

## ВПЛИВ ГАПТОГЛОБІНУ НА КИСНЕЗВ'ЯЗУВАЛЬНІ ТА НІТРИТРЕДУКТАЗНІ ВЛАСТИВОСТІ ГЕМОГЛОБІНУ

*У модельних дослідженнях показано вплив білка плазми крові гаптоглобіну на киснезв'язувальні та нітритредуктазні властивості гемоглобіну. Встановлено, що комплекс гаптоглобіну з гемоглобіном (Hr-Hb) за рахунок певних конформаційних перебудов набуває властивості легше зв'язувати кисень поза еритроцитами, ніж вільний гемоглобін, а також утворений комплекс має менші нітритредуктазні властивості, ніж вільний гемоглобін. Таким чином, імовірно, комплекс Hr-Hb запобігає утворенню надлишкової кількості NO і тим самим зменшує можливість активації процесів ліпопероксидації.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** кров, плазма, гаптоглобін, гемоглобін, комплекс гаптоглобін-гемоглобін (Hr-Hb).

**ВСТУП.** У формуванні неспецифічної реактивності організму суттєву участь беруть білки "гострої фази". Серед них одне із центральних місць займають глікопротеїни, які продукуються печінкою та низкою інших органів і циркулюють у кров'яному руслі.

Зростання концентрації цих сполук спостерігають при різних патологічних станах, зокрема при інфекційних захворюваннях, неопластичних, автоімунних процесах тощо. Дані білки характеризуються значною поліфункціональністю, що, очевидно, пов'язано як з їх складною будовою, так і з впливом, який вони проявляють при різних функціональних або патологічних станах організму.

Одним із таких глікопротеїнів є гаптоглобін (Hr). Молекула Hr містить близько 83 % білкового компонента і 20 % – вуглеводного. Кількісне визначення небілкового компонента гаптоглобіну показало наявність приблизно 5,1 % N-ацетилнейрамінової кислоти, 5,4 % глюкозаміну, 1 % фукози і по 8,5 % галактози та манози [1, 25].

Методом електрофорезу в поліакриламідному або крохмальному гелі розрізняють такі фенотипи: Hr 1-1 хімічно однорідний (інші типи Hr є неоднорідними). Цей фенотип характеризується одною широкою смугою, яка розташована у початковій зоні  $\alpha_2$ -глобулінів, має молекулярну масу 99 000 Да; Hr 2-2 представлений комплексом із 4-5 вузьких смуг, що згруповані поблизу старту, має молеку-

лярну масу приблизно 160 000 Да; Hr 2-1 характеризується слабовираженою смугою, що аналогічна фенотипу 1-1, комплексом із 4-5 вузьких смуг поблизу старту, які дещо відрізняються за рухливістю від смуг фенотипу 2-2, і ще одною чіткою смугою (гібридною), що розташовується між першою та останньою смугами [16, 17, 23].

Виявлено, що Hr 1-1 – монодисперсний білок, а Hr 2-1 і Hr 2-2 циркулюють у крові у вигляді системи полімерів. Він складається з поліпептидів двох типів –  $\alpha$  і  $\beta$ , які відрізняються за молекулярною масою. Така будова характерна для Hr усіх досліджуваних видів ссавців, включаючи людину. Специфічною властивістю гаптоглобіну є його здатність зв'язувати позаеритроцитарний гемоглобін (Hb) у стабільний комплекс [23].

У молекулі гаптоглобіну є дві ділянки, з кожною з яких зв'язується по одному  $\alpha\beta$ -димеру гемоглобіну. Гемоглобінозв'язувальний центр гаптоглобіну розташований на його  $\beta$ -ланцюзі, й цей поліпептид утворює з гемоглобіном комплекс  $\beta$ -Hb, а  $\alpha$ -ланцюг не утворює. Додавання  $\alpha$ -ланцюга до комплексу  $\beta$ -Hb утворює функціонально активний комплекс. Отже, гемоглобін не заважає зв'язуванню  $\beta$ -ланцюга гаптоглобіну з  $\alpha$ -поліпептидом, і цей  $\alpha$ -ланцюг, очевидно, не відіграє суттєвої ролі в утворенні комплексу Hr-Hb [15, 19].

