощения полос указывает на то, что в присутствие галоперидола структурным превращениям подвергается как гемовый, так и глобиновой компонент молекулы оксигемоглобина.

Выводы

В заключение можно сделать вывод, что наблюдаемый сдвиг КДО влево при воздействии лекарственного препарата свидетельствует о повышении сродства гемоглобина к кислороду и затруднению отдачи кислорода тканям. Характер изменений величины P_{50} и α позволяет предположить, что при использовании высоких концентраций галоперидола преимущественную роль приобретают конформационные перестройки третичной структуры гембелка. Также установлено, что под воздействием галоперидола не происходит разрыва связей внутри молекулы гембелка.

Список литературы

1. Артюхов В.Г. Гемопротеиды: закономерности фотохимических превращений в условиях различного микроокружения / В.Г. Артюхов. – Изд-во ВГУ, 1995. – 281 с.
2. Вашанов Г.А. Анализ структурно-функционального состояния некоторых транспортных белков крови в условиях различного микроокружения: Дисс. канд. биол. наук. – Воронеж, 1993. – 157 с.
3. Козлов А.А. Пособие для врачей-лаборантов по методу определения гемоглобина / А.А. Козлов, Т.М. Простакова, А.Л. Берковский. – М., 2008. — С. 8.

4. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. / М.Д. Машковский. – М.: Новая Волна, 2002. – Т. 1. – С. 67
5. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1985. – 536 с.

Рецензенты:

Яковлев А.Н., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ВГМА им. Н.Н. Бурденко, г. Воронеж;

Звягин А.А., д.м.н., профессор кафедры пропедевтики детских болезней и педиатрии ВГМА им. Н.Н. Бурденко, детская клиническая больница ВГМА им. Бурденко, г. Воронеж.