

УДК 547.963.4

## ОКИСЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА

*Мышкин А. Е.*

Обобщены литературные сведения об окислении гемоглобина человека и других позвоночных в виде комплексов с лигандами и в свободном состоянии. Подчеркнута связь конформационных изменений оксигемоглобина со скоростью его автоокисления, а также роль химических факторов, влияющих на конформацию белка, активный центр и скорость окисления гемоглобина.

Библиография — 122 ссылки.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение . . . . .	1045
II. О связи гемового железа с кислородом . . . . .	1046
III. Автоокисление оксигемоглобина . . . . .	1047
IV. Окисление гемоглобина реагентами . . . . .	1062
V. Окисление гемоглобина под действием облучения . . . . .	1068

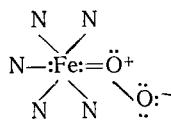
## I. ВВЕДЕНИЕ

Ежедневно в крови взрослого человека окисляется приблизительно 3% циркулирующего гемоглобина (Hb) [1]. Находящиеся в эритроците редуктазные системы восстанавливают большую часть окислившегося гемоглобина. Однако при этом в крови постоянно содержится 1–2% окисленной формы — метгемоглобина ( $\text{Hb}^+$ ) в расчете на общее количество неокисленной и окисленной форм. Небольшое количество метгемоглобина в крови играет определенную физиологическую роль: метгемоглобин, в частности, активно связывает некоторые анионы ( $\text{CN}^-$ ,  $\text{OCN}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{N}_3^-$  и т. п.), имеющие высокое сродство к железу (III) и способные, связываясь с железом цитохромов, блокировать дыхательную цепь митохондрий [2, 3]. Повышение концентрации метгемоглобина сверх 1–2% приводит к снижению кислород-транспортной функции крови. Подобное состояние, называемое в клинике метгемоглобинемией, относится к числу опасных патологий и при достаточно резкой выраженности требует лечения. Причины метгемоглобинемии могут быть разными: наследственное нарушение первичной структуры глобина, нарушение функционирования метгемоглобинредуктазных систем в эритроцитах и попадание в эритроциты веществ-метгемоглобинобразователей эндогенного или экзогенного происхождения. Во всех этих случаях в крови накапливается бесполезно циркулирующий метгемоглобин. Понимание механизма окисления гемоглобина, точнее окисления гемового железа гемоглобина, и условий, способствующих или препятствующих этому процессу, в конечном итоге помогает медикам изыскивать пути предотвращения или ослабления метгемоглобинемии. Цель настоящего обзора — обобщить имеющуюся литературу, касающуюся различных путей окисления гемоглобина с упором на чисто химическую сторону этого процесса. Преимущество при обсуждении материала отдается оксигемоглобину человека (если не указано происхождение гемоглобина, то следует подразумевать гемоглобин человека). Однако при наличии интересных данных, имеющих важное химическое значение, рассматриваются и гемоглобины других видов позвоночных. Уделено в ряде случаев внимание и дезоксигемоглобину (иными словами, окислению в анаэробных условиях), а также другим лигандным производным гемоглобина. Одноцепочечный гемопротеин миоглобин ( $\text{Mb}$ ) — мышечный аккумулятор кислорода, имеющий много общих свойств с гемоглобином, также фигурирует в некоторых случаях в настоящем обзоре. Оставлены вне рассмотрения аномальные гемоглобины, поскольку их разнооб-

разие и в ряде случаев необычность свойств требуют их рассмотрения в специальном обзоре. Не приведены также основные представления о строении и функциях гемоглобина, поскольку этот материал много-кратно освещался в различных обзорах, монографиях и учебниках. Достаточно полный материал по этим вопросам на русском языке можно найти, в частности, в обзоре [4].

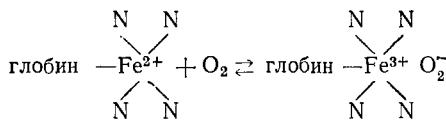
## II. О СВЯЗИ ГЕМОВОГО ЖЕЛЕЗА С КИСЛОРОДОМ

Оксигемоглобин ( $\text{HbO}_2$ ) представляет собой диамагнитный комплекс гемоглобина с молекулярным кислородом, в котором гемовое железо формально сохраняет степень окисления +2. Диамагнетизм и геометрия этого комплекса до сих пор являются предметом, привлекающим внимание исследователей. Среди ряда предложенных моделей наиболее общепринятыми являются модели Полинга [5] и Вейсса [6]. Полинг полагает, что связь между  $\text{Fe}(\text{II})$  и  $\text{O}_2$  осуществляется с участием двух  $d$ -электронов  $\text{Fe}(\text{II})$  и двух  $p$ -электронов положительно заряженного атома кислорода диамагнитного диполя  $^+\text{O}-\text{O}^-$ . Оставшиеся четыре  $d$ -электрона железа располагаются на двух  $t_{2g}$  орбиталах железа, которое при этом также диамагнитно. Строение комплекса Полинг изображает следующим образом:



где N означают четыре пиррольных атома порфирина и один имидазольный азот гистидина белка. Использование изотопного гибрида  $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$  в комплексе с гемоглобином при изучении спектров комбинационного рассеяния [7] подтверждает модель Полинга, в которой группа  $\text{Fe}-\text{O}-\text{O}$  образует угол 120°.

Вейсс [6] полагает, что при взаимодействии гемового железа с молекулярным кислородом происходит перенос электрона железа на кислород:



При этом единственный неспаренный электрон атома железа в состоянии  $(\text{Fe})^{\frac{5}{2}}$  спаривается с неспаренным электроном супероксид-анион-радикала  $\text{O}_2^-$  (в дальнейшем просто  $\text{O}_2^-$ ), придавая комплексу диамагнитные свойства. В подтверждение своей модели Вейсс указывает на известное сходство спектров поглощения  $\text{HbO}_2$  и щелочного метгемоглобина  $\text{HbOH}$ . Строение комплекса  $\text{Hb}$  с  $\text{O}_2$  с разделенными зарядами впоследствии аргументировалось различными методами [8–14]. Было показано [15], что длина связи  $\text{O}-\text{O}$  и частота ее валентных колебаний в свободном  $\text{O}_2^-$  совпадает с аналогичными параметрами лиганда  $\text{O}_2^-$  в  $\text{HbO}_2$ . Спектры комбинационного рассеяния  $\text{HbO}_2$  и  $\text{HbCO}$  при 4°C в области 1700–200 см<sup>-1</sup>, полученные при возбуждении лазером с длиной волны 441,6 нм, совпали со спектрами КР низкоспиновых комплексов  $\text{Fe}(\text{III})$  в  $\text{Hb}^+$  [12]. Это дало основание утверждать, что в  $\text{HbCO}$ , так же как и в  $\text{HbO}_2$ , железо имеет степень окисления +3 и связано с анионом  $\text{CO}^-$ . В рамках модели Полинга, однако, также допустим частичный сдвиг электронной плотности от железа к кислороду. Расчеты разных авторов дают различную величину отрицательного заряда на кислороде: от -0,1 [16] до -0,56 [17]. Хорошим подтверждением модели Полинга является рассчитанная температурная зависимость величины квадрупольного расщепления  $\Delta E_q$  в спектре ЯГР  $\text{HbO}_2$  [18]. Для расчетов использовано представление об определяющей роли вращения связанного с железом  $\text{O}_2$ . В выбранной модели при низкой тем-

пературе  $\text{HbO}_2$  может находиться в одной из четырех одинаковых по глубине потенциальных ям, обусловленных взаимодействием  $\pi^*$ -орбиталей  $\text{O}_2$  с  $d_{xz}$ - и  $d_{yz}$ -орбиталями железа и  $p_z$ -орбиталями четырех атомов азота порфирина. По расчету высота барьеров между потенциальными ямами составила  $200 \text{ см}^{-1}$ . Рассчитанная температурная зависимость  $\Delta E_Q$ , определяющаяся вращением  $\text{O}_2$ , в рамках модели Полинга точно совпадает с экспериментальной.

Предложена также привлекательная модель связи  $\text{Fe}-\text{O}_2$  в  $\text{HbO}_2$ , имеющая электронную конфигурацию озона [19]. Образование связи  $\text{O}_2-\text{O}$  в озоне происходит без сильного влияния на связь  $\text{O}-\text{O}$  в исходной молекуле  $\text{O}_2$ . Синглетное основное состояние  $\text{O}_3$  стабилизировано трехцентровой четырехэлектронной  $\pi$ -связью. Отличие угла между связями в  $\text{O}-\text{O}-\text{O}$  от  $90^\circ$  ( $117^\circ$ ) объясняется главным образом отталкиванием дважды занятых  $p$ -орбиталей крайних атомов. Для образования аналогичной связи  $\text{O}_2$  с  $\text{Fe}(\text{II})$  от последнего требуется: 1) наличие  $d_z$ -орбитали с одним электроном для образования  $\sigma$ -связи с аналогичной  $p_z$ -орбиталью  $\text{O}_2$ ; 2) наличие  $d_{xz}$ -орбитали с одним электроном для образования связи с  $\pi$ -системой  $\text{O}_2$ ; 3) отсутствие электронов на  $d_{xy}$ -орбитали, так как она является сильно антисвязывающей по отношению к атомам азота порфирина ( $\text{Fe}-\text{O}_2$  располагается в  $yz$ -плоскости, проходящей между двумя азотами порфирина); и 4) расположение четырех оставшихся электронов на  $d_{x^2-y^2}$  и  $d_{yz}$ -орбиталях железа. Окончательно электронная конфигурация железа в предлагаемой модели  $\text{HbO}_2$  может быть выражена

$$(d_{x^2-y^2})^2 (d_{yz})^2 (d_{xz})^1 (d_{z^2})^1 \text{ или } (t_{2g})^5 (e_g)^1$$

Расчет этой модели *ab initio* приводит к полностью неполяризованной системе  $\text{Fe}-\text{O}_2$ .

Итак, обзор литературы по связи  $\text{Fe}-\text{O}_2$  в  $\text{HbO}_2$  приводит к выводу, что имеются достаточно аргументированные данные как в пользу ионной, так и в пользу ковалентных моделей. Поскольку основным процессом диссоциации гемоглобин–кислород в нормальных условиях является отщепление нейтральной молекулы  $\text{O}_2$  (уравнение (1))



но в то же время всегда имеет место хотя бы незначительное автоокисление  $\text{HbO}_2$ , которое может быть формально описано уравнением (2), резонно принять в качестве наиболее вероятной ковалентной связи  $\text{O}_2$  с  $\text{Hb}$  в соответствии с моделью Полинга, либо другой близкой к ней модели, где имеет место частичный перенос электронной плотности от железа к кислороду. Иными словами, логично допустить, что в нормальных условиях вклад структуры  $\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^-$  в связь гемового железа с  $\text{O}_2$  вполне реален. Однако допустимо также представление о неполярной, но эффективно поляризованной связи  $\text{Fe}-\text{O}$ , в которой легко осуществляется перенос отрицательного заряда на кислород в условиях, способствующих окислению гемового железа.

Необходимо также заметить, что если на кислороде  $\text{HbO}_2$  имеется целый отрицательный заряд, это не означает, что железо имеет степень окисления +3, так как порфириновая система обладает значительной способностью компенсировать дефицит электронов у центрального иона металла. Об истинной степени окисления железа в  $\text{HbO}_2$  на основании всех имеющихся данных судить трудно. Поэтому такие обозначения как  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  в данном случае весьма условны и носят скорее описательный характер [20].

### III. АВТООКИСЛЕНИЕ ОКСИГЕМОГЛОБИНА

В соответствии с приведенным в предыдущей главе уравнением (2) наиболее простой путь окисления гемового железа – диссоциация  $\text{HbO}_2$  с гетеролитическим разрывом связи  $\text{Fe}-\text{O}$ . Если при этом в среде не со-

держится других окислителей кроме молекул кислорода, то такое окисление  $\text{HbO}_2$  принято называть автоокислением (аутоокислением). Автоокисление может облегчаться агентами, способными взаимодействовать с  $\text{O}_2$  в  $\text{HbO}_2$  (всякого рода восстановителями) или отщепляющими  $\text{O}_2^-$  (протонами). В зависимости от pH среды существенно меняется механизм автоокисления  $\text{HbO}_2$ . Поэтому целесообразно отдельно рассмотреть этот процесс в нейтральной, кислой и щелочной средах.

## 1. Автоокисление $\text{HbO}_2$ в нейтральной среде

Известно, что  $\text{HbO}_2$  в нейтральных водных растворах при хранении постепенно видоизменяется, причем одной из главных характеристик этого процесса является его окисление в метгемоглобин. Однако малая скорость окисления  $\text{HbO}_2$  при температурах  $\leq 40^\circ\text{C}$ , при которых способствующая автоокислению термическая денатурация белка не играет существенной роли, затрудняет систематическое изучение автоокисления  $\text{HbO}_2$  в нейтральных средах. Отмечалось [20], что при автоокислении  $\text{HbO}_2$  в нейтральном буфере максимум полосы Соре смещается от 412 к 405 нм, падает интенсивность полос 541 и 575 нм и появляется характерная для  $\text{Hb}^+$  полоса при 500 нм. Отмечено далее, что параллельно окислению  $\text{HbO}_2$  идет его деструкция: сглаживается полоса при 280 нм. Все эти изменения ускоряются в более разбавленном растворе  $\text{HbO}_2$  ( $1,3 \cdot 10^{-5}\text{ M}$ ), в котором часть  $\text{HbO}_2$  диссоциирована на димеры. Авторы работы [20] предполагают, что автоокисление  $\text{HbO}_2$  ускоряется образующейся в процессе реакции перекисью водорода, что было подтверждено специальными опытами с добавками разлагающей  $\text{H}_2\text{O}_2$  катализы, которые тормозили автоокисление  $\text{HbO}_2$ .

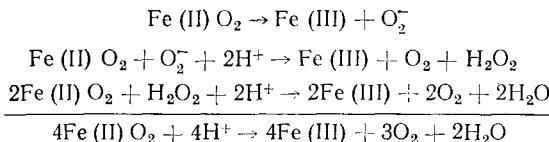
Исследование кинетики автоокисления  $\text{HbO}_2$  в  $0,1\text{ M}$  фосфатном буфере pH 7,2 показало, что реакция является двухстадийной с константами скорости для отдельных стадий 0,032 (глубина реакции  $\sim 50\%$ ) и  $0,0037\text{ ч}^{-1}$ . В аналогичных условиях при  $25^\circ\text{C}$  была измерена также кинетика автоокисления изолированных цепей. Константа скорости автоокисления  $\alpha$ -цепей оказалась равной 0,025, а  $\beta$ -цепей — 0,009  $\text{ч}^{-1}$ . Это послужило основанием полагать, что в быстрой стадии преимущественно окисляются  $\alpha$ -, а в медленной —  $\beta$ -субъединицы  $\text{HbO}_2$ . Последнее было подтверждено разделением на цепи окисленного на  $\sim 30\%$   $\text{HbO}_2$  после его обработки CO и KCN: изолированные  $\alpha$ -цепи содержали 53% цианметформы, в то время как  $\beta$ -цепи — только 5%. Различная склонность  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц  $\text{HbO}_2$  к автоокислению позволила авторам предположить, что переход  $\alpha_1\beta_2 \rightarrow \alpha_2^+\beta_2^+$  происходит через промежуточную полуокисленную форму  $\alpha_2^+\beta_2$ . Понижение парциального давления в системе до 57 и 40,5 мм рт. ст. увеличивало скорость автоокисления, преимущественно  $\beta$ -цепей.