Зв'язування гаптоглобіну та гемоглобіну в стабільний комплекс, імовірно, викликає деякі зміни структури і властивостей цих білків

у результаті взаємного впливу молекул. Зокрема, властивості гемоглобіну, що входить до складу даного комплексу, відрізняються від того, який не входить до складу комплексу, наприклад, за реактивністю гему. Апогемоглобін здатний зв'язувати чотири еквіваленти гему, майже повністю відновлюючись до гемоглобіну, а комплекс Нр-апоНб зовсім не зв'язує гем [14, 24].

Серед переносників  $O_2$  провідна роль належить Нб еритроцитів крові. Цей унікальний гемопротеїн є поліфункціональною молекулою. Достатньо вивчено такі функції Нб, як: транспортна – перенесення  $O_2$ ,  $CO_2$ , оксиду азоту, регуляція кислотно-лужної рівноваги, монооксигеназна, пероксидазна, каталазна активності [3, 5–7, 10]. Особлива роль належить білок-білковим взаємодіям. Важливими у цьому відношенні є білки “гострої фази” і серед них гаптоглобін. Зростання концентрації гаптоглобіну в крові може призводити до зміни функції інших білків та, відповідно, метаболічних процесів [1, 2, 4].

Метою наших досліджень було вивчити вплив гаптоглобіну на киснезв'язувальні та нітритредуктазні властивості позаеритроцитарного гемоглобіну.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Для модельних досліджень було використано кров практично здорових осіб віком 35–65 років, отриману в Центральній станції переливання крові м. Львова. Кров транспортували в лабораторію кафедри біохімії в спеціальному термостатованому посуді з наявністю охолоджувального реагенту при температурі 4 °С. Дослідження було проведено в день отримання матеріалу.

Кров брали натще з ліктьової вени, як антикоагулянт використовували 3,8 % цитрат натрію. Для досліджень застосовували гаптоглобін фірми “Fluka” (Швейцарія) типу 2-1. Показник  $P_{50}$  (парціальний тиск кисню, що відповідає 50 % насиченню оксигемоглобіну), за яким оцінювали спорідненість гемоглобіну до кисню (СГК), визначали методом змішування та коригування [22].

Побудову кривих дисоціації оксигемоглобіну гемолізатів еритроцитів здійснювали модифікованим спектрофотометричним методом, використовуючи гемолізати еритроцитів, тричі промитих фізіологічним розчином. Криві дисоціації кисню (КДК) будували в координатах  $pO_2$  (мм рт. ст.) і ступеня насичення Нб киснем ( $HbO_2$ , %) при визначеному  $pO_2$ , застосовуючи дані спектрофотометрії розчинів Нб з різним ступенем оксигенації [12].

При вивченні впливу гаптоглобіну на киснезв'язувальні властивості гемоглобіну в інкубаційну суміш вносили 0,5 мг Нр із розрахунку на 1 мл інкубаційної суміші, яка містила 0,5 мг Нб. Проводили інкубацію протягом 30 хв при 37 °С.

Дослідження нітритредуктазної активності дезоксигемоглобіну проводили таким чином. До відновленого шляхом десатурації гемоглобіну, розчиненого в К-На-фосфатному буфері (рН 7,36), у сатуратор із пристроєм для введення реагентів у безкисневих умовах, додавали 0,3 мл розчину  $NaNO_2$  (0,26 ммоль/л), фіксували спектрофотометрично при 480 нм швидкість переходу дезоксигемоглобіну в нітрозозформу. Аналогічно визначали вплив гаптоглобіну на процес переходу дезоксигемоглобіну в нітрозозформу [9].

Отримані результати статистично оброблено за t-критерієм Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Проведені нами модельні дослідження показали, що при взаємодії Нб з Нр має місце зсув вліво (рис. 1) кривої оксигенації ( $P_{50}$ ) гемоглобіну людини, яка в контролі становила (26,64±0,63) мм рт. ст., а при утворенні комплексу з Нр – (18,43±0,65) мм рт. ст.

Ці дані свідчать про те, що при утворенні комплексу Нр-Нб спорідненість гемоглобіну до кисню зростає.

Як видно з рисунка 1, хід кривої оксигенації у координатах  $pO_2$  – %  $HbO_2$  характеризується більшою крутизною в ділянці нижньої інфлексії. Верхня інфлексія кривої розміщується лівіше порівняно з вільним гемоглобіном.

