

исследуемые ткани на чувствительные и нечувствительные к перегрузке железом. В первую группу попали печень, почки и селезенка, а во вторую — сердце, легкие и мозг.

Вместе с тем, в настоящее время остается неясным, является ли накопление доступного десфералу железа в тканях маркером повреждения ткани или эта взаимосвязь носит более сложный характер. Этот вопрос требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванин А.Ф. // Биохимия.— 1967.— Т.32.— С.277—282.
2. Козлов А.В., Егоров Д.Ю., Владимиров Ю.А. и др. // Журн. физ. химии.— 1990.— Т.64.— С.225—227.
3. Bacon B.R., Tavill A.S., Brittenham G.M. et al. // J. Clin. Invest.— 1983.— Vol.71.— P.429—439.
4. Bacon B.R.O., Neill R. // Hepatology.— 1985.— Vol.5.— Abstr. 13.
5. Bacon B.R., Healey J.F., Brittenham G.M. et al. // Gastroenterology.— 1986.— Vol.90.— P.1844—1853.

6. Bacon B.R., Britton R.S., O'Neill R. // Hepatology.— 1989.— Vol.9.— P.398—404.
7. Ceccarelli D., Predieri G., Muscatello U. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 1991.— Vol.176.— P.1262—1268.
8. Figueiredo M.S., Baffa O., Neto J.B. et al. // Res. Exp. Med.— 1993.— Vol.193.— P.27—37.
9. Galleano M., Puntarulo S. // Toxicology.— 1992.— Vol.76.— P.27—38.
10. Iancu T.C., Shiloh H., Link G. et al. // Br. J. Exp. Pathol.— 1987.— Vol.68.— P.53—65.
11. Kozlov A.V., Yegorov D.Yu., Vladimirov Yu. A. et al. // Free Radical Biol. Med.— 1992.— Vol.13.— P.9—14.
12. Masini A., Trenti T., Ventura E. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 1984.— Vol.124.— P.462—469.
13. Vanin A.F., Osipov A.N., Kubrina L. N. et al. // Stud. Biophys.— 1975.— Vol.49.— P.13—25.
14. Yegorov D. Y., Kozlov A.V., Azizova O.A. et al. // Free Radical Biol. Med.— 1993.— Vol.15.— P.565—574.

Благодарность. Работа частично была поддержана Европейским научным обществом (ESF grant № RF/93/35 (T)).

Поступила 26.12.94.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 612.111.11.015.3

Э.В.Брюханова, А.Н.Осипов, Ю.А.Владимиров

ВЛИЯНИЕ ГАПТОГЛОБИНА НА СПОСОБНОСТЬ ГЕМОГЛОБИНА РАЗЛАГАТЬ ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА С ОБРАЗОВАНИЕМ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

Российский государственный медицинский университет, Москва

THE HAPTOGLOBIN EFFECT ON HAEMOGLOBIN MEDIATED DECOMPOSITION OF HYDROGEN PEROXIDE YIELDING FREE RADICALS

E.V.Brukhanova, A.N.Osipov, Y.A.Vladimirov

S u m m a r y

The effect of haptoglobin on H_2O_2 dependent chemiluminescence (ChL) of native and modified with H_2O_2 or HOCl haemoglobin was studied. It was shown that haptoglobin decreases the native haemoglobin ChL intensity and the number of radicals formed during the reaction of haemoglobin with H_2O_2 . It was supposed that the effect of haptoglobin is conditioned primarily by the haemoglobin catalytic activity decrease through Hp—Hg complex formation. It was shown that haptoglobin inhibits effectively H_2O_2 -dependent ChL of both native and preincubated with H_2O_2 or HOCl haemoglobin.

Р е з ю м е

Изучено влияние гаптоглобина на H_2O_2 -зависимую хемилуминесценцию (ХЛ) нативного гемоглобина и гемоглобина, модифицированного H_2O_2 или HOCl. Показано, что гаптоглобин уменьшает интенсивность ХЛ нативного гемоглобина и количество радикалов, образующихся при взаимодействии гемоглобина с H_2O_2 . Предполагается, что это влияние гаптоглобина обусловлено прежде всего уменьшением каталитической активности гемоглобина путем образования Hp—Hg комплекса. Было показано, что гаптоглобин одинаково эффективно ингибирует H_2O_2 -зависимую ХЛ как нативного гемоглобина, так и гемоглобина, преинкубированного с избытком H_2O_2 или HOCl.