Влияние анионов  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$  и  $\text{N}_3^-$  на скорость автоокисления  $\text{HbO}_2$  изучали при pH 7,4 и температуре  $37^\circ\text{C}$  [22]. Авторы полагают, что механизм автоокисления в этом случае включает нуклеофильное замещение  $\text{O}_2^-$  на соответствующий анион. В отличие от данных работы [20] кинетика окисления в этом случае оказалась однофазной. При концентрации анионов  $0,1\text{ M}$  и ионной силе 0,5 (с добавками сульфата) константы скорости в присутствии  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$  и  $\text{N}_3^-$  составили соответственно 0,0229, 0,0348 и  $0,175\text{ M}^{-1}\text{ч}^{-1}$ . При этом для хлор-аниона  $E_{\text{акт}} = -32$ , а для азид-аниона — 26,8 ккал/моль. Аналогичные исследования теми же авторами были проведены в интервале pH от 5 до 9,3 [23]. Установлен порядок активности для более широкого ряда анионов:  $\text{N}_3^- > > \text{SCN}^- > \text{OCN}^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^-$ . Предложен механизм, в котором нуклеофильному замещению супероксид-аниона другими анионами способствует атака протона по связанныму с железом кислороду. Малую скорость процесса по сравнению со скоростью замещения при гемовом железе таких лигандов как  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{OCN}^-$  и  $\text{F}^-$  объясняют относительно малой полярностью связи  $\text{Fe}-\text{O}_2$  и необходимостью дополнительной энергии для ее поляризации. Снижение скорости автоокисления при

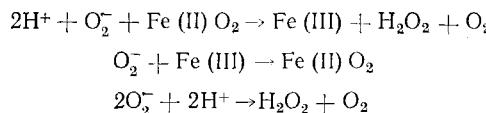
переходе от кислой среды к нейтральной авторы объясняют уменьшением концентрации взаимодействующих с  $\text{FeO}_2$  протонов.

Предлагаемый в работах [22, 23] механизм нуклеофильного замещения  $\text{O}_2^-$  другими анионами кажется достаточно убедительным лишь для азид-аниона, эффект которого заметно превосходит эффект других анионов. Подтверждением этого механизма в случае азида является практическое отсутствие его эффекта для  $\text{HbCO}$  (в этом случае нуклеофильное замещение включало бы очень мало вероятное отщепление  $\text{CO}^-$ ). В качестве другого доказательства приводится линейная зависимость константы скорости псевдоверного порядка от концентрации азида. Отсутствие подобной линейности в случае хлор-аниона делает сомнительным механизм нуклеофильного замещения  $\text{O}_2^-$  хлор-анионом, так же как и другими галоген-анионами. По данным работ [22, 23] активность галоген-анионов возрастает от брома к фтору — в порядке уменьшения нуклеофильности этих анионов в водной среде (вопреки утверждениям авторов). Однако главное возражение — это возможность неспецифических и специфических взаимодействий анионов с белком, в частности, в зоне фиксации ДФГ, в результате чего конформационное равновесие  $R \rightleftharpoons T$  для  $\text{HbO}_2$  в большей или меньшей степени смещается в сторону  $T$ -конформации, что может существенно повысить склонность  $\text{HbO}_2$  к автоокислению. Влияние анионов на  $\text{HbO}_2$  подробно обсуждено в работе [24].

Если возможность нуклеофильного замещения супероксид-аниона анионами солей кажется сомнительной в качестве единственного пути автоокисления  $\text{HbO}_2$  в присутствии солей, то сам факт образования  $\text{O}_2^-$  в реакционной среде при автоокислении  $\text{HbO}_2$  является вполне достоверным. Обнаружено, в частности, что при автоокислении  $\text{HbO}_2$  акулы [25] скорость реакции на 1/3 тормозится каталазой. В то же время супероксиддисмутаза, диспропорционирующая  $\text{O}_2^-$ , ингибирует автоокисление незначительно. Из этого делается вывод, что образующийся в системе  $\text{O}_2^-$  быстро превращается в  $\text{H}_2\text{O}_2$ , которая активно участвует в окислении  $\text{HbO}_2$ , на 1/3 обеспечивая его конверсию в окисленную форму. Аналогичный эффект обнаружен и при автоокислении  $\text{HbO}_2$  человека [26]. В этом случае реакцию проводили в 0,067 M фосфатном буфере при pH 7,4 с добавкой ЭДТА (для связывания следов  $\text{Cu}^{2+}$ ) при 37°C. Предложен механизм, включающий следующие стадии:



Как следует из приведенной схемы,  $\text{O}_2^-$  принимает активное участие в окислении  $\text{HbO}_2$ . Это подтверждается и данными работы [27], авторы которой полагают, что  $\text{O}_2^-$  отдает один электрон кислорода  $\text{HbO}_2$ , после чего частично восстановленный кислород (связанный с  $\text{Fe(II)}$  супероксид-анион) забирает второй электрон от  $\text{Fe(II)}$  и связывает два протона, образуя  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В нативном эритроците этот процесс, по-видимому, не играет заметной роли, так как концентрация супероксиддисмутазы в нативном эритроците, по оценке авторов работы [27], в 10 раз превосходит концентрацию, достаточную для полного подавления окислительного эффекта  $\text{O}_2^-$ . Непосредственное участие  $\text{O}_2^-$  в окислении  $\text{HbO}_2$  было подтверждено также для системы, где  $\text{O}_2^-$  генерировалася при окислении ксантина, катализируемого ксантин-оксидазой [28]. В этом случае предполагается протекание следующих реакций:



Установлено, что в нейтральной среде первая из приведенных реакций

подавляется третьей по достижении концентрации  $O_2^- > 10^{-5} M$ . При работе с изолированными цепями [21] обнаружена большая скорость автоокисления  $\alpha$ -цепей ( $0,025 \text{ ч}^{-1}$  при  $25^\circ\text{C}$ ) по сравнению с  $\beta$ -цепями ( $0,009 \text{ ч}^{-1}$ ). Предполагается, что промежуточным продуктом автоокисления  $HbO_2$  являются валентные гибриды  $\alpha_2^+ \beta_2$ . Это означает, что при наблюдаемом, например, 20%-ном окислении  $HbO_2$  фактически окислением затронуто 40% молекул  $HbO_2$ . По данным [29], при автоокислении в  $0,01 M$  фосфатном буферо pH 6,6–7,8 константа скорости образования  $\alpha_2^+ \beta_2$  составляет  $2,2 \cdot 10^{-2} \text{ ч}^{-1}$ , а  $\alpha_2 \beta_2^+ = 1,88 \cdot 10^{-2} \text{ ч}^{-1}$ . Добавки инозитгексаfosфата (ИГФ) в этом случае примерно вдвое ускоряли окисление обеих субъединиц.

Образование валентных гибридов при автоокислении гемоглобина может иметь серьезные физиологические последствия. Методом аналитического изоэлектрофокусирования в поликариламидном геле гемолизатов крови больных метгемоглобинемией с более чем 20% содержанием  $Hb^+$  обнаружены три фракции:  $HbO_2$ ,  $Hb^+$  и частично окисленного  $Hb$  [30]. Количество последней фракции составляло 35–50% от общего количества гемопротеина. Таким образом, определение окисленного гемоглобина общепринятым методом Драбкина дает концентрацию окисленных гемов, но не количество затронутых окислением тетramerов гемоглобина. Для валентных гибридов характерно повышенное сродство к кислороду и почти полное отсутствие кооперативности (аналогичные данные получены и в работе [31]). Два последних обстоятельства существенно ухудшают кислородтранспортную способность крови у больных метгемоглобинемией.

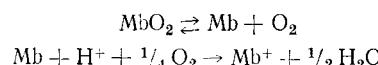
Имеются данные [32] по автоокислению  $HbO_2$  в плазме крови при pH 7,5 и  $37^\circ\text{C}$ . Подтверждены результаты работы [21]: снижение парциального давления в плазме крови со 126 до 23 мм рт. ст. в несколько раз увеличило скорость автоокисления  $HbO_2$ .

При работе с  $HbO_2$  лягушки *Rana esculenta* [33], выбранному благодаря его высокой лабильности к автоокислению, было установлено, что на скорость окисления этого оксигемоглобина в  $0,01 M$  фосфатном буфере pH 7,0 существенное влияние оказывают ионы тяжелых металлов, присутствующие в буфере. Добавки ЭДТА в этом случае значительно снизили скорость автоокисления. В отсутствие тяжелых металлов через 1 ч при  $2^\circ\text{C}$  и начальной концентрации  $HbO_2 1,5 \cdot 10^{-5} M$  оказалось окисленным 7%  $HbO_2$ , в то время как с добавками  $10^{-4} M$  металлов были получены следующие величины: Cu – 28% окисленного  $HbO_2$ , Zn – 16%, Sn – 5%, Fe – 11%, Cr – 14%, Mn – 18%. Hg – 16%, Pb – 11%, Co – 17%, Cd – 13%, Ni – 20%. Установлено, в частности, что медь образует комплексы с имидазольными группами гистидина и вызывает денатурацию белка, которая в присутствии ЭДТА обратима. Каталитическое влияние тяжелых металлов отмечалось также при автоокислении оксимиоглобина ( $MbO_2$ ) кашалота и крупного рогатого скота в различных буферах [34]. Эквимолекулярное количество Cu(II) в этом случае ускоряло автоокисление в 25 раз. Ускоряющее действие Cu(II) на автоокисление  $MbO_2$  кашалота при pH 5,0 [35] объясняют связыванием Cu(II) с гистидином GH1, который, взаимодействуя с гемом, усиливает делокализацию валентного электрона железа. Этот электрон, по мнению авторов, может оказаться в потенциальной яме акцептора ( $O_2$  среды или  $Cu^{2+}$ ), если последний образует комплекс в области His GH1.

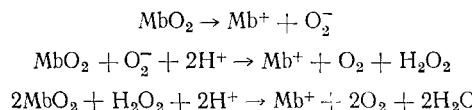
В работе [36] отмечается, что при pH 7 ( $0,05 M$  трис-буфер) добавки  $ZnCl_2$ ,  $PdCl_2$  и  $CdCl_2$  не дали спектральных изменений раствора  $HbO_2$ , в то время как добавки  $FeCl_2$ ,  $FeCl_3$ ,  $CuCl_2$  и  $HgCl_2$  привели к спектральным изменениям и выпадению осадка. Любопытно, что присутствие ЭДТА, подавляя эффект Cu(II), не мешает окислительному действию Fe(II) и Fe(III).

Кроме процитированной выше работы [35] по автоокислению  $MbO_2$  имеется достаточно обширная литература. Существенное значение для понимания механизма автоокисления  $MbO_2$  имеет точное определение

количества свободного  $O_2$ , выделившегося при образовании  $Mb^+$  [37]. Вывесено, что лишь 20%  $O_2$ , связанного в  $MbO_2$  (быка и кашалота) превращается в воду, а 75% выделяется в свободном состоянии. Это позволило предположить следующую простую схему:

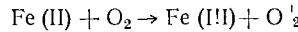


Эту схему подтвердили обнаруженные авторами работы [37] зависимости скорости автоокисления  $MbO_2$  от концентрации  $O_2$  и рН: при рН 7 константы скорости автоокисления оказались обратно пропорциональными  $[O_2]$ , а логарифмы констант линейно возрастили при понижении рН от 7 до 5. Более детальные исследования позволили усложнить приведенную выше схему, включив в нее в качестве окислителей промежуточно образующиеся  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  [26]:

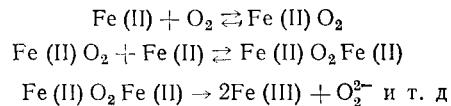


Свообразная точка зрения относительно возможного механизма автоокисления  $HbO_2$  высказана авторами работы [38], где автоокисление  $HbO_2$  индуцировали добавкой высокомолекулярных полипептидов, полученных разложением  $Mb$  из сердца лошади. В этом случае наблюдали перенос гема из гемового кармана на пептид с образованием геми-хрома. Наиболее эффективными в отношении автоокисления  $HbO_2$  оказались пептиды, хорошо связывающие феррогем, но плохо ферригем. В этом случае имеет место следующая цепь превращений: выход феррогема из гемового кармана, связывание феррогема с новым лигандом, окисление феррогема и возвращение ферригема в гемовый карман. Процесс идет с максимальной скоростью при полунасыщении гемоглобина кислородом и подавляется при полном насыщении. Таким образом, автоокисление  $HbO_2$  в нейтральной среде может быть обусловлено окислением частично диссоциирующих дезоксиферрогемов из  $Hb$ , находящегося в равновесии с  $HbO_2$ . Сходные представления о механизме автоокисления  $HbO_2$  высказаны в монографии Блюменфельда [39], изучавшего перенос гема из гемоглобина на желатину (реакция трансгемирования). Однако в отсутствие внешних лигандов, способствующих выходу гема из гемового кармана, гем-диссоциационный механизм автоокисления вызывает определенные сомнения, если учесть, что  $\alpha$ -субъединицы в  $HbO_2$  окисляются легче  $\beta$ -субъединиц, в то время как связь гема с глобином в первых прочнее, чем во вторых [21].

Известное приближение к пониманию интимного механизма автоокисления  $HbO_2$  в нейтральной среде может давать сравнение этого процесса с процессом автоокисления безбелковых комплексов железа(II). В обзоре [40] обсуждены основные возможные механизмы. Простое бимолекулярное взаимодействие:

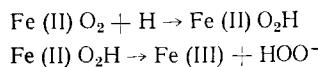


является эндотермическим процессом и вряд ли может быть моделью основного направления автоокисления  $HbO_2$ . Более энергетически выгодной является следующая схема:



Однако если эта схема пригодна для порфириновых комплексов  $Fe\text{ (II)}$ , то при наличии белкового окружения образование димера маловероятно. Наконец, определенную роль может играть процесс с передачей электрона из среды на связанный с железом(II) кислород, что может

быть изображено следующей схемой:



Однако и этот процесс малоэффективен для  $\text{HbO}_2$ , так как  $\text{O}_2$  в гемовом кармане защищен от восстановителей дистальным гистидином. Имеется мнение, что именно последнему в значительной степени обязан гемоглобин высоким окислительно-восстановительным потенциалом (+0,2 В при pH 7,0) [41].

## 2. Автоокисление $\text{HbO}_2$ в кислой среде

В нейтральном растворе  $\text{HbO}_2$  существует равновесие тетramer–димер (уравнение (3)), в сильной степени сдвинутое в сторону тетрамерной формы  $\text{HbO}_2$  ( $\alpha_2\beta_2$ ).