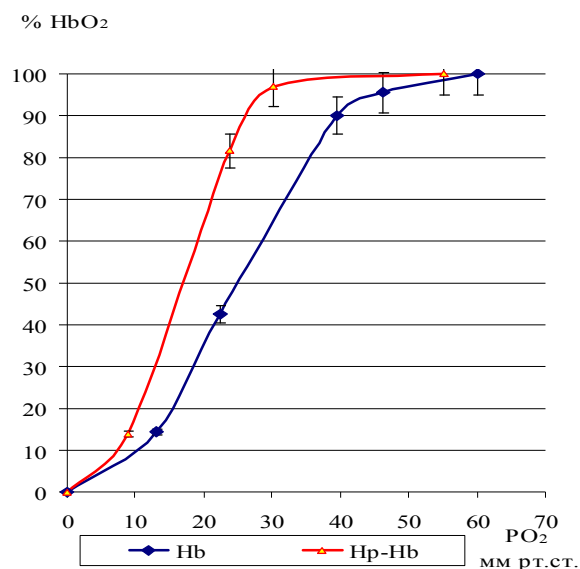


Рис. 1. Крива оксигенації вільного гемоглобіну та в комплексі з гаптоглобіном ( $p < 0,05$  порівняно з Нб,  $n=5$ ).

Крива наближається до гіперболічної форми, що свідчить про зменшення ступеня кооперативності та коефіцієнта Хілла. Збільшення спорідненості Hb до O<sub>2</sub> за присутності гаптоглобіну вказує на сповільнення процесів конформаційних переходів у молекулі гемоглобіну, зумовлених приєднанням Нр.

Цей ефект (гальмування) зумовлений послабленням процесу мобільної внутрішньомолекулярної перебудови зв'язків між поліпептидними ланцюгами молекули гемоглобіну.

Зв'язування гаптоглобіну і гемоглобіну в стабільний комплекс, очевидно, викликало деякі зміни структури і властивостей цих білків у результаті взаємного впливу молекул. Зокрема, властивості гемоглобіну, що входить до складу даного комплексу, відрізняються від того, який не входить до складу комплексу, наприклад, за реактивністю гем. Апогемоглобін здатний зв'язувати чотири еквіваленти гем, відновлюючись до гемоглобіну, а комплекс Нр-апоHb зовсім не зв'язує гем. Комплекс Нр-Hb дає диференційний спектр у зоні λ 453–713 нм. Наявність смуг при λ 500 і 630 нм у диференційному спектрі вказує на перехід молекули гемоглобіну з R-структури в T-структуру. В оксигемоглобіну такий перехід R→T спостерігають при відщепленні кисню та утворенні дезоксигемоглобіну [1]. Проте комплекс гаптоглобіну з гемоглобіном проявляє вищу спорідненість до кисню, і перехід молекули з R- у T-структуру, очевидно, відбувається завдяки внутрішньомолекулярним ефектам. Важливу роль при цьому відіграє зміна конформації глобінової частини молекули гемоглобіну під впливом гаптоглобіну.

Таким чином, зв'язування молекули гаптоглобіну з молекулою гемоглобіну має вплив, подібний до дезоксигенування Hb, при цьому спостерігають подібні конформаційні зміни. У результаті даних перебудов утворений комплекс набуває властивості легше приєднувати й утримувати кисень і таким чином впливати на окисно-відновні процеси в крові, відіграючи роль їх регулятора.

Враховуючи те, що Hb є не тільки білком, що здійснює функцію транспортера кисню до тканин, але також бере участь в інших процесах (оксидазних, монооксигеназних, пероксидазних), було досліджено нітритредуктазні властивості Hb та їх зміни за умов утворення комплексу Нр-Hb.

Метаболічні ефекти NO реалізуються як на внутрішньоклітинному, так і на системних рівнях організації багатоклітинних організмів. До цих ефектів належить вплив NO на рівень забезпеченості тканин та органів киснем. З

огляду на те, що спорідненість NO до гемоглобіну в 8000 разів більша, ніж у O<sub>2</sub>, оксид азоту, при фізіологічних концентраціях, робить свій внесок у формування киснезв'язувальних властивостей гемоглобіну за рахунок утворення метгемоглобіну, S-нітрозогемоглобіну та нітрозилгемоглобіну. У зв'язку з цим, значного поширення набуває концепція дихального циклу як системи трьох газів – O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/NO [8, 18]. Водночас S-нітрозогемоглобін, який, за словами М. Перутца, є "буфером NO" [21], здійснює транспорт NO до тканин від місця його синтезу. За високого рівня NO (≥2–4 мкМ) проявляються його цитотоксичні ефекти. Зокрема, змінюється спорідненість кисню до гемоглобіну внаслідок зміни співвідношення дериватів гемоглобіну та підвищення інтенсивності процесів нітрозилування, при цьому зсув кривої дисоціації гемоглобіну вправо викликає активацію процесів вільнорадикального окиснення, ліпопероксидації, окисної модифікації білків [13].

