

О. Львова, студ., О. Кошова, асп.,
С. Верьовка, д-р біол. наук

ВПЛИВ ДЕНАТУРАЦІЙНИХ ЧИННИКІВ НА ПРОЦЕСИ ГЛІКАЦІЇ ГЕМОГЛОБІНУ ЛЮДИНИ

Наведено дані дослідів, які вказують на вплив групи речовин-денатурантів на процес неферментативного глікозилювання гемоглобіну людини.

Presents data show of research influence of substances-denaturants on the process of non-enzymatic glycosylation of human hemoglobin.

Вступ. Перебіг життєвих процесів залежить від взаємодії біомакромолекул. Одним із важливих типів подібного виду взаємодій є формування та розщеплення ковалентних зв'язків між окремими молекулами, що можуть належати до різного типу молекулярних сполук. Зокрема, важливу роль у формуванні та підтримці структури білків, виконанні ними їх фізіологічних функцій відіграє глікозилювання – утворення молекул, які містять як білкову, так і вуглеводну складові частини, глікопротеїнів. У нормі значна кількість білків глікозилювана. В основному глікозилювання відбувається за участю ферментів при дозріванні білка на рівні апарату Гольджі. Проте до 30 % поверхні білка (наприклад, у випадку альбуміну) може бути глікозильовано за неферментативним механізмом протягом часу існування білкової молекули [1, 2]. Під час багатьох патологічних процесів таке неферментативне глікозилювання (глікація) є фізіологічно необґрунтованим і призводить до ушкодження білків та розвитку небажаних ускладнень – атеросклеротичних змін у судинах, розвитку катаракти, глухоти. Найбільш епідеміологічно значущим прикладом подібного роду патологічних процесів є цукровий діабет [3]. Вважається, що збільшення ступеня неферментативного глікозилювання білків зумовлене характерним для цього захворювання підвищенням концентрації глюкози в крові. Однак дослідження останніх років свідчать про притаманні діабету істотні порушення у функціонуванні структуроутворювальних (фолдингових) систем і значну функціональну роль цих порушень у перебігу патофізіологічного процесу [4, 5]. Тому важливо зрозуміти, якою мірою ушкодження чи формування недовіршеної структури білка може впливати на рівень його глікації, тобто наскільки вагомим чинником є збереження нативної конформації білка [6]. Рівень глікації гемоглобіну людини є важливим діагностичним показником [4, 7]. Тому саме цей білок було вибрано для дослідження впливу групи речовин-денатурантів на процес глікації за стандартної, відповідної нормальному стану, концентрації глюкози (5 мМ). Мета роботи полягала у визначенні залежності ступеня глікації білка від ступеня збереження його нативної структури.

1. Матеріали та методи. *Матеріали:* У роботі було використано: гемоглобін А людини виробництва "Merck" (США); D-глюкоза та Тритон X-100 виробництва "Sigma" (США); хлорид натрію, фосфат натрію, додецилсульфат натрію, тіобарбітурову, трихлороцтову та щавелеву кислоти, солі двовалентних металів ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) – вітчиз-

няного виробництва, кваліфікації не нижче "ЧДА". Як речовини-денатуранти було обрано такі сполуки: Хлорид натрію (NaCl), Тритон X-100 (тетраоктилфеноловий ефір полі етиленгліколю), додецилсульфат натрію, солі двовалентних металів. Денатураційну дію іонів цинку ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), нікелю ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), кадмію ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) і кобальту ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) визначали за 1 мМ концентрації відповідних солей.

Методи дослідження: Глікозилювання гемоглобіну А людини проводили за методикою, представленою в роботі [8]. При дослідженні впливу денатуруючих чинників концентрація глюкози становила 5 мМ, що відповідає нормі в крові здорових людей. Концентрацію хлориду натрію варіювали в межах від 0 до 1,5 М, концентрація детергентів – у діапазоні від 0 до 0,005 %, солей двовалентних металів – 0 до 1,5 мМ. Визначення рівня глікації проводили згідно зі стандартною методикою, представленою в роботі [9], з реєстрацією утвореного забарвленого похідного з довжиною хвилі 443 нм.

Кожний із наведених показників являє медіану даних з чотирьох дослідів. Одержані дані відзначались високою відтворюваністю ($P < 0,01$).

2. Результати та обговорення. Будь-який процес, у якому беруть участь білкові молекули, значною мірою залежить від двох чинників – концентрації задіяних реагентів і конфірмаційного стану білка. Як впливає з даних, наведених на рис. 1, зростання концентрації глюкози призводить до збільшення рівня глікації гемоглобіну. Такий результат є очікуваним і добре узгоджується з даними дослідження впливу концентрації глюкози на неферментативне глікозилювання альбуміну [10, 11]. Водночас варто зазначити, що за таких концентрацій глюкози може зумовлювати істотну денатурацію білкових молекул. Можна припустити прогресуючий, щонайменше двостадійний, характер перебігу процесу глікації *in vitro*: первинне, залежне від концентрації глюкози, і вторинне, зумовлене порушенням стабілізованої структури білка. Однак можливість реалізації подібного механізму за умов *in vivo* видається сумнівною, оскільки денатуровані білки швидко вилучаються з кровообігу. Тому більш обґрунтованим видається пояснення підвищеного неферментативного глікозилювання наслідками порушення процесу нормального структуроутворення білкових молекул. Визнано за доцільне дослідити залежність рівня глікації гемоглобіну за умов більшої чи меншої його денатурації.

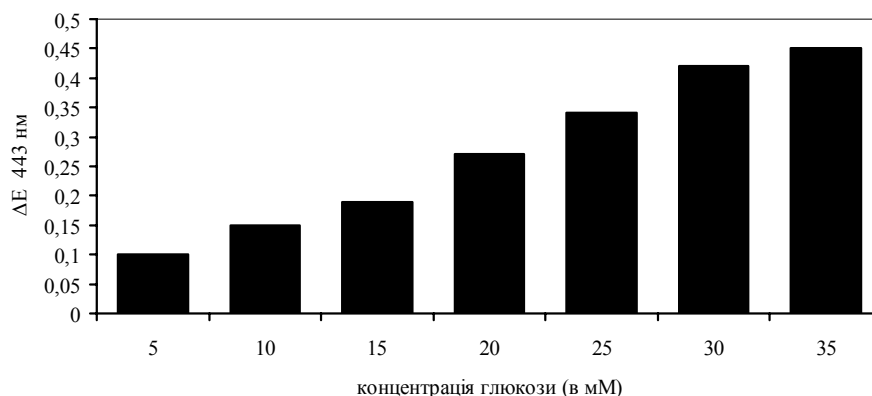


Рис. 1. Гістограма залежності ступеня неферментативного глікозилювання гемоглобіну від концентрації глюкози

Як впливає з даних, наведених на рис. 2, зростання іонної сили також сприяє глікації гемоглобіну, тобто за стандартної концентрації глюкози порушення конфо-

рмації білка приводить до зростання кількості поверхневих груп, придатних до реакції з альдегідними групами молекул вуглеводів.

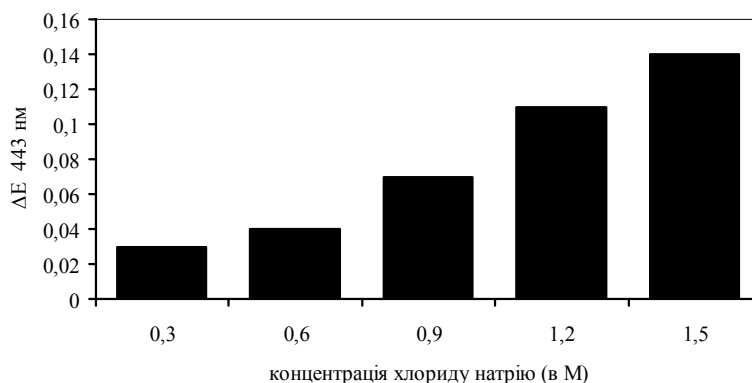
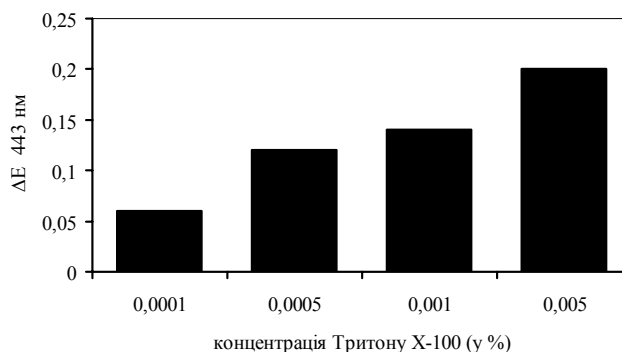
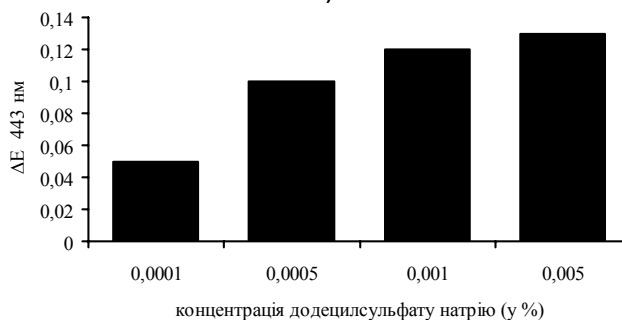


Рис. 2. Гістограма залежності ступеня неферментативного глікозилювання гемоглобіну людини від концентрації хлориду натрію

Зростанню ступеня глікації гемоглобіну сприяли неіоногенний та іоногенний детергенти – Тритон X-100 і додецилсульфат натрію (рис. 3 А і Б).



А)



Б)

Рис. 3. Гістограма залежності ступеня неферментативного глікозилювання гемоглобіну людини від концентрації Тритону X-100 (А) і додецилсульфату натрію (Б)

Згідно з контрольними дослідженнями за відсутності в середовищі глюкози досліджувані детергенти змін у поглинанні відповідних зразків не спричиняли.

На відміну від досліджуваних детергентів, вплив іонів двовалентних металів на конформацію білка опосередкований їх більшою чи меншою здатністю до інкорпорації у структуру білка, що зумовлює більшу чи меншу денатурацію. Для порівняння цих ефектів обрано 1 mM концентрацію кожного з досліджуваних іонів. Подібний вибір обумовлено відомими літературними даними про їх спроможність до інактивації процесів міжбілкового комплексоутворення [12]. Як випливає з даних, наведених у табл. 1, природа застосованих іонів спричиняє значний вплив на зростання ступеня глікації гемоглобіну. Якщо іони цинку за даної концентрації мало впливали на ступінь глікації, то вплив іонів нікелю, кобальту та кадмію був більш значущим. Варто зазначити, що ці дані добре корелюють з раніше описаною денатураційною дією цих іонів щодо інших білків [12].

Таблиця 1. Оптична густина препаратів гемоглобіну людини, глікованих за наявності 5 mM глюкози та 1 mM іонів двовалентних металів (контроль – препарат, аналогічно глікований за наявності іонів металу)

Іони металів	E^{443}
Zn ²⁺	0,040
Ni ²⁺	0,140
Cd ²⁺	0,120
Co ²⁺	0,145

Узагальнюючи наведені дані, можна зробити висновок про значний вплив збереження нативної конформації білка на його схильність до процесів неферментативного глікозильовання. Тобто порушення процесів нормального структуроутворення білків за умов *in vivo* мо-

же бути вагомим чинником утворення надмірно глікованих форм, що, в свою чергу, може зумовлювати тяжкі функціональні наслідки. З іншого боку видається за доцільне подальше дослідження впливу денатураційних чинників на процес глікації білка за умов *in vitro* та *in vivo* як можливого важливого діагностичного показника.

Роботу виконано в лабораторії біохімії ДУ "Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка АМН України".

1. Kim H.J., Hwang N.R., Lee K.J. Heat shock responses for understanding diseases of protein denaturation // *Molecular Cells*. – 2007. – Vol. 23, № 2. – P. 123–131.
2. Tahara Y., Shima K. Kinetics of HbA1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level // *Diabetes Care*. – 1995. – V. 18, № 4. – P. 440 – 447.
3. Luthra M., Balasubramanian D. Nonenzymatic glycation alters protein structure and stability // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268. – P. 18119–18127.
4. Марченко Н.Ю., Гарбузинский С.А., Семисотнов Г.В. Молекулярные шапероны в норме и при патологии // Молекулярная патология белка / Под ред. Д.И. Заболотного – К.: "Логос", 2008. – С. 9–31.
5. Takeuchi M., Yamagishi S. TAGE (toxic AGEs) hypothesis in various chronic diseases // *Medical Hypotheses*. – 2004. – V. 63, № 3 – P. 449 – 452.
6. Вельков В.В. Гликозилированный гемоглобин в диагностике сахарного диабета и в оценке риска его осложнений // Лабораторная диагностика. – 2008, № 44. – С. 65–76.
7. Белицер В.А. Макроструктура и денатурационные превращения белков // *Укр. биохим. журн.* – 1962, № 2. – С. 290–320.
8. DeGroot J. The AGE of the matrix: chemistry, consequence and cure // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2004. – Vol. 4, № 3 – P. 301–305.
9. Olivieri J.R., Craievich A.F. The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle X-ray scattering // *European Biophysical Journal*. – 1995. – Vol. 24. – P. 77–84.
10. Monnier L., Lapinski H., Colette C. Contributions of fasting and postprandial plasma glucose increments to overall diurnal hyperglycemia of type 2 diabetic patients: variations with increasing levels of HbA1c // *Diabetes Care*. – 2003. – Vol. 26, № 3. – P. 881–885.
11. Али Хан М.В., Рашид З., Али Хан В., Али Р. Биохимический, биофизический и термодинамический анализ сывороточного альбумина человека, гликозилированного *in vivo* // *Биохимия*. – 2007. – С. 175–183.
12. Соколовская Л.И., Сломинский А.Ю., Волков Г.Л. Индукция каталитической активности плазминогена моноклональным антителом IV-1c в присутствии двухвалентных катионов металлов и α_2 -антиплазмина // *Биохимия*. – 2006. – 71, №6. – С. 778 – 785.

Надійшла до редколегії 11.05.09