Отклонение pH раствора от нейтрального приводит к сдвигу равновесия в сторону димеров. Уже в слабокислой среде ( $\text{pH} < 6$ ) концентрация димеров ощущима [42]. При значениях  $\text{pH} < 4$  происходят значительные структурные изменения, которые нормализуют маскированные в белке прототропные группы. К ним относятся 18 из 38 имеющихся в гемоглобине имидазольных групп [43]. Дилатометрические исследования [42] показали, что при относительно высоких pH в кислой области объем  $\text{HbO}_2$  несколько увеличен, что характерно для протонируемых глобулярных белков. Однако протонирование  $\text{HbO}_2$  начиная с pH 4,5 приводит к резкому уменьшению объема, что авторы объясняют усиленной диссоциацией  $\text{HbO}_2$  на димеры.

В области pH 3,3–1,8 подробно изучены структурные изменения карбоксигемоглобина [45], очень близкого по конформации и свойствам к  $\text{HbO}_2$ . Отмечено, что при  $\text{pH} > 3$  происходит разворачивание белка, в то время как гем остается связанным с нативными участками белка, хотя окружение его и изменяется. При  $\text{pH} < 3$  изменения структуры белка более существенны: разворачивание белка сопровождается значительным уменьшением поглощения в области полосы Соре (изменение характера связывания гема), а также исчезновением аномальной дисперсии оптического вращения и изменением поглощения при 269 нм, сопровождающим раскручивание белковой глобулы. При  $\text{pH} < 2,1$  практически все гемы диссоциируют. В этом случае кинетика спектральных изменений не зависит от pH. Отмечалось [46], что спектр поглощения продукта денатурации  $\text{HbCO}$  при pH 1,95 зависит от температуры проведения денатурации (от 0 до 25°C). Авторы объясняют это отщеплением гема от денатурированного продукта и присоединением его в другом месте белка, положение которого зависит от температуры процесса. Проведение денатурации при pH 3,2 не дает подобной зависимости от температуры процесса, что свидетельствует об устойчивости нативной связи гема с глобином при этом значении pH.

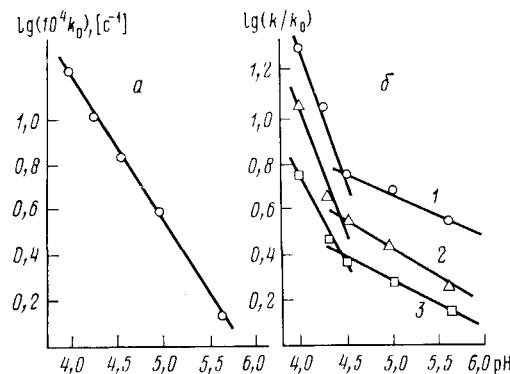
В работах [47, 48] исследовано автоокисление  $\text{HbO}_2$  (в концентрации  $\sim 3 \cdot 10^{-5} M$ ) в кислой среде при pH от 5,6 до 4,0 в присутствии различных количеств солей щелочных металлов. Во всех случаях использовался 0,1 M Na-ацетатный буфер. Определяемые спектрофотометрически (при 576 нм) константы скорости реакции в основном хорошо рассчитывались по первому порядку до значительной глубины реакции. Понижение pH от 5,6 до 4,0 сопровождалось линейным ростом логарифма константы скорости. Это дает основание связать изменение активности протонов среды в указанном интервале pH с одним и тем же линейно изменяющимся фактором. Обнаруженная линейность указывает на качественное постоянство этого фактора при увеличении активности протонов вплоть до pH 4,0. Этим фактором могут быть конформационные изменения белка  $\text{HbO}_2$ , повышающие лабильность  $\text{HbO}_2$  к автоокислению. Одновременно эти изменения увеличивают степень диссоциации  $\text{HbO}_2$  на димеры и мономеры. В общем случае диссоциа-

тивно-ассоциативное равновесие для  $\text{HbO}_2$  в различных водных средах выражается уравнением (4), дополняющим приведенное выше уравнение (3) возможностью образования в системе мономеров



Для условий, близких к физиологическим, достоверные данные о сколько-нибудь ощутимой диссоциации гемоглобина на мономеры отсутствуют, однако мономеры обнаруживаются при значительном отклонении от нейтральных значений pH [49]. В то же время известно, что хлориды

Рис. 1. pH-Зависимости логарифма константы скорости автоокисления  $\text{HbO}_2$  в отсутствие хлоридов —  $k_0$  (а) и логарифмов относительных скоростей в присутствии KCl (б);  $[\text{HbO}_2]_0 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $40^\circ\text{C}$  [48]; 1 —  $0,333 \text{ M}$ , 2 —  $0,166 \text{ M}$ , 3 —  $0,083 \text{ M}$



в нейтральной среде увеличивают склонность мономерных субъединиц к самоассоциации [50, 51] и образованию димеров  $\alpha\beta$  [52]. Пренебрегая возможной разницей в скорости автоокисления  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц можно написать более общее выражение для скорости окисления  $\text{HbO}_2$  в виде уравнения (5)

$$\omega = -\frac{d[\text{HbO}_2]}{dt} = k_{\text{набл}} [\text{HbO}_2] = k_4 [\alpha_2\beta_2] + k_2 [\alpha\beta] + k_1 [\alpha + \beta] \quad (5)$$

где  $k_4$ ,  $k_2$  и  $k_1$  — константы скорости автоокисления соответственно тетрамеров, димеров и мономеров, а  $[\alpha_2\beta_2]$ ,  $[\alpha\beta]$  и  $[\alpha + \beta]$  — концентрации соответственно тетрамеров, димеров и мономеров в расчете на гем.

Если зависимость скорости автоокисления  $\text{HbO}_2$  от pH в интервале pH 5,6–4,0 не имеет характерных точек [48], то в присутствии хлоридов щелочных металлов в концентрации до 0,33 моль/л pH-зависимость логарифма константы скорости имеет резкий излом при pH 4,5 (рис. 1). Можно предположить, что при этом значении pH в присутствии хлоридов имеет место излом на кривой pH-зависимости степени диссоциации тетramer — димер. Существенная роль хлорид-иона в этом случае объясняется следующим образом. В отсутствие или при малой концентрации анионов постепенное увеличение активности протонов увеличивает количество протонированных прототропных групп в основном имидазольных и карбоксилатных остатков. Накопление положительных зарядов в области контакта  $\alpha^1-\beta^2$  усиливает кулоновское отталкивание димеров и постепенно смещает вправо равновесие тетramer — димер. В присутствии электролита ионная сила среды при относительно высоких pH в кислой области усиливает гидрофобные взаимодействия между димерами в тетрамерах и в известной степени препятствует диссоциации последних (энтропийный фактор). Однако по достижении определенного уровня протонирования белка (предположительно в области pH 4,5) область контакта  $\alpha^1-\beta^2$  в результате кулоновского отталкивания димеров становится легкодоступной для анионов соли, которые направляются к положительным зарядам на белке, в основном не утрачивая гидратной оболочки. К тому же по мере протонирования белка уменьшается его гидрофобный характер. В результате всего этого в определенной области pH роль соли как фактора, усиливающего гидрофобные взаимодействия в белке, уменьшается и, напротив, гидратированные анионы среды приобретают возможность вторгаться в

область контакта между димерами  $\alpha^1\beta^1$ , дестабилизируя тетрамерную структуру. Одновременное действие этих факторов, по-видимому, и определяет появление четкого излома зависимостей скорости реакции от pH в присутствии хлоридов щелочных металлов. Возможная при  $pH < 4,5$  диссоциация димеров  $\alpha^1\beta^1$  на мономеры делает излом при  $pH \sim 4,5$  более резким. Говоря о возможной диссоциации на мономеры, авторы работы [47] подчеркивают, что образование разделенных средой

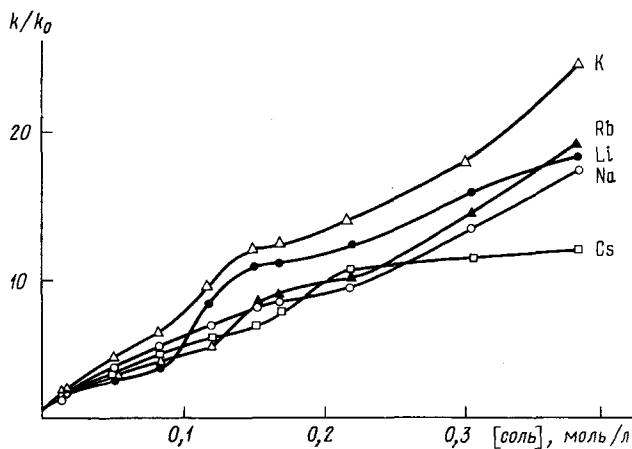


Рис. 2. Зависимость скорости автоокисления  $\text{HbO}_2$  от концентрации хлоридов щелочных металлов при  $pH 4,0$  и  $40^\circ\text{C}$ ,  $[\text{HbO}_2]_0 \approx 3 \cdot 10^{-5} M$  (на гем) [47]

мономеров не является необходимым при обсуждении «диссоциационного» влияния pH на автоокисление  $\text{HbO}_2$ : причиной сильных эффектов на автоокисление  $\text{HbO}_2$  может быть и ослабление контакта  $\alpha^1-\beta^1$  вследствие конформационных изменений мономеров в димерах, предшествующих и определяющих диссоциацию на мономеры.

Установлено [47, 48], что катионы солей в кислой среде вполне отчетливо оказывают влияние на скорость автоокисления  $\text{HbO}_2$ . На рис. 2 изображены кривые зависимости  $k/k_0$  (где  $k_0$  — константа скорости без добавки соли) от концентрации солей для хлоридов щелочных металлов при pH 4,0. Наиболее активен катион калия, а наименее активен при концентрациях выше 0,25 M катион цезия. При pH 5,6 разница между эффектами отдельных катионов более ощутима, причем и в этом случае наиболее пассивен цезий. При pH 4,0 установлена также разница между эффектами ряда анионов. Как видно на рис. 3, по ускоряющему действию на автоокисление  $\text{HbO}_2$  анионы образуют ряд:  $\text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^- < \text{ClO}_4^-$ . Этот ряд почти совпадает с классическим лиотропным рядом Гофмейстера. Расположение анионов в соответствии с лиотропным рядом ранее было обнаружено для диссоциации  $\text{HbCO}$  на димеры в нейтральной среде при действии различных солей натрия и калия [54]. Близость диссоциационного ряда с рядом анионов по их ускоряющему действию на автоокисление  $\text{HbO}_2$  подтверждает выдвиннутое в работах [47, 48] предположение об определенном сходстве механизмов процессов, приводящих как к диссоциации  $\text{HbO}_2$  на димеры и мономеры, так и к его автоокислению.

Изучено влияние природы и концентрации ряда карбоксилатных буферных анионов на автоокисление  $\text{HbO}_2$  [55]. Обнаружено, что при pH 5,6, где  $\text{HbO}_2$  в основном тетramerен, и при pH 4,0, где  $\text{HbO}_2$  существует преимущественно в виде димеров, характер влияния разных карбоксилат-анионов существенно различен. На рис. 4 приведены логарифмы констант скорости автоокисления  $\text{HbO}_2$  при  $40^\circ\text{C}$  в зависимости от молярности буфера. При pH 5,6 карбоксилаты четко делятся на

три группы: алконоаты, хлорацетат (в присутствии которого реакция протекает в 4–8 раз медленнее, чем с алконоатами) и дающий сложную концентрационную зависимость цитрат. Видно, что малые добавки алконоатов (до  $\sim 0,2 M$ ) вызывают наиболее ощущимый эффект на автоокисление  $\text{HbO}_2$ . Длина цепи алкановой кислоты при этом практически не влияет на эффект. При  $\text{pH} 4,0$  картина иная. Если учесть степень

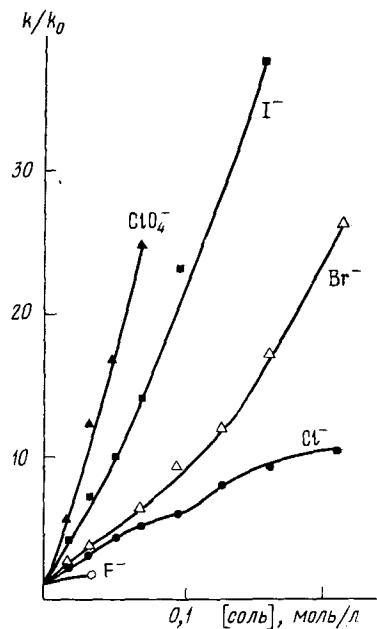


Рис. 3

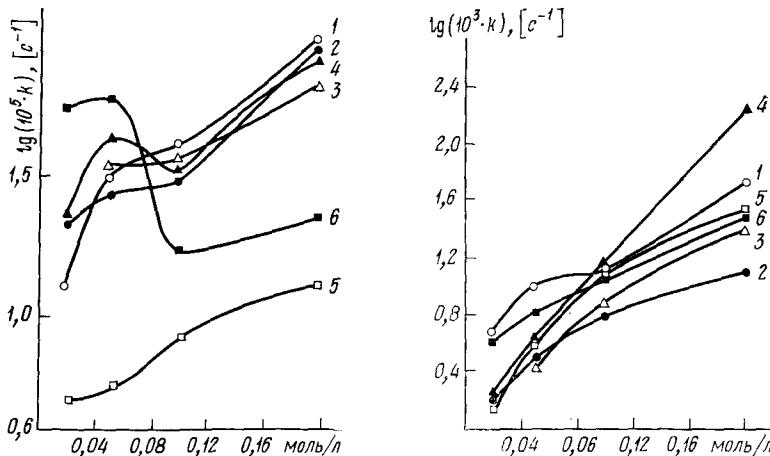


Рис. 4

диссоциации алкановых кислот при этом значении  $\text{pH}$ , то алконоаты дают почти линейную зависимость логарифма константы скорости в ряду: формиат < ацетат < пропионат < бутират, где скорость с бутиратом при молярности буферов  $0,2 M$  приблизительно в 15 раз превышает скорость с ацетатом. Отсюда следует, что в условиях, в которых  $\text{HbO}_2$  практически полностью диссоциирован на димеры, неполярные агенты весьма эффективно модифицируют структуру  $\text{HbO}_2$ , делая ее существенно менее устойчивой к автоокислению, что не наблюдается при тетрамерной структуре  $\text{HbO}_2$  ( $\text{pH} 5,6$ ). Следовательно, тетрамерный  $\text{HbO}_2$ , внешняя поверхность которого в основном гидрофильна, мало чувстви-

тельен к неполярным агентам, в то время как димерный  $\text{HbO}_2$ , имеющий открытую контактную поверхность  $\alpha^1-\beta^2$  со значительными гидрофобными участками, весьма чувствителен к неполярным агентам.