Одним із важливих моментів є участь NO в оксидативному стресі. Зв'язування NO із супероксиданіоном призводить до утворення пероксинітриду, що є досить стабільною молекулою ( $\tau_{1/2} \approx 1$  с), і саме він опосередковано, через гідроксильний радикал, викликає пошкодження клітинних та субклітинних структур [20].

Суттєву роль відіграє також зв'язування позаеритроцитарного гемоглобіну з більшими лігандами, зокрема такими, як гаптоглобін, оскільки утворений комплекс ефективніше зв'язує кисень.

Таким чином, регуляція комплексом Нр-Hb метаболізму оксиду азоту та його похідних має важливе значення, оскільки регулюючи ці процеси, комплекс впливає на антиоксидантний статус організму.

Проведені нами дослідження свідчать про зниження нітритредуктазної активності комплексу Нр-Hb *in vitro* порівняно з позаеритроцитарним гемоглобіном.

Результати дослідження кінетики перетворення NO<sub>2</sub><sup>-</sup> на NO позаеритроцитарним гемоглобіном та в комплексі з гаптоглобіном показано на рисунку 2.

Як видно з наведених результатів, на першій хвилині при проходженні нітритредуктазної реакції з гемоглобіном спостерігають більшу активність, про що свідчить ΔE, яка, відповідно, складає 0,0276±0,00365 (p≤0,05), суттєво меншу швидкість відзначають при реакції з комплексом Нр-Hb – 0,0178±0,00327 (p≤0,05).

Аналогічні зміни швидкості нітритредуктазної активності спостерігають, відповідно, на 2, 3, 4, 5 та 6 хвилинах. Крім того, на 5 і 6 хви-

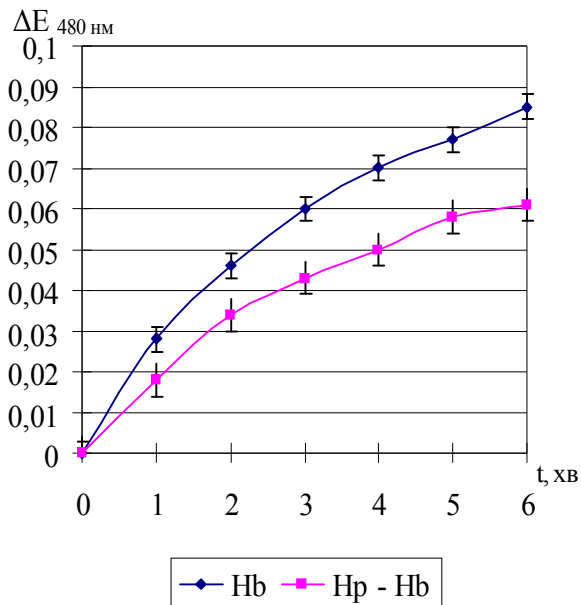


Рис. 2. Нітритредуктазна реакція комплексу Hb-Hp. ( $p \leq 0,05$  порівняно з Hb,  $n=5$ ).

линах показники з комплексу Hb-Hp виходять на плато, а при вільному гемоглобіні реакція активно відбувається далі. Отримані результати свідчать про те, що розчини гемоглобіну (гемолізати), інкубованого з гаптоглобіном, проявляють відносно меншу нітритредуктазну активність.

Хоч, за даними окремих авторів [10, 11], дезоксигемоглобін характеризується більшою нітритредуктазною властивістю, ніж оксигемоглобін, проте, очевидно, в комплексі з гапто-

глобіном важливе значення має його здатність до знешкодження продуктів пероксидного окиснення та депонування NO.