В настоящее время не подлежит сомнению важная роль свободнорадикальных процессов в патогенезе различных заболеваний. Так, в результате взаимодействия внеэритроцитарного гемоглобина с окислителями, образующимися в организме (органические гидроперекиси, перекись водорода, гипохлорит), генерируются высокорекреационноспособные соединения и высвобождаются ионы железа, которые в дальнейшем приводят к образованию гидроксильных радикалов, обладающих сильнейшим повреждающим действием [1,6,8,14,17]. В результате этих реакций внеэритроцитарный гемоглобин приобретает способность стимулировать перекисное окисление липидов липопротеинов, приводящее к развитию атеросклероза, параличей и эпилепсий [11,13,16].

В плазме крови присутствует белок гаптоглобин, образующий стабильный комплекс с гемоглобином и удаляющий каталитически активный гемоглобин из кровяного русла [4,15]. Однако до сих пор недостаточно изученным является влияние гаптоглобина на способность гемоглобина стимулировать свободнорадикальные реакции в организме. В отношении гемоглобинстимулированного перекисного окисления мицелл жирных кислот получены некоторые данные, позволяющие сделать вывод об ингибирующей способности гаптоглобина [7].

Метод H_2O_2 -зависимой хемилюминесценции (ХЛ) в присутствии люминола позволяет оценить радикал-продуцирующую способность нативного или модифицированного гемоглобина при взаимодействии его с перекисью водорода в ХЛ-системе.

Задача настоящей работы: изучить влияние гаптоглобина на H_2O_2 -зависимую ХЛ нативного гемоглобина и гемоглобина, модифицированного гипохлоритом или перекисью водорода.

В работе использовали гипохлорит натрия ("Laborchemie", Германия), перекись водорода и люминол ("Реахим", Россия), 20 мМ фосфатный буфер (17 мМ $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ / 3 мМ $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$).

Концентрации OSI^- и H_2O_2 определяли спектрофотометрически [5,12], измерения проводили на спектрофотометре "Beckman DU-7" (США).

Гемоглобин выделяли из эритроцитов здоровых доноров [2]. Кровь получали венепункцией, затем дважды производили отмывку эритроцитов изотоническим раствором хлорида натрия, эритроциты лизировали 10-кратным количеством дистиллированной воды. Полученный гемолизат центрифугировали при 10 000 об/мин для очистки от теней эритроцитов. Дальнейшую очистку гемоглобина проводили с помощью гель-хроматографии на геле "Sepharosa 4B/CL" (Швеция). Полученный гемоглобин представлял собой оксигемоглобин. Концентрацию гемоглобина определяли спектрофотометрически по поглощению в области полосы Сорэ (415 нм), коэффициент молярной экстинкции для полосы Сорэ принимали равным $E_{415} = 125\ 000\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (в расчете на 1 гем гемоглобина) [2].

Гаптоглобин был выделен кооперативом "Микрофлора" при МНИИЭМ им. Габричевского из асцитической жидкости больных раком желудка. Общую концен-

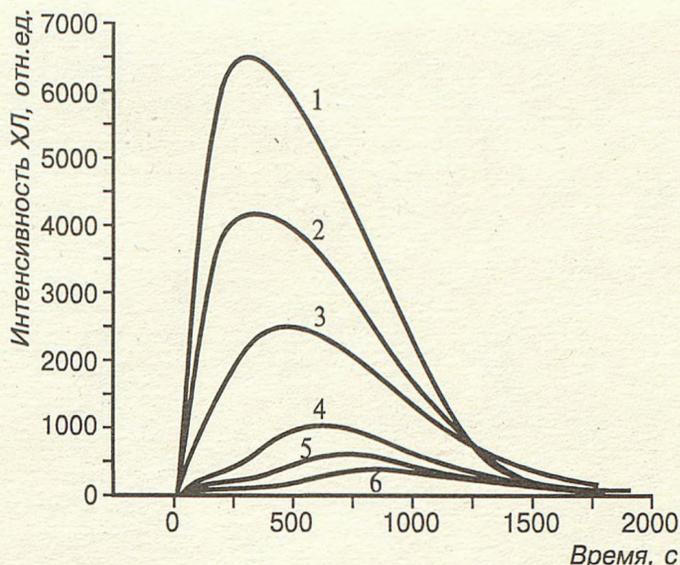


Рис.1. Влияние гаптоглобина на кинетику H_2O_2 -зависимой хемилюминесценции гемоглобина.

