

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА И АССОЦИИРОВАННЫЙ С ДИАБЕТОМ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС: РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ГЛИКОГЕМОГЛОБИНА

*Н.Т. Сарасвати², А.С. Дроздов¹, В.Э. Сяхович¹, С.Б. Бокуть¹,
Д. Морас², М. Руфф²*

¹*Минск, УО «МГЭУ им. А. Д. Сахарова»*

²*Франция, Иллкириш, Институт гететики, молекулярной
и клеточной биологии*

В настоящее время сахарный диабет рассматривают как одно из наиболее распространенных заболеваний, являющееся причиной преждевременной смерти во многих странах мира и сопровождающееся осложнениями, затрагивающими практически все системы организма человека [1-5].

Весьма характерным последствием гипергликемии при сахарном диабете является интенсификация реакций неферментативного гликозилирования белков *in vivo*, которые представляют собой наиболее общий процесс пост-трансляционной модификации данных макромолекул, затрагивающий, в том числе и основную форму гемоглобина (HbA₁) [6].

Настоящая работа посвящена установлению структуры минорной гликозилированной формы гемоглобина человека (HbA_{1C}) с помощью рентгеноструктурного анализа, что может позволить не только прямо охарактеризовать сайты углеводной модификации в составе тетрамеров данной гликоформы гемоглобина, обосновать структурно-функциональные взаимосвязи, но и попытаться дать объяснение причин возникновения ряда осложнений при сахарном диабете, в частности, обеспечить выявление особенностей транспорта кислорода у больных диабетом.

Материалы и методы. Подробное описание процедур очистки, кристаллизации, сбора данных и их обработки описано нами ранее [7]. Кратко, получение HbA_{1C} осуществляли посредством инкубации очищенного до гомогенного состояния HbA₁ с глюкозой. Кристаллы HbA_{1C} в оксиформе были получены методом hanging-drop из раствора оксигемоглобина A_{1C}. Сбор данных был проведен при 120К с использованием синхротронного источника рентгеновского излучения (Swiss Light Source, Виллинген, Швейцария). Полученные данные были обработаны с помощью специализированных программ: DENZO, SCALEPACK, «O», AmoRe, CNS, CCP4 и PROCHECK [8-13].

Результаты и обсуждение. Анализ полученных структур модифицированного гемоглобина (2,5 тетрамера в асимметрической ячейке) показал, что в то время как первый и третий тетрамеры находятся в альтернативном лигандированном состоянии R₂, структура второго – наиболее близка к классическому R-состоянию гемоглобина.

Каждый конформер содержал ковалентно связанные продукты Амадори. Обнаружение не описанной ранее модификации ε-аминогрупп Lys99 α₁-субъединиц фруктозамином позволяет характеризовать α-Lys-99 как но-

вый сайт модификации данного гемопротейда глюкозой. Сопоставление структуры гемоглобина в Т-конформации со структурой гликозилированного тетрамера в R2-конформации, содержащего молекулу глюкозы в «switch» регионе и ковалентно связанный продукт Амадори показало, что присутствие последнего создает стерическое препятствие перемещению G-спирали в положение, характерное для Т-конформации тетрамера (рис. 1).

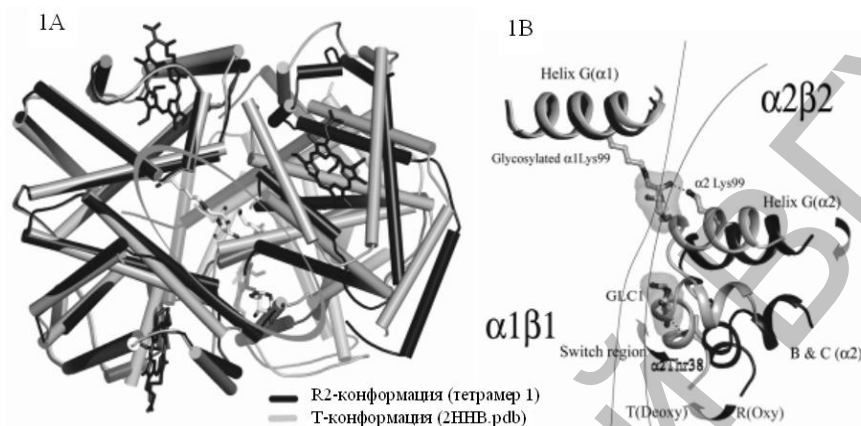


Рис. 1. Сопоставление структуры гликозилированного гемоглобина в R2-состоянии (показано темным цветом) и дезоксигемоглобина в Т-состоянии (2HNB) (показано светлым цветом) (1А). Зона, выделенная светлым эллипсом (1А) показана на вставке (1В). 1В: Указаны модифицированные остатки $\alpha 1\text{Lys}99$ и $\alpha 2\text{Lys}99$, продукт Амадори и Glc1. Структурный переход из R2-состояния в Т-состояние стерически затруднен в присутствии продукта Амадори и молекулы Glc1, как показано на рисунке 1В.

Вызываемое гликозилированием увеличение времени жизни оксигенированного состояния гемоглобина в свою очередь увеличивает вероятность нуклеофильной атаки железа гема молекулой воды, которая вытесняет кислород из $\text{Hb}(\text{O}_2)_4$ в форме O_2^- так, что железо гема превращается ферри- (Fe^{3+}) -форму [14]. В свою очередь повышение уровня O_2^- может служить причиной развития окислительного стресса, как одного из осложнений гипергликемического состояния.

Заключение. Таким образом, полученные в ходе исследования данные позволяют оценить более непосредственное влияние, которое оказывает не описанная ранее углеводная модификация ϵ -аминогрупп Lys99 α_1 -субъединиц, на цепочку конформационных перестроек тетрамерной молекулы гликогемоглобина в ряду $\text{T} \rightarrow \text{R} \rightarrow \text{R2}$, что является причиной вызываемого гликозилированием увеличения времени жизни оксигенированного состояния гемоглобина.

Список литературы

1. Stitt, A.W. (2001) *Br. J. Ophthalmol.*, 85, 746-753.
2. Schnedl, W.J., Wallner, S.J., Piswanger, C., Krause, R., and Lipp, R.W. (2005) *Wien. Med. Wochenschr.*, 155, 411-415.
3. Yamagishi, S., Nakamura, K., Inoue, H., Kikuchi, S., and Takeuchi, M. (2005) *Med. Hypotheses*, 64, 1208-1210.

4. Cefalu, W.T. (2005) *N. Engl. J. Med.*, 353, 2707-2709.
5. Khan, Z.A., Farhangkhoe, H., and Chakraborti, S. (2006) *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 4, 45-57.
6. McDonald, M.J., Shapiro, R., Bleichman, M., Solway, J., and Bunn, H.F. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 2327-2332.
7. Syakhovich, V.E., Saraswathi, N.T., Ruff, M., Bokut, S.B., and Moras, D. (2006) *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 62, 106-109.
8. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) *Methods Enzymol.*, 276, 307-326.
9. Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., and Kjeldgaard, M. (1991) *Acta Crystallogr. A.*, 47 (Pt 2), 110-119.
10. Navaza, J. (2001) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 57, 1367-1372.
11. Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., and Warren, G.L. (1998) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 54 (Pt 5), 905-921.
12. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. (1994) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 50, 760-763.
13. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993) *J. Appl. Crystallogr.*, 26, 283-291.
14. Sen, S., Kar, M., Roy, A., and Chakraborti, A.S. (2005) *Biophys. Chem.*, 113, 289-298.

УТОМЛЯЕМОСТЬ И РАБОТОСПОСОБНОСТЬ КРЫС ОБОИХ ПОЛОВ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО СТРЕССА

*М.В. Смирнова, С.С. Лазуко, *А.П. Солодков
Витебск, УО «ВГМУ», * УО «ВГУ им. П.М. Машерова»*

Стресс составляет важнейшую проблему физиологии и медицины. Эмоциональный стресс приводит к таким психосоматическим нарушениям как иммунодефицит, невроз, заболевания сердечно-сосудистой системы, а также изъязвлению желудочно-кишечного тракта. [2]. Воздействие стрессоров на организм осуществляется ежедневно, однако, чувствительность к ним у разных индивидуумов различная. Несмотря на однородность стрессорного воздействия, не у всех животных развиваются изменения артериального давления, сосудистого тонуса или работы сердца, т.е. животные обладают выраженной индивидуальной устойчивостью к стрессу.

Длительное и интенсивное эмоциональное или физическое напряжение - это наиболее распространенная причина нарушения физиологических функций, что может обуславливать снижение выносливости и работоспособности [1]. Однако, не изученным остается вопрос о влиянии стрессорных воздействий на функциональные резервы организма в сравнении особей женского и мужского полов.

Цель. Выяснить влияние стресса на утомляемость и общую работоспособность у крыс обоих полов в тесте принудительного плавания.

Материал и методы. Для оценки физической работоспособности применяли классический тест принудительного плавания по Порсолту до полного отказа от попыток плавания (спасения), так как при этом можно