Встановлена В. П. Реутовим та співавторами здатність дезоксигемоглобіну (Hb) за відсутності  $O_2$  відновлювати нітрит-аніон ( $NO_2^-$ ) до NO відкриває важливу функціональну роль гемічної компоненти крові. За рахунок нітритредуктазної активності Hb здійснює низку перетворень продуктів метаболізму NO в єдиний цикл [10, 11]. Враховуючи те, що у тканинах присутні ізоферменти NO-синтаз, у результаті функціонування яких утворюється оксид азоту в тканинах, відповідно, в крові є низка чинників, зокрема комплекс Hb-Hp, який, маючи меншу нітритредуктазну здатність, ніж вільний гемоглобін, може на рівні цілісного організму регулювати перетворення оксиду азоту.

**ВИСНОВКИ.** Отже, результати досліджень вказують на те, що позаеритроцитарний гемоглобін здійснює ряд важливих функцій:

1. Комплекс Hb-Hp за рахунок певних конформаційних перебудов набуває властивості легше зв'язувати кисень поза еритроцитами, ніж вільний гемоглобін.

2. Утворений комплекс має менші нітритредуктазні властивості, ніж вільний гемоглобін, і, таким чином, імовірно, запобігає утворенню надлишкової кількості NO й тим самим попереджує ініціацію процесів ліпопероксидації.

3. Комплекс Hb-Hp, очевидно, бере участь у депонуванні NO.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бейсембаева Р. У. Гаптоглобин: Структура, свойства и роль в организме позвоночных / Р. У. Бейсембаева // Усп. соврем. биологии. – 1984. – **98**, вып. 3 (6). – С. 409–425.

2. Брюханова Э. В. Влияние гаптоглобина на способность гемоглобина разлагать перекись водорода с образованием свободных радикалов / Э. В. Брюханова, А. Н. Осипов, Ю. А. Владимиров // Пульмонология. – 1995. – **5**, № 1. – С. 56–59.

3. Взаимоотношения сродства гемоглобина к кислороду и перекисного окисления липидов при лихорадке / М. В. Борисюк, В. В. Зинчук, В. Н. Корнейчик [и др.] // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1994. – **114**, № 7. – С. 27–30.

4. Гаптоглобин сыворотки крови при заболевании раком легень / І. П. Федорович, М. Ф. Тимочко, Ю. М. Федевич [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 1995. – **67**, № 2. – С. 103–105.

5. Гемический компонент системы транспорта кислорода в регуляции процессов перекисного окисления липидов / М. В. Борисюк, В. Н. Корнейчик, А. В. Рожко [и др.] // Система транспорта кислорода. – Гродно, 1989. – С. 6–13.

6. Зинчук В. В. Прооксидантно-антиоксидантное состояние организма при введении липополисахарида в условиях коррекции сродства гемоглобина к кислороду и L-аргинин-NO-системы / В. В. Зинчук // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – **131**, № 1. – С. 39–42.