Здесь и на рис.2. конечная концентрация Нв 5 мкМ, H_2O_2 0,7 мМ, люминола 0,028 мМ.

Гаптоглобин добавляли в концентрациях:

1) 0 мг/мл; 2) 0,02 мг/мл; 3) 0,04 мг/мл; 4) 0,08 мг/мл; 5) 0,1 мг/мл; 6) 0,12 мг/мл.

трацию белка измеряли микробиуретовым методом, а гемоглобинсвязывающую способность пробы по методике [3], она составила 0,2 мг гемоглобина на 1 мг белка.

В работе был использован бычий сывороточный альбумин ("Sigma", США). Общая концентрация белка была равна концентрации гаптоглобина.

Измерение H_2O_2 -зависимой ХЛ проводили в присутствии люминола (0,028 мМ) на хемилюминометре фирмы LKB (Швеция). Конечная концентрация H_2O_2 составляла 0,7 мМ. Объем образца был равен 0,5 мл.

На первом этапе работы изучали влияние гаптоглобина и альбумина на H_2O_2 -зависимую ХЛ нативного гемоглобина. Кинетика ХЛ гемоглобина представлена на рис.1 (кривая 1).

Можно видеть, что при добавлении H_2O_2 (0,7 мМ) к Нв (5 мкМ в пробе) наблюдается интенсивное свечение (максимальная амплитуда 6500 отн.ед. на 5-й минуте), сопровождающее модификацию гемоглобина перекисью водорода, образование и рекомбинацию свободных радикалов, образующихся при взаимодействии гемоглобина с H_2O_2 , пропорционально площади под кривой ХЛ, т.е. светосумме ХЛ.

Если добавлять к гемоглобину возрастающие концентрации гаптоглобина, то интенсивность ХЛ гемоглобина (кривая 1) уменьшается (кривые 2—6).

Также изменяется кинетика ХЛ гемоглобина: увеличивается время наступления максимума свечения ХЛ. При концентрации добавленного гаптоглобина 0,02 мг/мл (кривая 2) время максимальной амплитуды ХЛ составляет 6 минут, а при концентрации гаптоглобина 0,12 мг/мл (кривая 6) — 14 минут.

Ингибирование гаптоглобином ХЛ гемоглобина может быть неспецифическим и обусловленным конкурен-

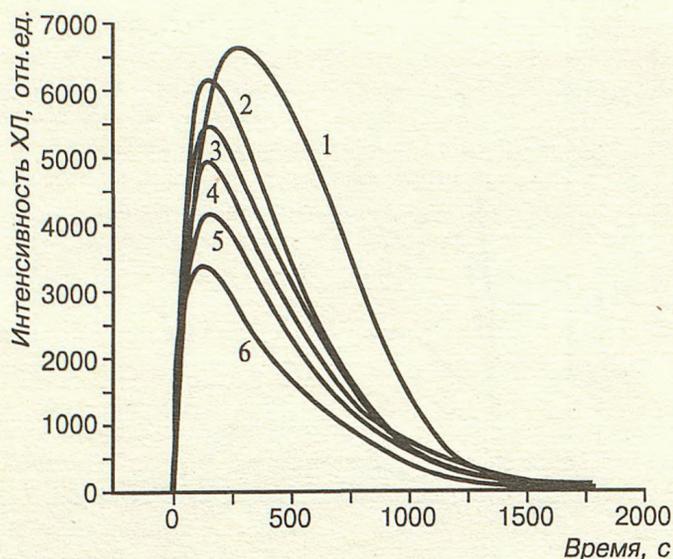


Рис.2. Влияние альбумина на кинетику H_2O_2 -зависимой хемилюминесценции гемоглобина.

Альбумин добавляли в концентрациях:

1) 0 мг/мл; 2) 0,02 мг/мл; 3) 0,04 мг/мл; 4) 0,08 мг/мл; 5) 0,1 мг/мл; 6) 0,12 мг/мл.

цией белков с люминолом за радикалы. Чтобы проверить это предположение, в изучаемую систему вместо гаптоглобина мы добавляли альбумин в весовой концентрации равной концентрации гаптоглобина.

Кинетика ХЛ гемоглобина при добавлении к нему альбумина представлена на рис.2. Можно видеть, что альбумин также уменьшает интенсивность ХЛ свечения гемоглобина, но в значительно меньшей степени, чем гаптоглобин. При этом добавление альбумина к гемоглобину не приводит к уменьшению времени максимальной амплитуды ХЛ и оно остается постоянным при добавлении возрастающих концентраций белка.

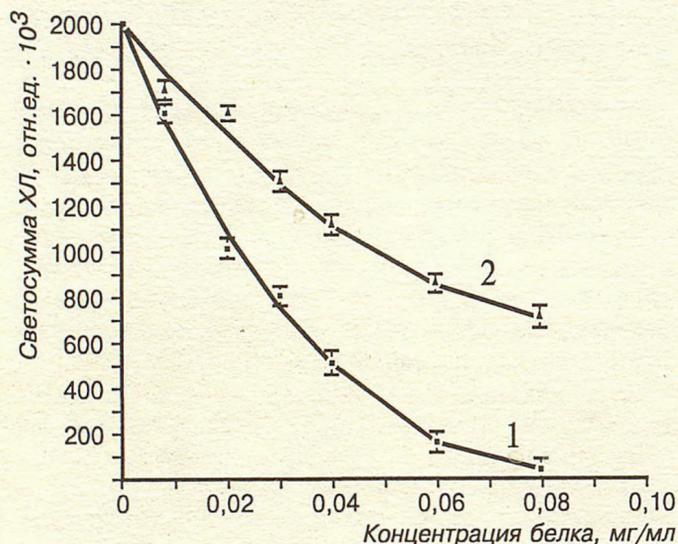


Рис.3. Ингибирование гаптоглобином и альбумином H_2O_2 -зависимой хемилюминесценции нативного Нб (0,5 мкМ в пробе).

1 — Нб + Нр, 2 — Нб + альбумин. При измерении ХЛ в образец добавляли 0,7 мМ H_2O_2 и 0,028 мМ люминола.

Представляло интерес оценить количество радикалов, образующихся в реакции перекиси водорода и гемоглобина, при добавлении к последнему гаптоглобина или альбумина. К гемоглобину добавляли буфер (контроль) или различные концентрации белков, затем измеряли светосумму H_2O_2 -зависимой ХЛ за 30 минут. Зависимость величины светосуммы ХЛ гемоглобина от концентрации добавленных белков приведена на рис.3.

Видно, что добавление к гемоглобину как гаптоглобина, так и альбумина приводит к уменьшению светосуммы ХЛ и, вероятно, к уменьшению количества радикалов, образующихся в системе. Известно, что альбумин является неспецифическим ингибитором свободнорадикальных реакций, прежде всего за счет перехвата радикалов и, возможно, связывания ионов железа, которые высвобождаются из гемоглобина при взаимодействии с перекисью водорода [9,10]. Однако гаптоглобин эффективнее альбумина в ингибировании реакции свободнорадикального разложения перекиси водорода гемоглобином. Это можно объяснить тем, что гаптоглобин не только перехватывает радикалы, но и связывает гемоглобин и тем самым тормозит образование радикалов в реакции гемоглобина с H_2O_2 .

На следующем этапе работы представляло интерес оценить ингибирование гаптоглобином и альбумином H_2O_2 -зависимой ХЛ гемоглобина, преинкубированного с такими окислителями, как $HOCl$ и H_2O_2 , которые могут образовываться активными лейкоцитами. Как было показано ранее, инкубация гемоглобина с высокими концентрациями $HOCl$ и H_2O_2 приводит к деструкции белков и высвобождению ионов железа [1,6]. Причем гипохлорит является более сильным окислителем и для одинакового эффекта требуется примерно в 10 раз больше H_2O_2 , чем $HOCl$.

Гемоглобин (0,5 мкМ в пробе) инкубировали с гипохлоритом (11 мкМ в пробе) или перекисью водорода (200 мкМ в пробе) 60 минут при комнатной температуре.

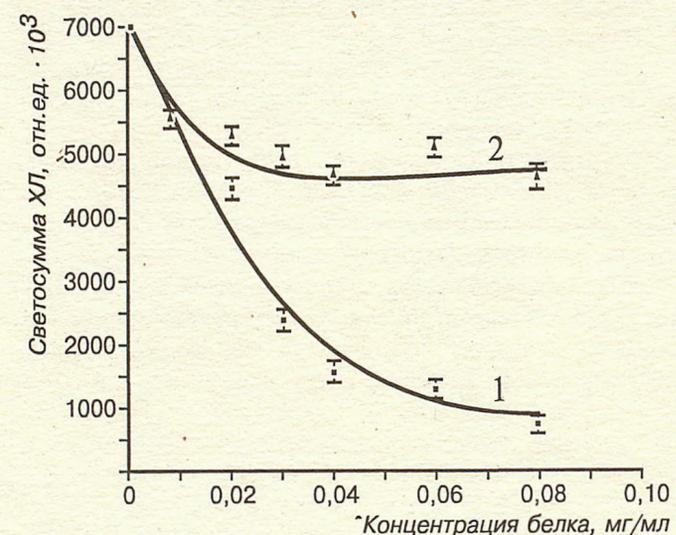


Рис.4. Ингибирование гаптоглобином и альбумином H_2O_2 -зависимой хемилюминесценции Нб, модифицированного $HOCl$.

Гемоглобин (0,5 мкМ) инкубировали с $HOCl$ (11 мкМ), затем добавляли Нр (1) или альбумин (2). При измерении ХЛ в образец добавляли 0,7 мМ H_2O_2 и 0,028 мМ люминола.

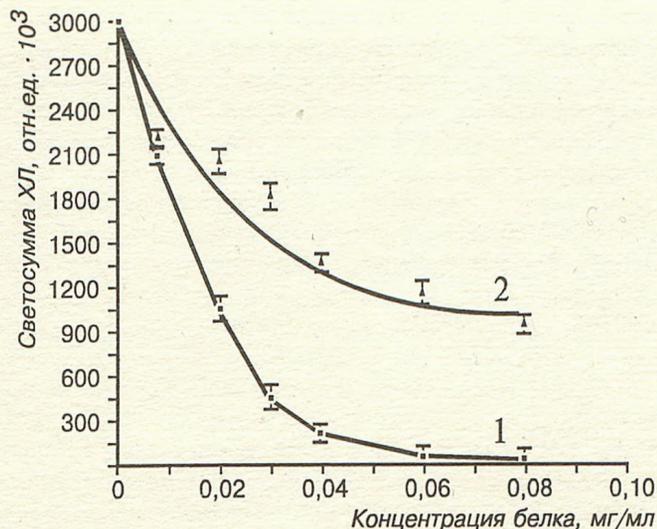


Рис. 5. Ингибирование гаптоглобином и альбумином H_2O_2 -зависимой хемилюминесценции Нб, модифицированного H_2O_2 .

Гемоглобин (0,5 мкМ) инкубировали с H_2O_2 (200 мкМ), затем добавляли Нр (1) или альбумин (2). При измерении ХЛ в образец добавляли 0,7 мМ H_2O_2 и 0,028 мМ люминола.

Был проведен спектрофотометрический анализ модификации гемоглобина гипохлоритом/перекисью водорода (данные не приведены). Так, после 60 минут инкубации гемоглобина с окислителями наблюдался сдвиг пика полосы Сорс с 414 нм (нативный Нб) до 410 нм (Нб+НОСl), до 406 нм (Нб+ H_2O_2), наблюдалось уменьшение величины оптической плотности в полосе Сорс в 1,2 раза (для гипохлорита) и в 1,7 раза (для перекиси водорода), исчезновение длинноволновых пиков поглощения гемоглобина (540 нм и 575 нм). Вышеприведенные спектрофотометрические данные свидетельствуют о деструкции гипохлоритом гемоглобина [1].

Затем было изучено влияние гаптоглобина и альбумина на H_2O_2 -зависимую ХЛ гемоглобина, модифицированного H_2O_2 или НОСl. Для этого была измерена светосумма ХЛ за 30 минут контроля (гемоглобин, преинкубированный с гипохлоритом или перекисью водорода) и образцов, когда к контролю добавляли гаптоглобин или альбумин в равных весовых концентрациях. Полученные данные представлены на рис. 4 и 5. Кривая 1 представляет ингибирование ХЛ модифицированного гемоглобина гаптоглобином.

Видно, что гаптоглобин эффективно ингибирует свободнорадикальное разложение перекиси водорода модифицированным гемоглобином. Причем разница между влиянием гаптоглобина и альбумина в случае модифицированного гемоглобина больше, чем при тушении белками ХЛ нативного гемоглобина (см. рис.3).

Данные, представленные на этих рисунках, свидетельствуют о том, что ингибирование ХЛ модифицированного гемоглобина происходит не только за счет перехвата радикалов белком, но также за счет связывания поврежденного гемоглобина гаптоглобином.

Экспериментальные результаты, полученные в настоящей работе, позволяют сделать следующие выводы:

1. Гаптоглобин, связывая нативный гемоглобин, уменьшает количество свободных радикалов в реак-

ции гемоглобина с перекисью водорода, что видно по уменьшению светосуммы ХЛ. Вероятно, эффект гаптоглобина обусловлен не только перехватом радикалов, но прежде всего уменьшением каталитической активности гемоглобина путем образования Нр-Нб комплекса.

2. Гаптоглобин одинаково эффективно ингибирует H_2O_2 -зависимую ХЛ как нативного гемоглобина, так и гемоглобина, модифицированного гипохлоритом или перекисью водорода. При этом ингибирующее влияние гаптоглобина выражено сильнее, чем сывороточного альбумина.

Таким образом, можно сказать, что гаптоглобин является эффективным ингибитором радикалпродуцирующих реакций гемоглобина, в частности, разложения гемоглобином перекиси водорода с образованием свободных радикалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Якутова Э.Ш., Осипов А.Н., Костенко О.В., Арнхольд И., Арнольд К., Владимиров Ю.А. Взаимодействие гипохлорита с оксигемоглобином приводит к освобождению железа в каталитически активной форме // Биофизика.— 1992.— Т.37.— С.1021—1028.
2. Antonini E., Brunori M. Hemoglobin and Mioglobin in Their Reactions with Ligands.— Amsterdam: North Holland Publ. Comp., 1971.
3. Bong-Sop Shim, Dae-Myung Jue. Simple spectrophotometric determination of haptoglobin level in serum // Clin. Chim. Acta.— 1984.— Vol.136.— P.145—153.
4. Bowman B.H., Barnett D.R. Haptoglobin // Meth. Enzym.— 1988.— Vol.163.— P.462—474.
5. Claiborne A. Catalase activity // Handbook of Methods of Oxygen Radical Research / Ed. R.A Greenwald.— Boca Raton: CRC Press, 1987.— P.283—284.
6. Gutteridge J.M.C. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from hemoglobin by peroxides // FEBS Lett.— 1986.— Vol.201.— P.291—295.
7. Gutteridge J.M.C. The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation // Biochim. Biophys. Acta.— 1987.— Vol.917.— P.219—223.
8. Harel S., Salan M.A., Kanner J. Iron release from methyoglobin, methaemoglobin and cytochrom c by a system generating hydrogen peroxide // Free Radical Res. Commun.— 1988.— Vol.5.— P.11—19.
9. Halliwell B. Albumin-an important extracellular antioxidant // Biochem. Pharmacol.— 1988.— Vol.37.— P.569—571.
10. Kazlov A.V., Panasenko O.M., Yegorov D.Yu., Vol'nova T.V., Azizova O.A. Antioxidant praperties of albumin during the oxidation of linoleic acid and low density lipoproteins in the presence of ferrous ions // Biomed. Sci.— 1991.— Vol.2.— P.530—535.
11. Loiseau P., Jallon P. Post-trarmatic epilepsy // Prog. Neurol. Surg.— 1981.— Vol.10.— P.323—343.
12. Morris J.C. The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°C // J.Phys.Chem.— 1966.— Vol.70.— P.3798—3805.
13. Pananga G., Rice-Evans C., Rule R., Leske D. Interaction between ruptured erythrocytes and low-density lippoproteins // FEBS Lett.— 1992.— Vol.303.— P.154—158.
14. Puppo A., Halliwell B. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron // Biochem. J.— 1988.— Vol.249.— P.185—190.
15. Prtnam F.W. Haptoglobin // The Plasma Proteins / Ed. F.W.Putnam.— New York: Acad. Press, 1975.— P.1—50.
16. Rosen A.D., Frumin N.V. Focal epileptogenesis after intracortical hemoglobin injection // Exp. Neurol.— 1979.— Vol.66.— P.277—284.
17. Stefek R.P., Thomas M.J. Hydrogen peroxide modification of human oxyhemoglobin / Free Radical. Res. Commun.— 1991.— Vol.12.— P.489—497.