В интервале рН 3,6–2,4 при 0° С измерена кинетика денатурации  $\text{HbO}_2$  лошади [56]. С понижением рН в указанном интервале константа скорости (первого порядка) увеличивалась экспоненциально. Сопоставляя этот факт с данными работы [48], можно предположить, что в отсутствие избытка солей денатурационный и автоокислительный процессы (стимулируемые, по всей видимости, одними и теми же факторами) для  $\text{HbO}_2$  разных видов пропорциональны активности протонов в достаточно широком диапазоне рН в кислой области. Данные по автоокислению  $\text{MbO}_2$  быка при рН 7,0–5,0 [37] дают некоторое основание расширить указанный диапазон рН до значения 7,0. Одновременно следует еще раз подчеркнуть, что сформулированный выше «диссоциационный» механизм автоокисления  $\text{HbO}_2$  предполагает не сам факт диссоциации гемоглобина на субъединицы, а конформационные изменения белка, ей предшествующие. Характер этих изменений, видимо, в основном такой же и у одноцепочечного миоглобина, что подтверждается линейной зависимостью константы скорости автоокисления  $\text{MbO}_2$  от активности протонов [37].

**Параметры уравнения Аррениуса для окисления  $\text{MbO}_2$  кашалота в 0,015 M *tris*-фосфатном буфере [57]**

рН	$t = 10-20^\circ$			$t = 25-35^\circ$		
	$\Delta G_{20}^{\neq}$	$\Delta H^{\neq}$	$\Delta S^{\neq}$ , э. е.	$\Delta G_{25}^{\neq}$	$\Delta H^{\neq}$	$\Delta S^{\neq}$ , э. е.
5,0	3,59	6,4	9,6	3,48	20,8	59,1
5,4	3,72	6,8	10,5	3,63	22,0	62,7
5,8	3,66	9,2	18,9	4,05	26,0	74,9
6,0	3,98	14,6	26,0	4,20	29,6	86,7
6,4	4,49	19,2	50,2	4,65	37,2	111,1
6,8	5,33	28,8	80,1	5,06	44,0	132,9

В интервале рН 7–5 определены основные параметры автоокисления  $\text{MbO}_2$  кашалота в 0,015 M *tris*-фосфатном буфере [57]. При 35° С обнаружена линейная зависимость от рН величины  $\lg(V/V_0)$ , где  $V$  – концентрация  $\text{Mb}^+$  в определенный момент времени в начальном периоде реакции. Учитывая, что тангенс угла наклона этой зависимости равен двум, авторы предположили, что автоокисление  $\text{MbO}_2$  катализируется протонированием двух гистидиновых остатков. Кривая температурной зависимости скорости реакции имеет излом между 20 и 25° С. Обнаруженные для разных рН параметры уравнения Аррениуса приведены в таблице. Разница этих параметров для интервалов температур 10–20 и 25–35° С дала основание авторам утверждать о существовании двух механизмов автоокисления  $\text{MbO}_2$ . Обнаружено, что зависимость  $\ln k$  от  $\sqrt{\mu}$  ( $\mu$  – ионная сила раствора) при разных температурах имеет минимум при  $\sqrt{\mu} \approx 0,2$ . Уменьшение скорости автоокисления  $\text{MbO}_2$  с увеличением ионной силы раствора до  $\mu=0,04$  авторы объясняют экранированием положительно заряженных групп белка, существенных для автоокисления  $\text{MbO}_2$ .

Завершая этот раздел, можно кратко сформулировать основные возможные причины ускорения автоокисления  $\text{HbO}_2$  в кислых средах. Таковыми могут быть: 1) обусловленные протонированием слабоосновных центров белка конформационные изменения, сопровождающиеся диссоциацией тетрамер – димер и димер – мономер; 2) протонирование дистального гистидина, повышающее гидрофильность гемовой полости, что может облегчить подход к железу анионов из внешней среды и выход  $\text{O}_2^-$ ; 3) протонирование связанного с железом  $\text{O}_2$ , способствующее переносу электрона от  $\text{Fe}(\text{II})$  к  $\text{O}_2$  с последующим отщеплением  $\text{HOO}'$ .

### 3. Автоокисление $\text{HbO}_2$ (и окисление $\text{HbCO}$ ) в щелочной среде

Механизм действия щелочи на гемоглобин наиболее полно обсужден Перутцем в работе [58]. Основные идеи сводятся к следующему. Свободная энергия сферического полиэлектролита пропорциональна квадрату его чисто поверхностного заряда, вследствие чего устойчивость этого полиэлектролита уменьшается с любой стороны изоэлектрической точки в процессе разрядки катионных или анионных групп. Титрование кислотой или щелочью может ионизировать слабые кислоты или основания, скрытые в неполярном ядре. Ионизуясь, эти группы притягивают к себе гидратную оболочку, что изменяет нативную структуру белка и сдвигает равновесие в сторону развернутой формы. Сравниваются три гемоглобина: гемоглобин А человека, фетальный гемоглобин (F) и гемоглобин быка. В 0,1 M NaOH при 20° С  $\text{HbCO(A)}$  денатурирует через 20 с, а  $\text{HbCO(F)}$  — через 12 мин, в то время как денатурация  $\text{HbCO}$  быка в 0,5 M NaOH характеризуется трехчасовым периодом полураспада. Далее известно, что все три гемоглобина диссоциируют на димеры при  $\text{pH} > 10$ . Отсюда вывод, что диссоциация на димеры является обратимой и не представляет собой в строгом смысле слова денатурацию. При достижении  $\text{pH} 11,6$  димеры  $\text{HbCO(A)}$  расщепляются и денатурируют,

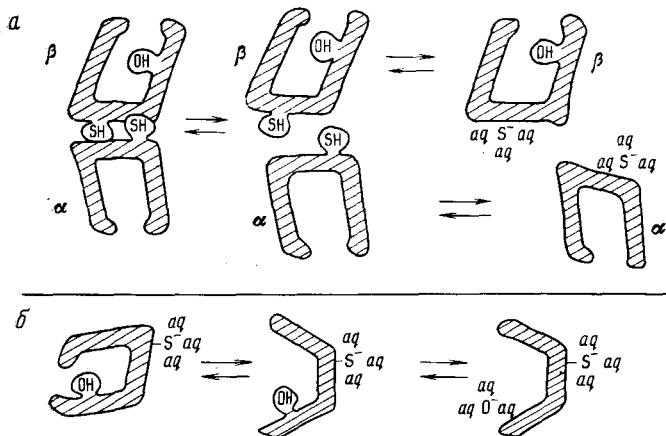


Рис. 5. Схематичное представление щелочной денатурации гемоглобина по Перутцу [58]; а — диссоциация димера и ионизация цистеина, б — разворачивание мономера и ионизация тирозина

в то время как димеры двух остальных  $\text{HbCO}$  денатурируют лишь в более жестких условиях. Предполагается, что именно эта стадия является лимитирующей. Детально анализируя аминокислотный состав трех названных гемоглобинов и сравнивая  $\text{pK}_a$  различных аминокислотных остатков, Перутц приходит к следующему заключению: причиной неустойчивости к щелочи  $\text{HbA}$  является наличие у него в области  $\alpha^1-\beta^1$  контакта двух Cys ( $\text{G11}\alpha$  и  $\text{G14}\beta$ ), а также Тут  $\text{H8}\beta$ . В воде  $\text{pK}_a$  сульфогидрильных групп цистеина составляет 9,1—9,5, а гидроксила тирозина — 9,5—10,0. Поскольку эти группы в гемоглобине сильно маскированы, реальные значения  $\text{pK}_a$  этих групп выше, однако все эти группы безусловно ионизируются при  $\text{pH} > 12$ . Фетальный гемоглобин имеет только один из трех названных остатков (Cys в  $\gamma$ -цепи), в то время как гемоглобин быка подобных групп не содержит вообще, что и является причиной его чрезвычайно высокой устойчивости к щелочи. На рис. 5 приведено схематическое представление диссоциации димера и раскручивания мономерных цепей под действием щелочи. Автор замечает при этом, что отсутствуют достоверные сведения относительно первичности протекания диссоциации на мономеры или денатурации.

В работе [59] подробно изучено влияние  $\text{pH}$  раствора на скорость автоокисления  $\text{HbO}_2$  человека в  $\text{NaOH}$ -глициновом буфере в интервале  $\text{pH} 9,0$ —12,0 при 40° С. Найденная зависимость приведена на рис. 6, ко-

торый показывает, что скорость автоокисления, монотонно возрастающая при повышении pH во всем изученном интервале, образует четыре достаточно четко различимых участка зависимости от pH. В интервале pH 9—10 константа скорости линейно возрастает от значения 0,75 до 1,6·10<sup>-5</sup> с<sup>-1</sup>, т. е. приблизительно вдвое. По имеющимся данным для HbCO [60] в том же интервале pH примерно вдвое же увеличивается концентрация димеров — от ~12 до ~24%. Такое совпадение наводит на мысль о том, что скорость автоокисления HbO<sub>2</sub> в интервале pH 9—10 определяется главным образом степенью диссоциации тетramer — димер. В интервале pH 10—10,6 константа скорости линейно возрастает почти на порядок. Можно предположить, что резкий излом зависимости при pH 10,0 обусловлен не только быстрым нарастанием концентрации димеров (приблизительно в три раза), но и конформационными изменениями образующихся димеров. Далее кривая зависимости претерпевает еще два излома: при pH 10,6 и 11,6. Для трех значений pH определены температурные зависимости скорости автоокисления. Рассчитаны следующие значения параметров активации:

$$\text{pH } 10,7 \quad E_{\text{акт}} = 60,3 \text{ ккал/моль}, \Delta S^\neq = +116 \text{ э. е.}, \Delta G^\neq = 25,2 \text{ ккал/моль}$$

$$\text{pH } 11,45 \quad E_{\text{акт}} = 18,7 \text{ ккал/моль}, \Delta S^\neq = +15,7 \text{ э. е.}, \Delta G^\neq = 21,4 \text{ ккал/моль}$$

$$\text{pH } 12,0 \quad E_{\text{акт}} = 10,9 \text{ ккал/моль}, \Delta S^\neq = -36,7 \text{ э. е.}, \Delta G^\neq = 19,9 \text{ ккал/моль}$$

Высокие значения энталпии и энтропии активации характерны для денатурации белков. В частности при pH 8 для термической денатурации HbA человека  $E_{\text{акт}} = 77,3$  ккал/моль и  $\Delta S^\neq = 153$  э. е. [61]. С другой стороны,

для простых комплексов железа энергия активации перехода Fe(II) → Fe(III) при реакции с O<sub>2</sub> имеет величину порядка 12—15 ккал/моль [62, 63]. Характерной для всех простых комплексов является и отрицательная энтропия активации окисления. Все это позволяет утверждать, что при относительно низких значениях pH (9—10,5) кинетику автоокисления HbO<sub>2</sub> лимитируют конформационные изменения белка; по мере же повышения pH скорость их возрастает и лимитирующую кинетику стадией становится окисление железа в уже денатурированном гемоглобине (возможно, в диссоциированном геме). Сделана попытка интерпретировать полученные кинетические результаты путем сопоставления их со спектрами поглощения в области 245—320 нм при 10°C (с целью зафиксировать лишь быстрые конформационные изменения HbO<sub>2</sub> под действием щелочи). Повышение pH от 9 до 10, как это и следовало ожидать, практически

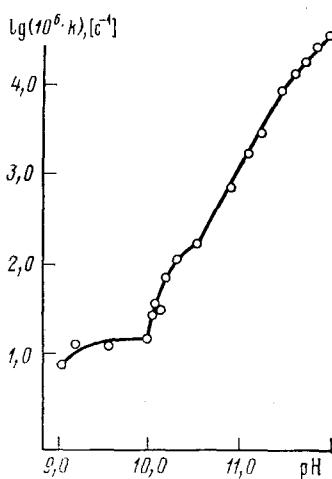


Рис. 6. Зависимость  $\lg k$  от pH в щелочной области для автоокисления HbO<sub>2</sub> при 40°C,  $[HbO_2]_0 \approx 3 \cdot 10^{-5} M$  [59]

не влияет на спектр. При pH 11 заметно увеличивается поглощение в области 250—260 нм (нормализация фенилаланина) и появляется плечо в области 285—295 нм (триптофан, тирозин). При pH 12 и 13 возникшие в спектре изменения становятся более отчетливыми. Таким образом, можно предположить, что уже при pH 11 происходят заметные конформационные изменения HbO<sub>2</sub>, которые, в частности, могут вызывать демаскирование тирозинового и нереактивных цистeinовых остатков, ионизация которых, в соответствии с представлениями Перутца [58] и авторов работы [59], ведет к ускоренной денатурации и автоокислению HbO<sub>2</sub>.

В работе [64] изучена кинетика окисления HbCO при pH 11,0—11,9 при 39°C в отсутствие молекулярного кислорода. В отличие от данных работы [23], где HbCO при нейтральных pH в присутствии азид-аниона окисляется на 6—8 порядков медленнее по сравнению с HbO<sub>2</sub>, скорость окисления HbCO в щелочной среде оказалась соизмеримой со скоростью

автоокисления  $\text{HbO}_2$ . Более того, обнаруженный для  $\text{HbO}_2$  излом зависимости  $\lg k$  от  $\text{pH}$  [59] воспроизводился и для  $\text{HbCO}$ , хотя и при несколько более низком  $\text{pH} = 11,4$ . Это позволило сделать вывод, что в интервале  $\text{pH} = 11-12$  механизм окисления  $\text{HbO}_2$  такой же, как и механизм окисления  $\text{HbCO}$ . По всей видимости, при  $\text{pH}$  от 11 до 11,4—11,6 окисление как  $\text{HbO}_2$ , так и  $\text{HbCO}$  лимитирует стадия денатурации белка, а при более высоких  $\text{pH}$  — окисление денатурированного гемопротеина. Энергия активации окисления  $\text{HbCO}$  при  $\text{pH} = 11,65$  (15,3 ккал/моль) практически совпадает с соответствующей величиной для  $\text{HbO}_2$ . При  $\text{pH}$ , близком к 12, константы скорости для  $\text{HbO}_2$  и  $\text{HbCO}$  очень близки, откуда следует вывод, что в обоих случаях при высоких  $\text{pH}$  в лимитирующую кинетику стадии превращается один и тот же субстрат. Можно допустить, что таковым является дезоксиферрогем. В работе [64] не выяснена природа непосредственного окислителя железа в  $\text{HbCO}$ . Проведение окисления в аэробных условиях практически не изменило константу скорости. В отличие от гладко протекающего по первому порядку окисления  $\text{HbO}_2$  окисление  $\text{HbCO}$  осуществляется как двухфазный процесс — первая фаза, более быстрая, продолжается приблизительно до 50%-ной глубины реакции.

Исследовано автоокисление  $\text{HbO}_2$  в присутствии 0,01 M KSCN без буфера ( $\text{pH} \sim 10,4$ ) с добавками различных количеств первичных нормальных алифатических спиртов  $\text{C}_1-\text{C}_8$  [65]. Сравнительная каталитическая активность спиртов в этом ряду изменяется следующим образом: 1; 2,2; 7,2; 17,5; 47,1; 893; 4010; 7500. Обращает на себя внимание резкое возрастание активности спирта при переходе от 1-пентанола к 1-гексанолу. Вероятно, это связано с повышенной способностью 1-гексанола и более высокомолекулярных спиртов с нормальной цепочкой внедряться в этой цепочкой во внутренние в основном гидрофобные области гемоглобина.

Преимущественное значение неполярных эффектов перед полярными еще более отчетливо проявилось при окислении  $\text{HbCO}$  в щелочном буфере ( $\text{pH} = 11,35$ ) в присутствии тетраалкиламмонийбромидов [66]. Тетраметиламмонийбромид при концентрациях до 0,04 M (концентрация  $\text{HbCO} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) практически не повлиял на скорость окисления  $\text{HbCO}$ . Его тетраэтил-гомолог оказал незначительный ускоряющий эффект, а тетрабутиламмонийбромид уже в концентрации 0,01 M увеличил скорость окисления  $\text{HbCO}$  приблизительно в два раза.

Измерена кинетика автоокисления  $\text{HbO}_2$  в щелочной среде в присутствии нескольких стабильных нитроксильных радикалов пиперидинового ряда [67]. Кинетические данные позволили оценить способность этих соединений взаимодействовать с  $\text{HbO}_2$ . Ускорение автоокисления  $\text{HbO}_2$  рассматривалась как мера конформационных изменений глубина в присутствии различных количеств стабильных радикалов вплоть до мольного отношения радикал : гем = 10 : 1. При  $\text{pH} = 10,75$  установлено, что широко используемые в методе спинового зонда 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил и его 4-оксо- и 4-гидроксизамещенные производные при максимальных используемых концентрациях увеличивают скорость автоокисления  $\text{HbO}_2$  в 1,5—2 раза. Несколько больший эффект (ускорение приблизительно в три раза) оказывает не применявшийся ранее в практике 2,2,6,6-тетраметил-4,4-динитропиперидин-1-оксил. Еще более активным (ускорение приблизительно в пять раз) оказался его 4-хлор-4-нитро-аналог. По-видимому, геминальная хлор-нитро-группировка позволяет этому нитроксилу специфически связываться с определенными полярными центрами молекулы  $\text{HbO}_2$ . При более низких  $\text{pH}$  влияние нитроксилов на кинетику автоокисления  $\text{HbO}_2$  менее значительно.

#### 4. Влияние сульфгидрильных реагентов на автоокисление $\text{HbO}_2$ (и окисление $\text{HbCO}$ )

Известно, что блокирование сульфгидрильных групп гемоглобина ртутьорганическими соединениями и, в частности, *n*-хлормеркурбензоатом (ПХМБ) способствует диссоциации гемоглобина на димеры и мо-

номеры, что может быть использовано для получения изолированных субъединиц гемоглобина [68]. Установлено, что в присутствии избытка ПХМБ степень диссоциации гемоглобина человека на субъединицы зависит от концентрации добавленного  $\text{NaCl}$ , причем диссоциация максимальна при  $0,1\text{--}0,2 \text{ M NaCl}$  [69]. При постоянной концентрации  $\text{NaCl}$  ( $0,2 \text{ M}$ ) в области  $\text{pH } 5,5\text{--}7,5$  диссоциация увеличивается с понижением  $\text{pH}$  и становится полной уже при  $\text{pH } 6$  (при более низких  $\text{pH}$  выпадает осадок). При  $\text{pH } 9\text{--}11$  диссоциация  $\text{HbCO}$  происходит не полностью и уменьшается с ростом  $\text{pH}$ . Электрофоретический анализ показал, что при низких концентрациях ПХМБ изолированные субъединицы не появляются. Небольшие их количества имеются при отношении ПХМБ :  $\text{Hb} = 4 : 1$ , а полное разделение на субъединицы достигается при отношении  $6 : 1$ . На основании этих данных и сравнительных данных с фетальным

гемоглобином делаются следующие выводы: реакция ПХМБ с реактивными SH-группами ( $\beta$ -93) приводит к диссоциации  $\text{HbCO}$  на димеры; реакция с  $\beta$ -112 SH-группами начинается до завершения диссоциации на димеры и конкурирует с реакцией ПХМБ с  $\beta$ -93 SH-группами. Диссоциация на димеры завершается после того как прореагируют обе  $\beta$ -SH-группы. В реакцию с ПХМБ  $\alpha$ -104 SH-группы вступают только после завершения реакции последнего с  $\beta$ -112 SH-группами. Последнее ограничение не обязательно при низких  $\text{pH}$ , например, при  $\text{pH } 4,7$ .

Отмечается [70], что, хотя  $\beta$ -93 SH-группы не вовлекаются непосредственно в кооперативные взаимодействия, расположение этих групп в механически важной области белка делает модифицирование этих групп существенным для состояния и функционирования  $\text{HbO}_2$ . Непосредственно рядом с  $\beta$ -93 SH-группами на поверхности контакта  $\alpha^1\text{--}\beta^2$  находится гистидин  $\beta$ -92 (проксимальный) и аспартил  $\beta$ -94 — остаток, стабилизирующий дезокси-конформацию С-конца и  $\beta$ -цепи за счет образования солевого мостика с боковой цепочкой His  $\beta$ -146. Это взаимодействие непосредственно связано с эффектом Бора и опосредованно с кооперативным механизмом. Имеются сведения [71], что модифицирование  $\beta$ -93 SH-групп рядом производных фенилмеркурхлорида повышает сродство  $\text{Hb}$  к  $\text{O}_2$ . Аналогичный вывод был сделан и для гемоглобина, модифицированного цистамином и диметиловым эфиром цистина в кислой и нейтральной средах [72]. Эффект Бора при этом уменьшался, а форма кривых кислородного равновесия практически не изменялась.

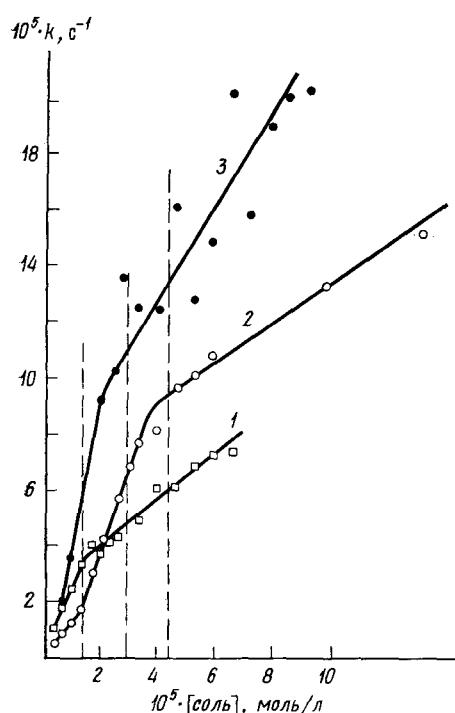


Рис. 7. Зависимость константы скорости окисления  $\text{HbCO}$  в ацетатном буфере  $\text{pH } 4,0$  при  $30^\circ\text{C}$  и  $[\text{HbCO}]_0 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  от концентрации фенилмеркурацетата (1), бензилмеркурацетата (2) и ацетата ртути (3) [74]

формацию С-конца и  $\beta$ -цепи за счет образования солевого мостика с боковой цепочкой His  $\beta$ -146. Это взаимодействие непосредственно связано с эффектом Бора и опосредованно с кооперативным механизмом. Имеются сведения [71], что модифицирование  $\beta$ -93 SH-групп рядом производных фенилмеркурхлорида повышает сродство  $\text{Hb}$  к  $\text{O}_2$ . Аналогичный вывод был сделан и для гемоглобина, модифицированного цистамином и диметиловым эфиром цистина в кислой и нейтральной средах [72]. Эффект Бора при этом уменьшался, а форма кривых кислородного равновесия практически не изменялась.

Обнаружили [73], что спектры поглощения  $\text{Hb}$  при  $\text{pH } 5,5\text{--}5,8$  с добавкой сулемы подобны спектрам ранней стадии денатурации  $\text{Hb}$  (при  $\text{pH } 3$  пик Соре обратимо смешается в область 370—390 нм и заметно теряет интенсивность). Отсюда делается вывод, что  $\text{HgCl}_2$  взаимодействует как с SH-группами, так и с имидазольными остатками белка.

В работе [74] спектрофотометрически (при длине волны 574 нм) измерена кинетика окисления HbCO при pH 4,0 в присутствии фенилмеркурацетата, бензилмеркурацетата, карбометоксимеркурхlorida и ацетата ртути при 30° С. На рис. 7 приведены кривые зависимости константы скорости окисления HbCO от концентрации фенилмеркурацетата, бензилмеркурацетата и ацетата ртути. Для первых двух наблюдается почти линейный рост константы до концентраций реагентов, соответствующих концентрации реактивных сульфидильных групп. Далее для фенилмеркурацетата наклон кривой уменьшается, а для бензилмеркурацетата, напротив, увеличивается. Результаты работы интерпретируются с учетом практически полной диссоциации HbCO на димеры при pH 4,0 [42]. В присутствии бензилмеркурацетата ускорение окисления HbCO после связывания реактивных SH-групп обусловлено более сильным эффектом реакции, приводящей к диссоциации димеров на мономеры. Второй излом на кривой находится в области, где завершается реакция реагента с четырьмя SH-группами HbCO. Отсюда можно заключить, что  $\beta$ -122 SH-группы стехиометрически и достаточно быстро взаимодействуют с бензилмеркурацетатом. Дальнейшее же увеличение концентрации последнего сопровождается более пологим ростом константы скорости: во всей видимости, блокирование  $\beta$ -112 SH-групп не приводит к полной диссоциации димеров и этот процесс завершается только при связывании наименее доступных SH-групп  $\alpha$ -104. Похожая кривая, но с более четкими изломами, получена и для карбометоксимеркурхlorida. В случае фенилмеркурацетата первый излом кривой также свидетельствует о стехиометрическом связывании  $\beta$ -93 SH-групп. Последующее же уменьшение крутизны кривой и отсутствие излома в области, соответствующей четырем SH-группам, позволяет предположить отсутствие селективного взаимодействия фенилмеркурацетата с  $\beta$ -112 SH-группами. Кривая для ацетата ртути (рис. 7), несмотря на значительный разброс результатов, позволяет утверждать, что при учете «двуихвалентности» этой соли эффект ее по величине соизмерим с эффектом «одновалентного» бензилмеркурацетата. При переходе от ацетатного буфера к фосфат — цитратному обнаружен хелатирующий эффект цитрата по отношению к соединениям ртути, ингибирующий их активность. На примере окисления HbCO с добавками бензилмеркурацетата [75] показана существенная роль температуры реакции, влияющей на селективность взаимодействия ртутного реагента с SH-группами разных типов. Так, при повышении температуры реакции от 30 до 39° С при pH 4,0 исчезает излом, характеризующий стехиометрическое селективное связывание реактивных SH-групп, в то время как сохраняется излом в области, соответствующей четырем SH-группам. Вероятно повышение температуры демаскирует при pH 4,0  $\beta$ -112 SH-группы и делает их такими же доступными, как SH-группы  $\beta$ -93. Кроме того, обнаружено, что при температуре 39° С понижение pH в интервале 4,85—4,0 (ацетатный буфер) также приводит к уменьшению селективности взаимодействия бензилмеркурацетата с разными типами SH-групп.

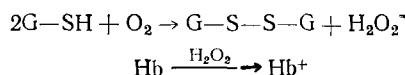
В цитированной выше работе [67] описанным здесь кинетическим способом показано, что новый стабильный радикал 2,2,6,6-тетраметил-4-бром-4-нитропиперидин-1-оксил в щелочных средах селективно связывается с реактивными SH-группами HbO<sub>2</sub>, практически не изменяя скорости автоокисления HbO<sub>2</sub>, но вызывает существенное ускорение автоокисления, связываясь с нереактивными SH-группами HbO<sub>2</sub>. Способ может быть предложен для оценки связываемости и денатурационного эффекта новых спиновых меток.

## 5. Автоокисление HbO<sub>2</sub> в присутствии восстановителей

Известно, что автоокисление HbO<sub>2</sub> может ускоряться в присутствии восстановителей. В качестве последних наиболее часто испытывались фенолы, гидрохинон [76], фенилгидразин [77, 78], анилин [78]. Роль восстановителей в процессе окисления HbO<sub>2</sub> обычно объясняют [76]

передачей восстановителем электрона связанному с гемовым железом кислороду, который одновременно принимает электрон от железа и восстанавливается (после связывания двух протонов) до  $\text{H}_2\text{O}_2$ . При этом полагают, что возможны два основных механизма. Во-первых, восстановитель может взаимодействовать с  $\text{O}_2^-$  уже после его образования, т. е. после переноса электрона железа на кислород. В этом случае ускорение автоокисления  $\text{HbO}_2$  сравнительно невелико. Другой механизм предполагает взаимодействие восстановителя с  $\text{O}_2^-$  в стадии его образования, которая в этом случае является лимитирующей. При этом восстановитель ускоряет именно эту стадию, что дает значительно большее увеличение скорости автоокисления.

Обнаружено [80], что автоокисление  $\text{HbO}_2$  ускоряется и биологическим ускорителем — глутатионом (G). Показано, что образование  $\text{Hb}^+$  в его присутствии обусловлено перекисью водорода. Последняя окисляет  $\text{HbO}_2$  значительно эффективнее, чем глутатион в той же концентрации. Скорость образования  $\text{Hb}^+$  пропорциональна квадрату концентрации глутатиона, что позволило предложить следующую упрощенную схему процесса:



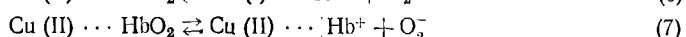
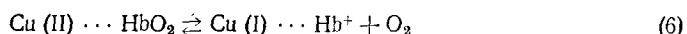
На примере автоокисления  $\text{HbO}_2$  овцы и быка [76] в 0,05 M фосфатном буфере pH 6,8 с добавкой ЭДТА при 37°С изучено влияние гидрохинона и пирокатехина. Установлено, что оба дифенола действуют катализически, т. е. могут быть количественно выделены после завершения окисления  $\text{HbO}_2$ . При десятикратном избытке гидрохинона в первые десять или более секунд наблюдалась задержка реакции, которая устраивалась добавлением небольшого количества *n*-бензохинона. Далее было обнаружено, что в отсутствие гидрохинона хинон реагирует с  $\text{HbO}_2$  стехиометрически. Таким образом, в предлагаемой схеме образовавшийся вначале при окислении гидрохинона хинон окисляет  $\text{HbO}_2$  с отщеплением кислорода. В свою очередь, образующийся семихинон окисляет вторую молекулу  $\text{HbO}_2$ , в результате чего регенерируется хинон. Установлено [81], что окисление хиноном  $\text{HbO}_2$  в фосфатном буфере pH 6,8 осуществляется как реакция второго порядка. Имеется мнение [82], что участвующий в окислении  $\text{HbO}_2$  гидрохинон предварительно включается в лигандное окружение гема, после чего происходит двухэлектронное восстановление  $\text{O}_2$  с одновременным окислением гемового железа и экзогенного лиганда. Образование  $\text{O}_2^-$  в аналогичном процессе окисления  $\text{HbO}_2$  с фенилгидразином доказано косвенным путем: восстановлением в присутствии  $\text{HbO}_2$  и фенилгидразина феррицитохрома и окислением эпинафрина.

Имеются также данные по ускорению окисления гемоглобинов в присутствии аскорбиновой кислоты [83], имидазола [83], гидроксиламина [81], различных аминов и амидов [79].

#### IV. ОКИСЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА РЕАГЕНТАМИ

##### 1. Окисление гемоглобина в присутствии меди(II)

Как уже отмечалось выше (стр. 382), ионы двухвалентной меди оказывают на автоокисление  $\text{HbO}_2$  ускоряющий эффект, значительно превосходящий эффект ионов других металлов [33]. Возникает естественный вопрос, существует ли  $\text{Cu}(\text{II})$  в присутствии  $\text{O}_2$  непосредственно в окислении железа  $\text{HbO}_2$  (уравнение (6)) или влияет на структуру белка (уравнение (7)):



Механизм действия  $\text{Cu}(\text{II})$  подробно изучен в работе [84] с использованием гемоглобина лошади. Показано, что автоокисление очищенно-

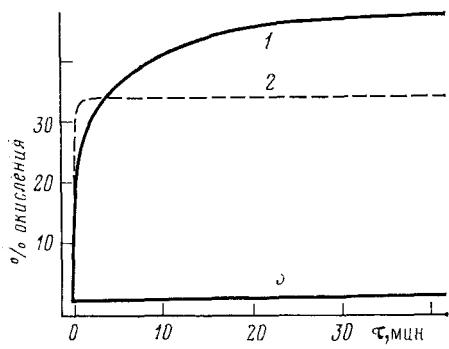


Рис. 8

Рис. 8. Временная зависимость процента окисления  $1,42 \cdot 10^{-4} M$  гемов  $\text{HbO}_2$  (1),  $\text{Hb}$  (2) и  $\text{HbCO}$  (3) лошади (в отсутствие  $\text{O}_2$ ) в бис-трист-буфере ( $\text{pH } 7,0$ ) при  $24^\circ\text{C}$  с добавкой  $5 \cdot 10^{-5} M \text{ Cu(II)}$  [84];  $\tau$  — время

Рис. 9. Кинетические кривые окисления  $\text{HbO}_2$  четырьмя ионами  $\text{Cu(II)}$  на тетramer (1), двумя ионами  $\text{Cu(II)}$  (2) и избытком  $\text{Cu(II)}$  в присутствии иодацетамида (3) [85];  $\tau$  — время

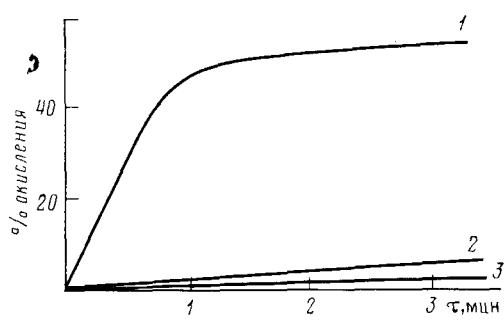
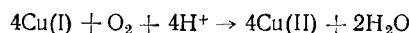


Рис. 9

го  $\text{HbO}_2$  при нормальных  $\text{pH}$  обусловлено главным образом присутствующими в растворе следами  $\text{Cu(II)}$ . Добавление  $10^{-4} M$  ЭДТА к  $7,2 \cdot 10^{-5} M \text{ HbO}_2$  резко тормозит процесс автоокисления. Подсчитано, что в отсутствие ЭДТА ощущимое ускорение автоокисления обеспечивают уже 1—2 иона  $\text{Cu(II)}$  на 1000 гемов (в гемолизате содержится 1,7 иона  $\text{Cu(II)}$  на 1000 гемов). Удаление из системы  $\text{O}_2$  упрощает картину: вся медь быстро количественно восстанавливается гемоглобином, после чего окисления  $\text{Hb}$  больше не происходит (рис. 8). В присутствии  $\text{O}_2$  также имеет место быстрое начальное окисление  $\text{HbO}_2$ , после чего наступает стадия значительно более медленного окисления. Автор полагает, что быстрое окисление  $\text{HbO}_2$  обусловлено непосредственным переносом электрона  $\text{Fe(II)} \rightarrow \text{HbO}_2$  на  $\text{Cu(II)}$ . В медленной стадии осуществляется тот же процесс, но скорость этой стадии лимитируется регенерацией  $\text{Cu(II)}$  из  $\text{Cu(I)}$  по уравнению:



Сравнение кривых на рис. 8 показывает, что скорость стадии быстрого окисления  $\text{HbO}_2$  меньше скорости окисления  $\text{Hb}$ . Это аргумент в пользу предварительной диссоциации  $\text{HbO}_2 \rightleftharpoons \text{Hb} + \text{O}_2$  с переходом  $R$ -формы гемоглобина в  $T$ -форму, которая, судя по всему, более склонна к окислению медью. Хорошим подтверждением этому служит практически полное отсутствие окисления слабо диссоциирующего  $\text{HbCO}$  в тех же условиях. Возникает вопрос, почему  $\text{Cu(II)}$  лучше окисляет  $\text{Hb}$ , чем ионы других металлов, имеющие более высокий окислительный потенциал. Это могло быть объяснено специфическим связыванием  $\text{Cu(II)}$  с  $\text{Hb}$ , облегчающим перенос электрона. Равновесный диализ в  $0,05 M$  трист-буфере  $\text{pH } 7,2$  при отношении  $\text{Cu : гем} = 1 : 2$  показал, что  $\text{Cu(II)}$  связывается с  $\text{Hb}$ , но только с двумя из четырех субъединиц. Это естественным образом объясняет, почему степень окисления  $\text{HbO}_2$  или  $\text{Hb}$  на рис. 8 не превышает 50%.

Последний вывод был подтвержден на примере гемоглобина человека [85]. Как следует из рис. 9, при переходе от двух к четырем ионам  $\text{Cu(II)}$  на тетрамер  $\text{HbO}_2$  происходит резкий скачок скорости быстрой стадии окисления. С другой стороны, эта стадия полностью ингибируется блокированием  $\beta$ -SH-групп иодацетамидом. Таким образом,  $\text{Cu(II)}$  окисляет только  $\beta$ -цепи  $\text{Hb}$  и  $\text{HbO}_2$  человека. Подтверждение этому — обнаруженная инертность  $\text{Cu(II)}$  в отношении изолированных  $\alpha$ -цепей, в то время как изолированные  $\beta$ -цепи (тетрамер  $\beta_4$ ) окислялись очень быстро. Супероксиддисмутаза и каталаза ингибируют медленную ста-

дию окисления  $\text{HbO}_2$ , но не влияют на быструю. Это подтверждает прямое окисление  $\text{HbO}_2$  медью в быстрой стадии и катализическое автоокисление  $\text{HbO}_2$  в медленной стадии, сопровождающееся образованием в системе  $\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Диализ показал, что в  $\text{HbO}_2$  человека имеется четыре центра прочного связывания  $\text{Cu(II)}$ . Кроме того имеется еще несколько (вероятно два) центра слабого связывания  $\text{Cu(II)}$ . Возникло предположение, что первая пара ионов  $\text{Cu(II)}$  связывается с  $\beta$ -93 SH-группами; вторая пара, обеспечивающая быстрое окисление  $\text{HbO}_2$ , связывается с центрами, расположенными около гема, что обеспечивает передачу электрона от  $\text{Fe(II)}$  к  $\text{Cu(II)}$  и образование гемихрома. Вслед за окислением железа гемы окисляются  $\beta$ -93 SH-группы с образованием  $\beta$ -димеров, содержащих дисульфидную связь. Присутствие этих димеров в продукте реакции обнаружено методом гель-электрофореза. Третья пара связанных ионов  $\text{Cu(II)}$ , по мнению авторов, является причиной наблюдаемого в экспериментах выпадения в осадок гемопротеида.

В работе [86] с использованием модифицирования  $\text{HbO}_2$  N-этилмалимидом и сравнение степени связывания  $\text{Cu(II)}$  с различными гемоглобинами (человека, кролика, лошади, овцы и быка) связывание  $\text{Cu(II)}$

с  $\beta$ -93 SH-группами, а также образование  $\beta$ -димеров подтверждено не было. Вместо этого выдвинуто предположение о том, что в случае  $\text{HbO}_2$  человека впервые два иона  $\text{Cu(II)}$  прочно связываются с His  $\beta$ -2 или  $\beta$ -116, расположенными с проксимальной стороны от гема и на достаточно большом от него расстоянии. В то же время эти остатки расположены близко от SH-групп  $\beta$ -93 и модификация последних оказывает влияние на связывание  $\text{Cu(II)}$  с His  $\beta$ -2 или  $\beta$ -116. На рис. 10 приведены для сравнения кривые окисления  $\text{HbO}_2$  лошади и человека в зависимости от концентрации  $\text{Cu(II)}$ . Нечеткий излом кривой для  $\text{HbO}_2$  человека при 0,5 иона  $\text{Cu(II)}$  на гем свидетельствует о конкурентном связывании  $\text{Cu(II)}$  с первой и второй парой центров связывания  $\text{Cu(II)}$ . Предложена схема, включающая отдельные стадии процесса связывания  $\text{Cu(II)}$  и окисления  $\text{HbO}_2$  (схема).

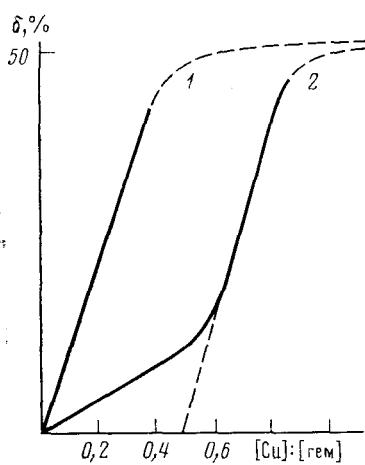
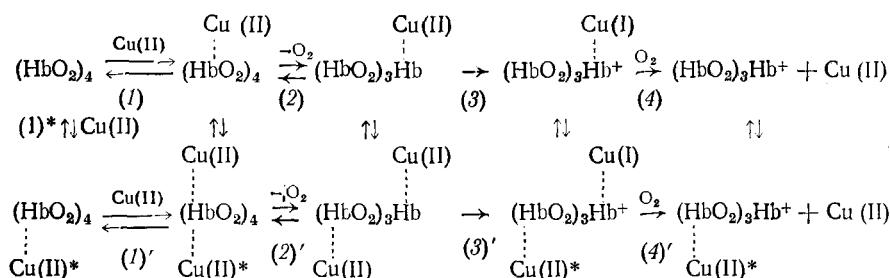


Рис. 10. Зависимость процента окисления  $\text{HbO}_2$ , окислившегося в быстрой стадии ( $\delta$ ), от количества добавленной  $\text{Cu(II)}$  [86]; 1 —  $\text{HbO}_2$  лошади; 2 —  $\text{HbO}_2$  человека

стадии (1')—(4'). Как следует из схемы, в последнем случае в акте окисления гемового железа  $\text{HbO}_2$  может принимать участие и без прочно связанного иона  $\text{Cu(II)}$  (стадии со звездочкой).



Обнаружено [87], что в отличие от  $\text{HbO}_2$  и  $\text{Hb}$  человека и лошади в гемоглобинах овцы  $\text{Cu(II)}$  быстро окисляет гемы не только  $\beta$ -, но и  $\alpha$ -субъединицы. Опыты проводили при  $\text{pH} 6,9$  в отсутствие буфера с целью предотвращения образования комплексов  $\text{Cu(II)}$ , влияющих на механизм

действия этого иона. Рассчитаны энергии активации: 53 (HbO<sub>2</sub>) и 113 кДж/моль (Hb).

Подробнее остановимся на уже упомянутой работе [34], где исследовался механизм окисления меди(II) миоглобина кашалота. Спектрофотометрически (при  $\lambda=542$  нм) определяли начальную скорость окисления MbO<sub>2</sub> по убыли его концентрации. Показано, что в кислой среде кинетика окисления MbO<sub>2</sub> более чувствительна к присутствию Cu(II). Так, изменение отношения MbO<sub>2</sub> : Cu(II) от 1 : 0,125 до 1 : 12 увеличивает скорость реакции при pH 5 в ~45 раз, а при pH 7 только в ~15 раз. Крутизна зависимостей логарифма скорости реакции от 1/T в области температур 10—30° С растет с понижением pH. Авторы объясняют это тем, что взаимодействие Cu(II) с заряженным при низких pH центром связывания Cu(II) His GH1 приводит к локальным изменениям, невыгодным для переноса электрона от гема к этому центру, в то время как повышение температуры устраниет эти трудности. Резкий излом зависимости при 30° С (при температурах 30—40° С зависимости особенно для pH 6 и 7 значительно более пологие) объясняется изменением при этой температуре гидратной оболочки белка. Авторы проводят сравнение механизма автокоисления MbO<sub>2</sub> и окисления MbO<sub>2</sub> медью(II). В первом случае наряду с простым отщеплением O<sub>2</sub><sup>-</sup> предполагается перенос электрона через белок к растворенному в среде O<sub>2</sub> как конечному акцептору. В случае окисления Cu(II) таким акцептором является сама Cu(II). Для переноса электрона на медь необходима делокализация электрона гемового железа, включающая центр предполагаемого связывания Cu(II)—His GH1. Вероятность нахождения электрона в этом центре зависит от степени его протонирования. Аналогичным образом действует катион Cu(II), связываясь с His GH1 — он повышает на гистидине положительный заряд, что увеличивает вероятность попадания туда электрона. Авторы допускают и механизм, в котором Cu(II) является центром связывания растворенного O<sub>2</sub>-акцептора. В этом случае может возникнуть цепь переноса электрона Fe(II)…Cu(II)…O<sub>2</sub> с возрастающим редокс-потенциалом, в результате чего перенос электрона становится термодинамически спонтанным.

## 2. Окисление гемоглобина феррицианидом калия

Окисление гемоглобина и миоглобина феррицианидом калия — обычный способ получения окисленных форм обоих гемопротеидов. Несмотря на это систематических исследований кинетики и механизма этих реакций в химической литературе почти нет. Поэтому целесообразно остановиться в основном на одной работе Антонини с соавтором. [88], в которой исследованы оба названных гемопротеида человека. Показано, что наиболее простая система — Mb реагирует с феррицианидом строго по второму порядку. При pH 6 (0,1 M фосфатный буфер)  $\Delta H^\ddagger=4$  ккал/моль, а при pH 9,2 (боратный буфер) — 0 ккал/моль. Полагают, что MbO<sub>2</sub> взаимодействует с феррицианидом только после диссоциации MbO<sub>2</sub> ⇌ Mb + O<sub>2</sub>. В этом случае скорость окисления MbO<sub>2</sub> должна определяться либо скоростью его диссоциации на Mb и O<sub>2</sub>, либо скоростью взаимодействия Mb с O<sub>2</sub> и феррицианидом. При pH 6 обнаружена линейная зависимость обратной величины константы скорости от концентрации O<sub>2</sub> в растворе — это указывает на то, что лимитирующей стадией процесса является диссоциация MbO<sub>2</sub>. Однако при pH 9,2 линейность упомянутой выше зависимости не выдерживается, что свидетельствует об отклонении механизма процесса при pH 9,2 от простой диссоциационной схемы. Влияние pH на реакцию авторы объясняют действием pH не на MbO<sub>2</sub>, а на феррицианид, основываясь на том, что влияние pH не было обнаружено в реакциях лигандного замещения в MbO<sub>2</sub> (например, с CO), которые имеют много сходства с реакцией с феррицианидом.

При взаимодействии избытка феррицианида с Hb константа скорости первого порядка линейно изменялась в процессе реакции: при pH 9,2 она возрастила в 1,5 раза, а при pH 6,45 вдвое уменьшалась, что объяс-

няется неравнозначностью  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей в Hb. Повышение pH от 6,0 до 9,2 на порядок уменьшало начальную скорость реакции. При этом во всех случаях скорость окисления Hb оставалась в ~100 раз меньше скорости окисления Mb. Существенно установление факта, что феррицианид не окисляет сульфогидрильные группы в Hb: добавки ЭДТА, ингибирующие окисление этих групп, не меняли скорость реакции.

Для реакции феррицианида с  $\text{HbO}_2$ , так же как и с  $\text{MbO}_2$ , предполагается необходимость предварительной диссоциации на Hb и  $\text{O}_2$ , что было подтверждено также ростом скорости окисления  $\text{HbO}_2$  при понижении парциального давления  $\text{O}_2$  в смеси при pH 6,1 и 9,1 ( $18^\circ\text{C}$ ,  $[\text{HbO}_2]_0 = 10^{-5} M$ ,  $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]_0 = 5 \cdot 10^{-3} M$ ).

Имеются данные относительно продуктов окисления феррицианидом Hb лошади [89]. Методом изоэлектрического фокусирования установлено, что преимущественно окисляются  $\beta$ -цепи. Однако снижение ионной силы раствора (до 0,001 M фосфата) ускоряет окисление  $\alpha$ -цепей. В то же время добавки инозитгексафосфата,  $\text{Cl}^-$  и фосфат-аниона усиливают окисление  $\beta$ -цепей.

### 3. Окисление гемоглобина нитритом

Окислению гемоглобина нитритом посвящено значительно больше специальных исследований, чем окислению феррицианидом. По-видимому, это обусловлено тем, что при современных гигиенических условиях отравления нитритом не являются редкостью. Особенно часто нитрит попадает в пищу с водой, в источники которой нитрит в свою очередь попадает из почвы [90].

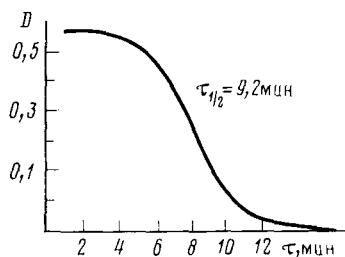
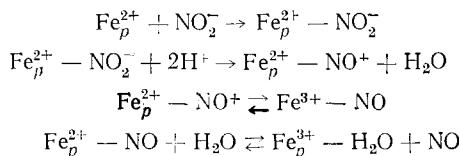


Рис. 11. Кинетическая кривая окисления  $\text{HbO}_2$  нитритом;  $[\text{HbO}_2]_0 = 1,8 \cdot 10^{-5} M$ ,  $[\text{NaNO}_2]_0 = 1,45 \cdot 10^{-3} M$ ; 0,05 M бис-триц-буфер pH 7,0 с 0,1 M NaCl при  $25^\circ\text{C}$  [100]; D — оптическая плотность при 578 нм

Если механизм реакции гомопротеидов с феррицианидом относительно несложен и по крайней мере постоянен в процессе одной и той же реакции, то сказать то же о реакции гомопротеидов с нитритом нельзя. Наиболее существенной особенностью реакции  $\text{HbO}_2$  с нитритом является ее автокаталитический характер: кинетическая кривая имеет S-образную форму (рис. 11). Обнаружено [91], что скорость окисления нитритом  $\text{HbO}_2$  человека пропорциональна  $[\text{NaNO}_2]^{1/4}$ . Этот порядок целиком определяется строением белка, так как в случае  $\text{HbO}_2$  крысы порядок по нитриту составляет 3—4. Учитывая, что понижение pH от 7,5 до 5,5 вызывает линейное падение логарифма периода полуреакции, т. е. что скорость реакции возрастает с увеличением активности протонов, авторы делают предположение о том, что скорость реакции зависит от концентрации недиссоциированной  $\text{HNO}_2$ . Авторы при этом не учитывают, что увеличение кислотности среды всегда способствует денатурационным процессам, ускоряющим, в частности, окисление  $\text{HbO}_2$ . Тем не менее реальность повышения концентрации  $\text{HNO}_2$  при снижении pH до 5,5 следует предусмотреть, обсуждая возможные механизмы процесса ( $\text{HNO}_2$  например, может служить источником NO). Далее авторы работы [91] детально обсуждают вероятность участия тех или иных компонентов системы в автокатализе. Специальными опытами показано, что  $\text{Hb}^+$  не оказывает влияния на скорость реакции — следовательно, не может быть автокатализатором. То же самое было установлено и для возможных продуктов распада азотистой кислоты, а также для нитрата. Возможно, что автокаталитический характер реакции обусловлен накап-

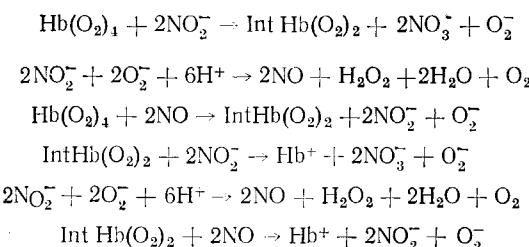
ливающейся в системе перекисью водорода, которая, как было обнаружено, сокращает индукционный период. Однако инертность  $\text{H}_2\text{O}_2$  в последующих стадиях реакции, дала авторам основание усомниться в автокаталитическом эффекте  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Продолжением работы [91] является изучение образования метгемоглобина *in vivo* путем введения собакам и крысам сублетальных количеств  $\text{NaNO}_2$  [90]. После введения собакам перорально до 20 мг  $\text{NaNO}_2$  на 1 кг веса наблюдали увеличение концентрации  $\text{Hb}^+$  в крови животных в течение ~30 мин до 25%-ной концентрации с последующим медленным падением. Параллельно с этим с помощью ЭПР обнаружили, что в начальной стадии процесса интоксикации быстро нарастает концентрация  $\text{HbNO}$ , которая через 10 мин достигает 2% и затем относительно быстро падает. Авторы объясняют появление  $\text{HbNO}$  восстановлением образующегося при интоксикации нестойкого комплекса  $\text{Hb}^+\text{NO}$  редуктазными системами. Возможность образования  $\text{Hb}^+\text{NO}$  позволила авторам предложить следующую схему окисления гемоглобина нитритом:

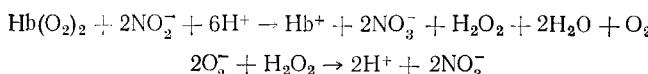


Вторая стадия объясняет обнаруженную в работе [91] pH-зависимость окисления  $\text{HbO}_2$  нитритом. Стадия 3, являющаяся, вообще говоря, фикцией, поскольку она фактически указывает лишь на наличие двух резонансных структур с  $\text{Fe}(\text{II})$  и  $\text{Fe}(\text{III})$  формально демонстрирует механизм окисления железа, которое (окисление) фиксируется после замещения лиганда  $\text{NO}$  в  $\text{Fe}_p^{3+}-\text{NO}$  водой.

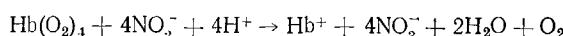
Более развернутый механизм окисления  $\text{HbO}_2$  нитритом предлагается в работе [92]. Учитывая, что нитрит (так же как дитионит) является восстановителем  $\text{O}_2$ , авторы предложили, что нитрит взаимодействует со связанным железом  $\text{O}_2$  и генерирует  $\text{O}_2^-$ . Эксперимент подтвердил эту гипотезу: введение экзогенного  $\text{O}_2^-$  в систему укорачивало индукционный период окисления, а добавка супероксиддисмутазы продлевала его. Методом изоэлектрофокусирования частично окисленного  $\text{HbO}_2$  обнаружили присутствие  $(\alpha^0\beta^+)_2$  и  $(\alpha^+\beta^0)_2$ . С учетом последних схема процесса выглядит следующим образом [Int  $\text{Hb}(\text{O}_2)_2$  — наполовину окисленные варианты  $\text{HbO}_2$ ]:



Таким образом:



или в общем итоге:



Особый интерес у исследователей вызывает конечный продукт окисления гемоглобина нитритом. Отмечалось [93], что хотя спектры поглощения растворов  $\text{Hb}^+$ , образующихся при окислении  $\text{HbO}_2$  нитритом и феррицианидом, имеют одинаковый максимум при 630 нм, в других областях спектра они значительно различаются. Основное отличие нитритного  $\text{Hb}^+$  — наличие отчетливого максимума при 540 нм. Феррицианид-

ный  $\text{Hb}^+$  имеет максимум при 504 нм. Специфические спектральные характеристики нитритного  $\text{Hb}^+$  заставили предположить [94], что нитрит, окисляя железо гема, наряду с этим необратимо реагирует с белком или порфирином. При этом утверждалось, что названные реакции не вызывают существенных нарушений структуры  $\text{Hb}^+$ . В качестве доказательства необратимости реакции  $\text{HbO}_2$  с нитритом проведен следующий эксперимент: не обработанный предварительно нитритом  $\text{Hb}^+$  введен в реакцию с  $\text{NaNO}_2$ , в процессе чего  $\text{NO}_2^-$  связывался с  $\text{Hb}^+$  сигмоидно; после диализа лигандированного продукта его вновь обрабатывали нитритом, в процессе чего  $\text{NO}_2^-$  связывался уже по гиперболе. Применение ЭПР метода [95] позволило установить парамагнитную природу промежуточных соединений окисления  $\text{HbO}_2$  нитритом. Образование парамагнитных центров с  $g=2,005$ , так же как и само окисление, характеризовалось наличием индукционного периода и ускорялось с увеличением концентрации нитрита и понижением рН. Максимум ЭПР сигнала соответствовал излому на кривой образования  $\text{Hb}^+$ . Детектируемый ЭПР сигнал характеризует парамагнитные центры, обладающие автокаталитической активностью и не связанные непосредственно с  $\text{NO}$ . Однако в недавно опубликованной работе [96] утверждается, что интенсивный диализ растворов  $\text{Hb}^+$ , полученных окислением  $\text{HbO}_2$  и  $\text{Hb}$  нитритом и феррицианидом, привел к устраниению спектральных различий между  $\text{Hb}^+$  разного происхождения. Это позволило автору работы считать конформации  $\text{Hb}^+$  в обоих случаях идентичными, что исключает предположение об окислении белка или порфиринового фрагмента при том или другом способе окисления гемоглобина. Любопытно, что вопрос о неидентичности нитритного и феррицианидного  $\text{Hb}^+$ , связанный с их якобы различной скоростью восстановления аскорбиновой кислотой [97], опровергался еще в 1943 г. [98] после опытов с применением 24-часового диализа феррицианидного  $\text{Hb}^+$ , содержащего перед диализом остатки ферроцианида калия, ускоряющего восстановление  $\text{Hb}^+$ .

Если феррицианид, как отмечалось выше [88], окисляет  $\text{Hb}$  быстрее, чем  $\text{HbO}_2$ , то при реакции с нитритом картина обратная:  $\text{Hb}$  не окисляется нитритом вообще [99]. Возникает, естественно, идея о том, что аллостерические эффекторы, понижающие сродство  $\text{Hb}$  к  $\text{O}_2$  должны ингибировать окисление  $\text{HbO}_2$  нитритом. Это предположение подтвердилось в опытах с использованием добавок инозитгексафосфата [100]. Последний практически устранил быструю fazу процесса, следующую вслед за индукционным периодом. Механизм действия инозитгексафосфата, предполагающий переход  $R$ -конформации гемоглобина в  $T$ -конформацию, хорошо подтверждался ускоряющим влиянием этого эффектора на окисление  $\text{HbO}_2$  феррицианидом. Однако позднее появились данные [101], свидетельствующие о том, что другие сильные аллостерические эффекторы (ДФГ, НАДФ, АТФ) в двух- и пятимольном избытке не влияют на скорость окисления  $\text{Hb}$  нитритом. Сделан вывод, что обнаруженный ранее эффект инозитгексафосфата обусловлен не  $R \rightarrow T$  переходом, а каким-то иным фактором.

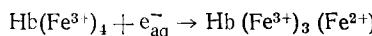
Особую роль в процессе окисления  $\text{HbO}_2$  нитритом играют реактивные SH-группы [101]. Установлено, что блокирование этих групп иодacetамидом снижает ингибирующий эффект инозитгексафосфата для  $\text{HbO}_2$ , но не вносит изменений в случае  $\text{Hb}$ .

#### V. ОКИСЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ОБЛУЧЕНИЯ

В 1927 г. Фрайк и Петерсон [102] показали, что при радиолизе растворов  $\text{HbO}_2$  последний подвергается частичному окислению. Действию ионизирующего излучения на гемопротеиды посвящен ряд работ Манойлова, которому принадлежит обзор [103], где, в частности, обсуждены работы автора и других исследователей, посвященные окислению гемоглобина под действием облучения. Учитывая наличие этого обзора, а также обзора Стародуба с соавт. [104], кратко остановимся лишь на некоторых работах, дающих представление о названной области исследования и основных достигнутых результатах.

Для понимания причин окисления гемоглобина существенно знание различных характеристических изменений, происходящих при облучении его растворов. Обнаружено, в частности, снижение редокс-потенциала гемоглобина человека в процессе  $\gamma$ -облучения [105]. При дозе 10—100 крад изменения редокс-потенциала незначительны. При 500 крад потенциал падает на 10 мВ, при 4,75 Мрад — на 45 мВ. Окисление  $\text{HbO}_2$  при  $\gamma$ -облучении его растворов при дозах выше 1 Мрад сопровождается изменением коэффициента седиментации и вязкости раствора [106]. При дозах выше 4—5 Мрад отмечено появление гемохромогена. В процессе облучения у значительной части молекул гемоглобина повышается сродство к  $\text{O}_2$  и ослабление гем — гем взаимодействий. Эти факты, как мы уже сообщали выше [30], характеризуют появление в растворе частично окисленных форм гемоглобина.

$\gamma$ -Облучение из окисляющего гемовое железо фактора может стать фактором восстанавливающим при облучении растворов  $\text{Hb}^+$ . В качестве первичного восстанавливающего агента предлагается сольватированный электрон [107, 108]:



Восстановление  $\text{Hb}^+$  имеет место также при  $\gamma$ -облучении замороженных его растворов при 77 К [109]. Отличие оптических спектров восстановленного  $\text{Hb}^+$  от спектра обычного  $\text{Hb}$  дало основание предположить образование при восстановлении не типичного для  $\text{Hb}$  активного центра в низкоспиновом состоянии.

Обнаруженные при  $\gamma$ -облучении растворов гемоглобина эффекты в значительной степени характерны и для рентгеновского облучения. Отмечается [110], что стадии собственно окисления гемоглобина предшествует стадия отрыва  $\text{O}_2$  от  $\text{HbO}_2$ . Образующаяся дезоксиформа подобна известному продукту фотодиссоциации  $\text{HbO}_2$ . Возникающий при облучении  $\text{Hb}^+$  находится в высокоспиновом состоянии. При дозе облучения 10—100 крад отмечено падение редокс-потенциала [111].

Окисление гемоглобина имеет место также и при фотооблучении. При действии на водный раствор  $\text{HbO}_2$  мыши при 20—50°С и рН 6,0 УФ-светом лампы ПРК-4 степень окисления гемоглобина возрастает с дозой облучения [112]. В анаэробных условиях окисление не происходило. Полагают, что окислению предшествует разрыв связи гем — гемоглобин.

Поражение гемоглобина при облучениях, таким образом, может быть одним из звеньев общей лучевой патологии животного организма [103].

---

В процессе подготовки настоящей статьи к печати вышли в свет работы по автоокислению гемоглобинов и миоглобинов [113—115], по окислению  $\text{HbO}_2$  фенилгидразином [116] и нитрофурантоином [117], окислению гемоглобинов нитритами [118—121], а также по окислению сульфогемоглобина феррицианидом [122].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Eder H. A., Finch C., McKee R. W. J. Clin. Invest., 1949, v. 28, p. 265.
2. Keilin D., Hartree E. F. Nature, 1954, v. 173, p. 728.
3. Кушаковский М. С. В кн.: Клинические формы повреждения гемоглобина. Л.: Медицина, 1968, с. 138.
4. Шаронов Ю. А., Шаронова Н. А. Молекулярн. биология, 1975, т. 9, с. 415.
5. Pauling L. Nature, 1964, v. 203, p. 182.
6. Weiss J. Ibid., 1964, v. 202, p. 83.
7. Duff L., Appelman E. H., Shriner D. F., Klotz I. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1979, v. 90, p. 1098.
8. Viale R. O., Maggiora G. M., Ingram L. L. Nature, 1964, v. 203, p. 183.
9. Wittenberg J., Wittenberg B. A., Peisach J., Blumberg W. E. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1970, v. 67, p. 1846.
10. Spiro T. G., Strecas T. C. J. Amer. Chem. Soc., 1974, v. 96, p. 338.
11. Koster A. S. J. Chem. Phys., 1972, v. 56, p. 3161.
12. Rimai L., Salmen I., Petering D. M. Biochemistry, 1975, v. 14, p. 378.
13. Politzer P. Biochim. Biophys. Acta, 1968, v. 153, p. 799.

14. Halton M. P. *Theor. Chim. Acta*, 1972, v. 24, p. 89.
15. Reed C. A., Cheung S. K. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1977, v. 74, p. 1780.
16. Olafson B. D., Goddard W. A. *Ibid.*, 1977, v. 74, p. 1815.
17. Krishner R. F., Loew G. H. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1977, v. 99, p. 4639.
18. Cianchi L., Mancini M., Spina G., Cappelletti R. J. *Theor. Biol.*, 1977, v. 67, p. 757.
19. Goddard W. A., Olafson B. D. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975, v. 72, p. 2335.
20. Штамм Е. В., Пурмаль А. П., Скурлатов Ю. И. *Биофизика*, 1970, т. 15, с. 1122.
21. Mansouri A., Winterhalter K. *Biochemistry*, 1973, v. 12, p. 4946.
22. Wallace W. J., Maxwell J. C., Caughey W. S. *FEBS Letters*, 1974, v. 43, p. 33.
23. Wallace W. J., Maxwell J. C., Caughey W. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 57, p. 1104.
24. Bursaux E., Poyart C. *Biochimie*, 1981, v. 63, p. III.
25. Misra H. P., Fridovich I. J. *Biol. Chem.*, 1972, v. 247, p. 6960.
26. Winterbourne G. C., McGrath B. M., Carrell R. W. *Biochem. J.*, 1976, v. 155, p. 493.
27. Linch R. E., Lee G. R., Cartwright G. E. J. *Biol. Chem.*, 1976, v. 251, p. 1015.
28. Sutton H. C., Roberts P. B., Winterbourne G. C. *Biochem. J.*, 1976, v. 155, p. 503.
29. Tomoda A., Yonegawa Y., Tsujii A. *Ibid.*, 1981, v. 195, p. 485.
30. Андреева А. П., Дмитриева М. Г., Левина А. А., Цибульская Л. М., Казанец Е. Г., Токарев Ю. Н. *Докл. АН СССР*, 1977, т. 235, с. 1441.
31. Banerjee R., Cassoly R. J. *Molec. Biol.*, 1969, v. 42, p. 351.
32. Furlan M., Bachofen H. *Experientia*, 1976, v. 32, p. 113.
33. Salvati A. M., Ambrogioni M. T., Tentori L. *Ital. J. Biochem.*, 1969, v. 18, p. 1.
34. Shyder H. E., Skrdlant H. B. *J. Food. Sci.*, 1966, v. 31, p. 468.
35. Христова П. К., Девенджиев Я. Д., Атанасов Б. П., Волькенштейн М. В. *Молекулярн. биология*, 1980, т. 14, с. 1088.
36. Kikagawa K., Sasahara T., Sasaki T., Karichi T. *Chem. and Pharm. Bull.*, 1981, v. 21, p. 1382.
37. Brown W. D., Mebin L. B. *J. Biol. Chem.*, 1969, v. 244, p. 6696.
38. Banerjee R., Stetzkowski F. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, v. 221, p. 636.
39. Блюменфельд Л. А. В кн.: Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода. М.: Сов. наука, 1957, с. 72.
40. Пратт Дж. В кн.: Методы и достижения в бионеорганической химии. М.: Мир, 1978, с. 133.
41. George P. In: *Oxidases and related Redox Systems*/Eds. T. E. King, H. S. Mason, M. Morrison. New York: Wiley, 1965, p. 3.
42. Katz S., Beall J. A., Crissman J. K. *Biochemistry*, 1973, v. 12, p. 4180.
43. Geddes R., Steinhardt J. J. *Biol. Chem.*, 1968, v. 243, p. 6056.
44. Allis J. W., Steinhardt J. *Biochemistry*, 1969, v. 8, p. 5075.
45. Allis J. W., Steinhardt J. *Ibid.*, 1970, v. 9, p. 2286.
46. McGrath W. P., Steinhardt J. *Ibid.*, 1971, v. 10, p. 1629.
47. Мышкин А. Е., Чудинова Г. К. *Ж. общ. химии*, 1981, т. 51, с. 2611.
48. Мышкин А. Е., Чудинова Г. К. Там же, 1981, т. 51, с. 2618.
49. Tumita S., Enoki Y., Ochiai T., Kawase M., Okuda T. J. *Molec. Biol.*, 1973, v. 73, p. 261.
50. Valdes R., Ackers C. K. *J. Biol. Chem.*, 1977, v. 252, p. 74.
51. Tainsky H., Edelstein S. J. J. *Molec. Biol.*, 1973, v. 75, p. 735.
52. Guidotti G., Konigsberg W., Craig L. C. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1963, v. 450, p. 774.
53. Sharonova N. A., Sharonov Yu. A., Volkenstein M. V. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, v. 271, p. 65.
54. Herskowitz T. T., Cavanagh S. M., San George R. C. *Biochemistry*, 1977, v. 16, p. 5795.
55. Мышкин А. Е., Чудинова Г. К. *Ж. общ. химии*, 1982, с. 2347.
56. Cassat J., Steinhardt J. *Biochemistry*, 1971, v. 10, p. 264.
57. Христова П. К., Атанасов Б. П. *Молекулярн. биология*, 1980, т. 14, с. 86.
58. Perutz M. F. *Nature*, 1974, v. 247, p. 341.
59. Мышкин А. Е., Чубриков В. М., Пирузян Л. А. *Ж. общ. химии*, 1976, т. 46, с. 184.
60. Gottilieb A. J., Robinson E. A., Itano H. A. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, v. 118, p. 693.
61. Lumry R., Eyring M. *J. Phys. Chem.*, 1954, v. 58, p. 110.
62. Posner A. M. *J. Chem. Soc. Trans. I. Faraday*, 1953, v. 49, p. 382.
63. Huffman R. E., Davidson N. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1956, v. 78, p. 4836.
64. Мышкин А. Е., *Ж. общ. химии*, 1978, т. 48, с. 691.
65. Мышкин А. Е., Чубриков В. М., Пирузян Л. А. Там же, 1975, т. 45, 1624.
66. Мышкин А. Е. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1980, с. 302.
67. Мышкин А. Е., Коняева В. С. *Ж. общ. химии*, 1983, т. 53, с. 2131.
68. Rossi-Fanelli M. R., Chiancone E., Spagnubo C., Antonini E., Wyman J. *Soc. Ital. Biophys. Biol. Mol.*, 1969, p. 39.
69. Rosemeyer M. A., Huehns E. R. *J. Molec. Biol.*, 1967, v. 25, p. 253.
70. Huestis W. H., Raftery M. A. *Biochemistry*, 1975, v. 14, p. 1886.
71. Giardina B., Binotti I., Amiconi G., Antonini E., Brunori M., McMurray C. H. *Europ. J. Biochem.*, 1971, v. 22, p. 327.
72. Antonini E., Ioppolo C., Giardina B., Brunori M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, v. 74, p. 1647.
73. Resnik R. A. *Nature*, 1964, v. 203, p. 880.
74. Мышкин А. Е., Аппенянский А. И. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1977, с. 297.

75. Мышкин А. Е., Анисянский А. И. Там же, 1980, с. 617.
76. Augusto O., Gilento G. Arch. Biochem. Biophys., 1975, v. 168, p. 549.
77. Goldberg B., Stern A., Peisach J. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, p. 3045.
78. Goldberg B., Stern A. Ibid., 1975, v. 250, p. 2401.
79. McLean S., Murphy B. P., Starmer G. A., Thomas J. T. J. Pharmac. and Pharmacol., 1967, v. 19, p. 146.
80. Eyer P., Hertle M., Klein G. Mol. Pharmacol., 1975, v. 11, p. 326.
81. Горн Л. Э. Молекулярная биология, 1968, т. 2, с. 688.
82. Eaton D. R., Wilson K. M. J. Inorg. Biochem., 1979, v. 10, p. 195.
83. Harvey J. W., Kaneko J. J. Brit. J. Haematol., 1976, v. 32, p. 193.
84. Rifkind J. M. Biochemistry, 1974, v. 13, p. 2475.
85. Winterbourne C. C., Carrell R. W. Biochem. J., 1977, v. 165, p. 141.
86. Rifkind J. M., Lauer L. D., Chiang S. C., Li N. C. Biochemistry, 1976, v. 15, p. 5337.
87. Brittain T., Ivanetich K. M. J. Inorg. Biochem., 1980, v. 13, p. 223.
88. Antonini E., Brunori M., Wyman J. Biochemistry, 1965, v. 4, p. 545.
89. Tomoda A., Yoneyama Y. Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 581, p. 128.
90. Rein H., Ristau O., Kupfer E., Jung F. Folia Haematol., 1968, v. 90, p. 176.
91. Jung F., Kahl R. Acta biol. et med. german., 1967, B. 19, S. 853.
92. Tomoda A., Tsuji A., Yoneyama Y. Biochem. J., 1981, v. 193, p. 169.
93. Theil G. B., Auer J. E. Clin. Chem., 1967, v. 13, p. 1010...
94. Uchida M., Klapper M. M. Biochim. Biophys. Acta, 1970, v. 221, p. 640.
95. Yung F., Lassmann G., Ebert B. Stud. Biophys., 1981, v. 85, p. 139.
96. Mansouri A. Experientia, 1981, v. 37, p. 1199.
97. Vestling C. S. J. Biol. Chem., 1942, v. 143, p. 439.
98. Gibson Q. H. Biochem. J., 1943, v. 37, p. 615.
99. Kakizaki T., Sato M., Hasegawa H. Ind. Health., 1964, v. 2, p. 124.
100. Tomoda A., Matsukawa S., Takeshita M., Yoneyama Y. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, v. 74, p. 1469.
101. Mansouri A. Ibid., 1979, v. 89, p. 441.
102. Fricke H., Peterson H. Amer. J. Roentgenol., 1927, v. 1, p. 611.
103. Манойлов Ю. С. В кн.: Проблемы энергетики в облученном организме, т. 6. М.: Атомиздат, 1977, с. 10.
104. Стародуб Н. Ф., Рекун Г. М., Шурьян И. М. Радиационное поражение гемоглобина. Киев: Наукова думка, 1976.
105. Leyko W., Puchala M., Szweda-Lewandowska Z. Bioelectrochem. and Bioenerg., 1974, v. 1, p. 118.
106. Szweda-Lewandowska Z., Puchala M., Leyko W. Pediatr. Res., 1976, v. 65, p. 50.
107. Clement J. R., Lee N. T., Klapper M. H., Dorfman L. M. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, p. 2077.
108. Raap A., Lecumen J. W., Rollema H. S., Bruin S. H. Europ. J. Biochem., 1978, v. 88, p. 555.
109. Blumenfeld L. A., Davydov R. M., Magonov S. N., Vilu R. O. FEBS Letters, 1977, v. 49, p. 246.
110. Kellerschohn C., Rimbert J. N., Chevalier A., Hubert C. J. physiol (France), 1976, p. 185.
111. Leyko W., Wiskowska H., Puchala M. Experientia Suppl., 1971, v. 18, p. 407.
112. Артиков В. Г., Шмелев В. Л. Биофизика, 1973, т. 18, с. 497.
113. Wallace W. J., Houtchens R. A., Maxwell J. K., Caughey W. S. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, p. 4966.
114. Wallace W. J., Houtchens R. A., Maxwell J. K., Caughey W. S. Ibid., 1982, v. 257, p. 4977.
115. Itano H. A., Matteson J. L. Biochemistry, 1982, v. 21, p. 2421.
116. Dershawitz M., Nowak R. F. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, p. 75.
117. Doyle M. P., Pickering R. A., De Weert T. M., Hoexstra J. W., Pater D. Ibid., 1981, v. 256, p. 12393.
118. Doyle M. P., Le Poire D. M., Pickering R. A. Ibid., 1981, v. 256, p. 12399.
119. Эбергт Б., Юнг Ф., Лассман Г. Stud. Biophys., 1982, v. 89, p. 65.
120. Doyle M. P., Pickering R. A., Dykstra R. L., Nelson C. L., Boyer R. Z. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982, v. 105, p. 127.
121. Brittain T., Greenwood C., Barber D. Biochim. Biophys. Acta, 1982, v. 705, p. 26.

Институт химической физики  
Академии наук СССР, Москва