7. Коробов В. М. Вплив гіпоксичної гіпоксії на кисеньзв'язувальні властивості гемоглобінів щурів і напівводних амніот / В. М. Коробов // Експерим. та клін. фізіол. і біохім. – 2001. – № 1. – С. 38–40.
8. Коробов В. М. Роль оксиду азоту в регуляції транспорту газів / В. М. Коробов // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 4. – С. 13–18.
9. Пат. 4914972 Україна, B01L3/00. Пристрій для визначення кисневодисоціаційних кривих міоглобінів / Федорович І. П., Коробов В. М. (Україна); 15866 С1; заявник і патентовласник Львів. держ. мед. ін-т. – № G01N33/48; заявл. 20.12.91; опубл. 30.06.97.
10. Реутов В. П. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота / В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина // Биохимия. – 1998. – **63**, вып. 7. – С. 1029–1040.
11. Реутов В. П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих / В. П. Реутов // Усп. биол. хим. – 1995. – **35**. – С. 189–228.
12. Струбицкий И. В. Определение кислородсвязывающих кривых гемоглобина методом спектрофотометрии / И. В. Струбицкий, В. Н. Коробов, Р. В. Алексевич // Лаб. дело. – 1988. – № 12. – С. 11–13.
13. Borisiuk M. V. Analysis of the relationship between hemoglobin-oxygen affinity and lipid peroxidation during fever / M. V. Borisiuk, V. V. Zinchuk // Acta Bioch. Pol. – 1995. – **42**, № 1. – P. 69–74.
14. Dvorankova B. The conformation changes of haemoglobin on its haptoglobin / B. Dvorankova, Z. Pavlicek // Coll. Czech. Chem. Commun. – 1981. – **46**, № 5. – P. 1288–1295.
15. Haptoglobin heavy and light chains. Structural properties reassembly and formation of minicomplex with haptoglobin / I. Vallette, M. Waks, J. C. Weijman [et al.] // J. Biol. Chem. – 1981. – **256**, № 2. – P. 672–679.
16. Hever O. Hemoglobin binding capacity of heat incubated sera of different haptoglobin subtypes / O. Hever // Experientia. – 1977. – **33**, № 5. – P. 599–600.
17. Hooper D. C. Determination of the subunit composition of haptoglobin 2-1 polymers using quantitative densitometry of polyacrylamide gels / D. C. Hooper, A. C. Peacock // J. Biol. Chem. – 1976. – **251**, № 19. – P. 5845–5851.
18. Kosaka H. Physiological role of NO as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues / H. Kosaka, A. Seiyama // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1996. – **218**, № 3. – P. 749–752.
19. Makinen M. W. Circular dichroism and electron paramagnetic resonance of the haptoglobin – hemoglobin complex / M. W. Makinen, H. Kon // Biochemistry. – 1971. – **10**, № 1. – P. 43–52.
20. Pacher P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet // Physiol. Rev. – 2007. – **87**(1). – P. 315–424.
21. Perutz M. F. Blood. Taking the pressure off / M. F. Perutz // Nature. – 1996. – **380**, № 6571. – P. 205–206.
22. Severinghaus J. W. Blood gas calculator / J. W. Severinghaus // J. Appl. Physiol. – 1966. – **21**, № 5. – P. 1108–1116.
23. Subunit compositions of haptoglobin 2-2 polymers / G. M. Fuller, M. A. Rasco, M. L. Mc Combs [et al.] // Biochemistry. – 1973. – **12**, № 2. – P. 253–258.
24. Tsapis A. Studies on the subunit dissociation of deoxyhemoglobin using hemoglobin – haptoglobin interaction / A. Tsapis, J. Thillet, J. Rosa // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1978. – **85**, № 1. – P. 511–516.
25. Waks M. The association equilibrium between haptoglobin and apohemoglobin / M. Waks, M. Rogard, N. Cittanova // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1978. – **80**, № 1. – P. 252–258.

Ю. М. Федевич

ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО

## ВЛИЯНИЕ ГАПТОГЛОБИНА НА КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ И НИТРИТРЕДУКТАЗНЫЕ СВОЙСТВА ГЕМОГЛОБИНА

### Резюме

В модельных исследованиях показано влияние белка плазмы крови гаптоглобина на кислородсвязывающие и нитритредуктазные свойства гемоглобина. Установлено, что комплекс гаптоглобина с гемоглобином (H<sub>р</sub>-H<sub>б</sub>) за счет определенных конформационных перестроек приобретает свойства легче связывать кислород вне эритроцитов, чем свободный гемоглобин, а также образованный комплекс обладает меньшими нитритредуктазными свойствами, чем свободный гемоглобин. Таким образом, вероятно, комплекс

*Hp-Hb* предотвращает образование избыточного количества *NO* и тем самым уменьшает возможность активации процессов липопероксидации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **кровь, плазма, гаптоглобин, гемоглобин, комплекс гаптоглобин-гемоглобин (Hp-Hb).**

**Yu. M. Fedevych**

DANYLO HALYTSKYI LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

## **INFLUENCE OF HAPTOGLOBIN ON OXYGEN-BINDING AND NITRITE REDUCTASE CAPACITIES OF HEMOGLOBIN**

### **Summary**

*Model experiments demonstrated the influence of the blood plasma protein haptoglobin on oxygen-binding and nitrite reductase capacities of hemoglobin. It was found that owing to the particular conformation transformations the complex of haptoglobin with hemoglobin (Hp-Hb) acquires the capacity to bind oxygen away from erythrocytes more efficiently than free hemoglobin. It was also established that the complex formed has lower nitrite reductase capacities than free hemoglobin. Thus, it is possible that the complex (Hp-Hb) prevents formation of an excessive amount of NO and lowers the possibility of activation of lipoperoxidation processes.*

KEY WORDS: **blood, plasma, haptoglobin, hemoglobin, haptoglobin – hemoglobin complex (Hp-Hb).**

Отримано 28.05.13

Адреса для листування: Ю. М. Федевич, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна.