

Л. А. БЛЮМЕНФЕЛЬД

ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА И МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ ОБРАТИМОГО ПРИСОЕДИНЕНИЯ КИСЛОРОДА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 11 VI 1952)

Проблема химического строения гемоглобина и обратимого присоединения кислорода к нему была предметом многочисленных экспериментальных и теоретических исследований. Как известно, кислород присоединяется к атому железа гема, который, однако, в свободном состоянии, без глобина, кислорода не присоединяет, а необратимо окисляется им до гемина (ферригема). Основной вопрос, нерешенный до настоящего времени, можно сформулировать так: каким образом белок глобин и только глобин обеспечивает обратимое присоединение кислорода к гему? Для решения этого вопроса необходимо выяснить природу связи кислорода с гемом и гема с глобином. Следует отметить, что решение этой проблемы может послужить этапом в решении более общего вопроса о специфичности гемопротеиновых ферментов.

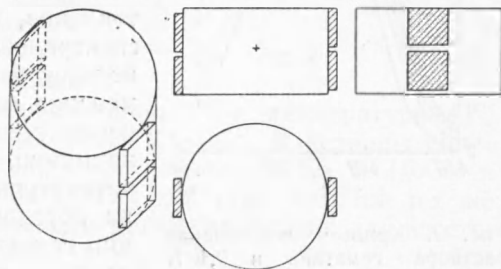
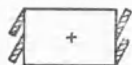


Рис. 1. Схема относительного расположения протетических групп в молекуле гемоглобина и оксигемоглобина. + — ось симметрии второго порядка, перпендикулярная плоскости рисунка

Рассмотрение данных рентгеноструктурного анализа кристаллических гемоглобина (метгемоглобина), гемоглобина и оксигемоглобина (¹, ²) и результатов исследования плеохроизма кристаллов (³) позволяет прийти к выводу, о том, что в оксигемоглобине и в гемоглобине 4 гема расположены попарно, и их плоскости являются касательными к боковой поверхности цилиндрической молекулы нативного глобина ($M = 68000$). Плоскости всех гемов параллельны друг к другу, и молекула обладает одной осью симметрии второго порядка (см. рис. 1). В гемоглобине плоскости гемов также параллельны друг к другу, но расположены под углом к боковой поверхности цилиндра глобина. Схематически это можно представить себе так:



Таким образом, присоединение кислорода сопровождается приближением плоскости гема к поверхности глобина.

Гем представляет собой комплекс закисного железа с протопорфирином IX. В 0,1% растворе карбоната натрия порфирины, содержащие карбоксильные группы, склонны к агрегации, которая сопровождается сильным изменением спектра поглощения, в частности, понижением интенсивности полосы Сорэ ($\lambda_{\max} \approx 400 \text{ м}\mu$). На основании данных о за-

висимости степени агрегации от pH среды (4) можно заключить, что агрегация идет через ионизированные карбоксильные группы порфирина. Поэтому дезагрегаторами являются вещества типа этанола и азотистых оснований, которые блокируют карбоксильные группы. Такое же влияние на растворы порфиринов оказывают белки, в частности глобин. При этом одна молекула нативного глобина может присоединить 4 молекулы протопорфирина (столько же, сколько и гема), и порфирин может конкурировать с гематином за белок. Очевидно, связи между протопорфирином и глобином осуществляются между карбоксильными группами

порфирина и основными (NH_2 , NH) группами белка.

Литературные данные по спектрам поглощения и магнитным свойствам гема, гемина и гематина (гидроксиферригема) характеризуются огромным разбросом результатов различных авторов. Для выяснения причин этого обстоятельства мы провели исследование спектров поглощения различных препаратов гемина (кристаллического и аморфного) и их зависимости от времени после приготовления. Мы показали, что, исследуя один и тот же раствор гематина через определенные промежутки времени после его приготовления, можно получить практически все спектральные характеристики, которые приводятся различными авторами. При этом изменения спектров свидетельствуют об увеличении степени агрегации во времени (см., например, рис. 2). Очевидно, несовпадение литературных спектральных кривых гематина обусловлено различной степенью агрегации гематина в растворах, с которыми работали различные исследователи. Мы установили, что дезагрегирующее действие оказывает повышение концентрации щелочи и добавление веществ типа этанола, блокирующих карбоксильные группы. Этим способом удалось получить стабильные спектры мономерных растворов гематина, гемина и гема. При этом оказалось, что спектральная характеристика и магнитный момент гема идентичны соответствующим свойствам гемоглобина. Соответствующие характеристики гемина и гемиглобина также совпадают.

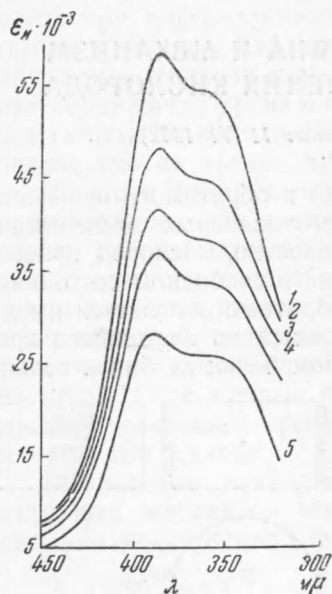


Рис. 2. Кривые поглощения раствора гематина в 0,1 N NaOH от 300 до 450 мμ. 1 — свежеприготовленный раствор; 2 — через 10 дней; 3 — через 20 дней; 4 — через 30 дней; 5 — через 60 дней

Исследования электронной структуры гема, гемина, гематина и их производных* показали, что принятые в настоящее время взгляды Паулинга об ионном характере связей железа в этих соединениях неверны. Железо с азотами пиррольных колец образует ковалентные связи донорно-акцепторного типа с участием 4d-электронных ячеек атома железа. В железопорфириновых комплексах закисное железо может иметь координационные числа 4 и 6, а окисное железо — 4, 5 и 6. При этом переход к координационным числам 6 должен сопровождаться изменением всей электронной структуры и потерей парамагнетизма.

Для выяснения природы связей между гемом и глобином многое дало исследование реакции трансгемирования (6-8). Мы изучили зависимость скорости реакции трансгемирования от pH среды и показали, что для pH от 5 до 6,4 скорость реакции постоянна, затем быстро уменьшается, а после pH 8,5 снова постоянна. На рис. 3 представлена зависимость

* При этом мы пользовались данными по направлениям и максимальным значениям гибридных функций, приведенными в работе М. Г. Ширмазан (5).

константы скорости реакции отщепления гема от глобина k_1 (8) от рН среды. Падение скорости реакции трансгемирования в интервале рН 6,4—8,5 свидетельствует о наличии одной или нескольких кислотных групп, активных в этом интервале рН, константы диссоциации которых (или которой) меняются при отщеплении гема от глобина. Сравнивая кривую на рис. 3 с данными по влиянию рН на кривую диссоциации оксигемоглобина (9) (так называемый «эффект Бора») и на скорость отщепления кислорода (10), можно прийти к выводу об идентичности явлений в обоих случаях. Скорость реакции трансгемирования падает по мере увеличения сродства гемоглобина к кислороду. Очевидно, при отщеплении кислорода происходит одновременный отрыв гема от «связанных с оксигемацией» кислотных групп глобина (по всей вероятности, имидазола гистидина). Отщепление гема от глобина облегчается или вообще становится возможным при диссоциации кислорода от оксигемоглобина. Если эти представления правильны, то для карбоксигемоглобина, в связи с большим сродством гемоглобина к СО, скорость реакции трансгемирования должна быть значительно меньше, чем для оксигемоглобина. С другой стороны, в восстановленном гемоглобине, где нет связи гема с кислородом, должен быть облегчен отрыв гема от глобина, и реакция трансгемирования должна идти быстрее. Наши

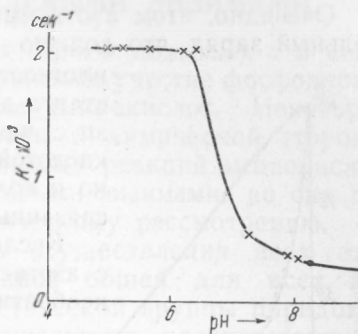
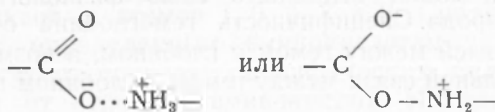


Рис. 3

исследования подтвердили эти предположения. При температуре 41°, рН 5,48 и начальной концентрации пигментов $2,5 \cdot 10^{-6}$ М периоды полупревращения для реакции трансгемирования между HbO_2 и HbCO и желатиной равны, соответственно, 380 и 1720 сек. (рис. 4). При тех же условиях период полупревращения реакции трансгемирования для восстановленного гемоглобина равен 130 сек.

Проведенные нами исследования медленной реакции окисления гемоглобина кислородом воздуха (с образованием гемиглобина) и распада оксигемоглобина, гемиглобина и глобингемихрома при низких значениях рН (≤ 5) и при высоких значениях рН ($\geq 8,5-9$) показали: 1) относительная вероятность окисления при реакции $\text{Hb} + \text{O}_2$ увеличивается при уменьшении вероятности оксигемации (присоединения O_2) в результате «гем — гем-взаимодействия»*; 2) главными связями гема с глобином в гемоглобине и его производных являются связи типа

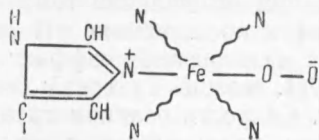


между карбоксильными группами гема и основными группами белка.

Идентичность спектральных и магнитных характеристик гема и гемина, с одной стороны, и гемоглобина и гемиглобина, с другой, свидетельствуют о том, что в этих соединениях нет связей гема с белком через железо. Все приведенные в настоящей статье данные позволяют прийти к выводу о том, что при присоединении кислорода (СО и т. п.) одновременно со связью между кислородом и железом образуется связь между железом гема и азотистой группой белка. Этой азотистой группой является, по всей вероятности, имидазол гистидина. Таким образом,

* Явлением «гем — гем-взаимодействия» мы называем облегчение присоединения кислорода к гему после того, как соседний гем уже присоединил кислород. С точки зрения развиваемых в настоящей статье представлений это является чисто стерическим эффектом.

кроме уже отмеченных выше главных связей между гемом и глобином, в оксигемоглобине появляется еще одна дополнительная связь. Это можно представить схемой I*.



I

Очевидно, атом азота имидазола приобретает избыточный положительный заряд, что должно сопровождаться уменьшением электронной плотности у атома Н группы NH имидазола. Константа диссоциации этой группы повышается, в связи с чем оксигемоглобин является более сильной кислотой, чем гемоглобин. Это позволяет качественно и количественно объяснить эффект Бора и все связанные с ним явления.

Кислород может присоединиться к гему только с азотистым основанием. В противном случае гем необратимо окисляется. Для соединений гема с простыми азотистыми основаниями типа пиридина, с денатурированным глобином и с другими белками вероятность одновременного образования этих двух связей (железа с кислородом и железа с азотистым основанием) очень мала, и реакция

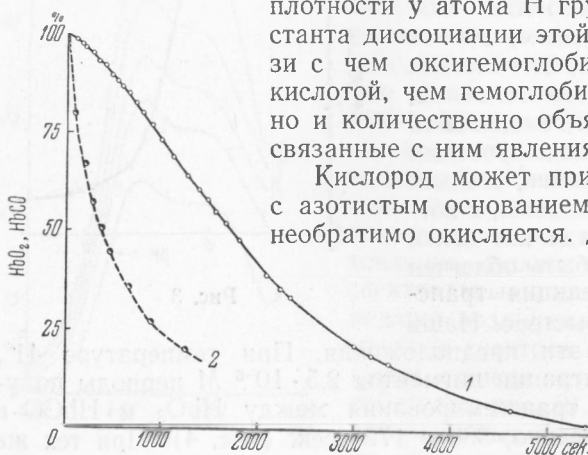


Рис. 4. Кинетика реакции трансгемирования для HbCO (1) и HbO_2 (2)

практически полностью идет по пути окисления. Для гемоглобина вероятность этого процесса велика из-за особой структуры глобина и соответствующего расположения уже связанных через карбоксильные группы гемов. Именно это количественное различие (большая относительная вероятность присоединения кислорода по сравнению с вероятностью окисления) и придает гемоглобину новое специфическое качество, лишь благодаря которому он может выполнять свою физиологическую функцию переносчика кислорода. Специфичность гемоглобина обусловлена не наличием особых связей между гемом и глобином, а возможностью образования новой лабильной связи между гемом и глобином при присоединении кислорода.

Центральный институт усовершенствования врачей
Министерства здравоохранения СССР

Поступило
6 VI 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Haemoglobin, London, 1949. ² M. Perutz, Proc. Roy. Soc., A 191, 83 (1947); A 195, 474 (1949). ³ F. Naurowitz, Zs. physiol. Chem., 254, 266 (1938). ⁴ H. Holde n, Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 15, 409 (1937). ⁵ М. Г. Ширмазан, Направление и максимальные значения гибридных функций, Диссертация, М., 1950. ⁶ А. М. Чарный, Л. А. Блюменфельд, ДАН, 73, 1001 (1950). ⁷ Л. А. Блюменфельд, А. М. Чарный, ДАН, 75, 873, (1950). ⁸ Л. А. Блюменфельд, ДАН, 78, 539 (1951). ⁹ J. Wuman, Advances in Protein Chemistry, 4, 407 (1948). ¹⁰ J. Mullikan, J. Physiol., 79, 158 (1933).

* Связи, обозначенные волнистыми линиями, лежат в плоскости, перпендикулярной плоскости чертежа. Шесть связей железа направлены к углам октаэдра.