

## **ВЗАИМОУСЛОВЛЕННОСТЬ СРОДСТВА ГЕМОГЛОБИНОВ К КИСЛОРОДУ, ИХ АВТООКИСЛЕНИЯ И ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПОЗВОНОЧНЫХ**

**А. Г. БОРИСОВА, А. С. ГОРЮНОВ**

*Институт биологии Карельского научного центра РАН*

Для выяснения причин установленной нами ранее взаимосвязи между сродством гемоглобина к кислороду и устойчивостью эритроцитов соответствующих видов животных к температурному лизису (гемолизу) в настоящей работе параметры реакции автоокисления гемоглобинов человека, барана, быка, песца и осетра изучены по данным об их спектральных свойствах и сопоставлены с характеристиками сродства и терморезистентности. Обнаружено качественное соответствие между способностью гемоглобинов к автоокислению и устойчивостью соответствующих эритроцитов к температурному лизису: позвоночные, характеризующиеся более высокой скоростью автоокисления гемоглобинов (человек, песец, осетр), имеют эритроциты, существенно менее устойчивые к термогемолизу по сравнению с эритроцитами барана и быка, гемоглобины которых окисляются с меньшей скоростью. Полученные данные позволяют предполагать, что в основе этой взаимосвязи лежит более выраженная способность гемоглобинов с высоким сродством к автоокислению, которое обуславливает понижение терморезистентности эритроцитов по свободно-радикальному механизму.

### **A. G. BORISOVA, A. S. GORYUNOV. THE CORRELATION BETWEEN OXYGEN AFFINITY AND AUTOXIDATION OF HAEMOGLOBIN AND HAEMOLYTIC STABILITY OF ERYTHROCYTES OF DIFFERENT VERTEBRATES SPECIES**

Autooxidation reaction parameters for human, ram, ox, polar fox and sturgeon haemoglobins have been studied by their spectral properties and compared to oxygen affinity of haemoglobins and thermohemolytic resistance of erythrocytes with the aim to ascertain the earlier revealed interrelation between the affinity and thermoresistance. Qualitative correspondence of haemoglobin autooxidability and erythrocyte haemolytic resistance has been shown. Vertebrates with higher haemoglobin autooxidation rate (human, polar fox, sturgeon) have erythrocytes of sufficiently less resistance as compared to ram and ox red blood cells that contain haemoglobin with a lesser autooxidation rate. The results obtained suggest that the haemoglobins with higher oxygen affinity are characterized by increased autooxidability, which causes the reduction of haemolytic resistance due to free-radical processes.

#### **Введение**

Ранее нами было показано, что эритроциты позвоночных, содержащие гемоглобин с более низким сродством к кислороду (эритроциты барана и быка), имели существенно большую устойчивость к температурному лизису (гемолизу), чем те, в которых гемоглобин находится в высокоаффинной конформации (эритроциты человека, песца и белуги), при том, что красные клетки крови белуги оказались наименее устойчивыми (Борисова, Горюнов, 1997). Для выяс-

нения причин такой взаимосвязи в настоящей работе исследованы параметры реакции автоокисления гемоглобинов и их спектральные особенности и сопоставлены с показателями терморезистентности соответствующих эритроцитов. В основе такого подхода лежит представление о том, что в каскаде реакций автоокисления гемоглобинов образуются свободные радикалы, способные индуцировать процессы повреждения клеточных мембран (Misra, Fridovich, 1972).

## Материалы и методы

Объектом исследования были гемоглобины человека, песца (*Alopex lagopus*), барана (*Ovis ovis*), быка (*Bos taurus*) и осетра (*Acipenser gueldenstaedti*). Оксигемоглобин выделяли из свежей крови по стандартной методике; концентрацию белка в растворе определяли на основе коэффициентов экстинкции для оксигемоглобина  $\epsilon = 15,37 \text{ мм}^{-1}\text{см}^{-1}$  (в расчете на гем) на длине волны 577 нм (Antonini, Brunori, 1971). Реакцию автоокисления изучали в растворах с концентрацией  $(1,5-2) \times 10^{-6} \text{ М}$  (в расчете на гем) в аэробных условиях в интервале температур от 20 до 50°C, т.е. ниже температуры денатурации, которая (по результатам собственных измерений методом ДСК) составила для исследованных оксигемоглобинов 66-70,5°C, а для метгемоглобинов — 59-62°C (Борисова, Горюнов, 1997). Для сопоставления с параметрами термоиндуцированного гемолиза эритроцитов в интервале 50-66°C нам важно было определить скорости автоокисления при максимально возможных температурах из тех, при которых белок еще имеет нативную структуру.

В экспериментах использовались следующие буферные системы: 1) 0,01М натрий-фосфатный буфер + 0,15М NaCl, pH 7,4 (фосфатно-солевой буфер); 2) 0,1М натрий-ацетатный буфер, pH 5,15; 3) 0,1М боратный буфер, pH 9,18; 4) 0,01М натрий-фосфатный буфер, pH 6,2 и pH 6,9. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре «Specord M 40» (Carl Zeiss, Jena).

В растворе в ходе окисления могут содержаться различные формы гемоглобина (окси-, деокси- и метформы). Концентрация каждого из трех компонентов может быть выражена как функция измеренных поглощений путем решения системы уравнений:

$$A_{\lambda 1} = \epsilon_{D\lambda 1} C_D + \epsilon_{O\lambda 1} C_O + \epsilon_{M\lambda 1} C_M,$$

$$A_{\lambda 2} = \epsilon_{D\lambda 2} C_D + \epsilon_{O\lambda 2} C_O + \epsilon_{M\lambda 2} C_M,$$

$$A_{\lambda 3} = \epsilon_{D\lambda 3} C_D + \epsilon_{O\lambda 3} C_O + \epsilon_{M\lambda 3} C_M,$$

где  $A$  — поглощение;  $C_D$ ,  $C_O$  и  $C_M$  — молекулярные концентрации деокси-, окси- и метгемоглобина, соответственно;  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ,  $\lambda_3$  — выбранные длины волн;  $\epsilon_\lambda$  — коэффициент экстинкции при данной длине волн.

Значения коэффициентов экстинкции для оксигемоглобинов человека были выбраны для длин волн 560, 576 и 630 нм (Benesh et al., 1973; Van Assendelft, 1970), и после решения системы уравнений определяли количество оксигемоглобинов в реакционной смеси.

Способность разных гемоглобинов к автоокислению характеризовали константой скорости реакции автоокисления:



которая может быть описана кинетическим процессом 1-го порядка, зависящим от концентрации гемоглобина (Misra, Fridovich, 1972):

$$N = N_0 \times \exp(-Kt) \quad (2),$$

где  $N_0$  и  $N$  — концентрации гемоглобина в начальный момент времени  $t_0$  и момент времени  $t$ , соответственно;  $K$  — константа скорости реакции автоокисления.

В ходе эксперимента определяли концентрацию участников реакции автоокисления через определенные промежутки времени и по кинетическим кривым:

$$\ln N = \ln N_0 - Kt \quad (3)$$

из начальной скорости реакции автоокисления рассчитывали кажущиеся константы скорости реакции.

Поскольку видимые спектры метгемоглобина pH-чувствительны, то для надежного сопоставления способности различных гемоглобинов к автоокислению изучали pH-зависимости скоростей реакции. Для гемоглобинов позвоночных, кроме человека, данные по изменению коэффициентов экстинкции  $\epsilon_\lambda$  в зависимости от pH отсутствуют, поэтому для определения доли оксиформы в реакционной смеси мы пользовались следующей формулой:

$$[\text{HbO}_2] = [(D_t - D_{\text{кон}})/(D_{\text{нач}} - D_{\text{кон}})] \times 100\% \quad (4),$$

где  $D_t$  — оптическая плотность раствора в момент времени  $t$  на длине волны 576 нм;  $D_{\text{нач}}$  — начальная оптическая плотность;  $D_{\text{кон}}$  — конечная оптическая плотность.

## Результаты и обсуждение

Спектры поглощения оксигемоглобинов изученных нами представителей позвоночных имели характерные максимумы при 415 нм (полоса Соре), 540-541 нм ( $\beta$ -полоса) и 575-576 нм ( $\alpha$ -полоса). Различия в аминокислотном составе и особенностях пространственной структуры белковой части молекулы обуславливают разницу в положении максимумов в спектрах на несколько ангстрем.

С ростом pH у гемоглобинов с изначально высоким сродством к кислороду (человека, песца и осетра) происходит сдвиг в длинноволновую сторону («красный сдвиг»), что свидетельствует о T→R-переходе, т.е. о смещении равновесия в сторону высокоаффинной R-конформации. В физиологических условиях (pH 7,4) у гемоглобинов жвачных (быка и барана) отмечен сдвиг  $\alpha$ - и  $\beta$ -полос в коротковолновую сторону, отражающий тот факт, что эти гемоглобины

имеют более низкое сродство к кислороду и  $R \rightleftharpoons T$ -равновесие у них сдвинуто в сторону низкоаффинной T-конформации.

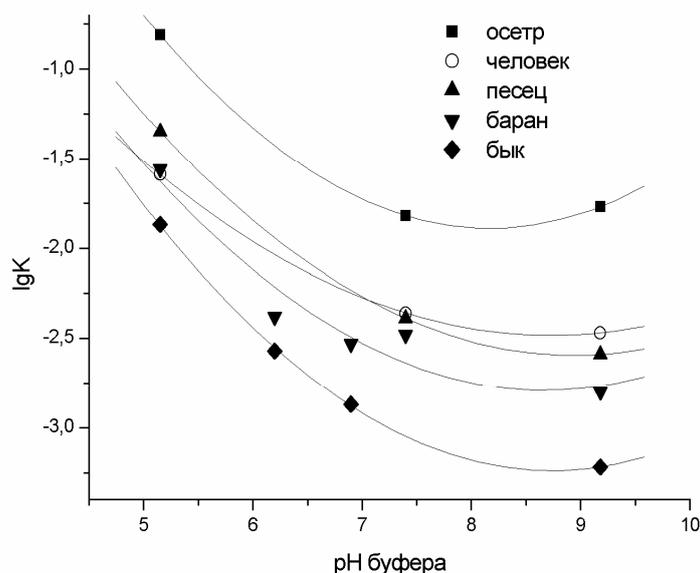
Обнаружена зависимость скорости реакции автоокисления от параметров среды. При низких температурах процесс спонтанного окисления гемоглобинов млекопитающих происходит медленно: в препарате гемоглобина человека накопление 50% метгемоглобина при 4°C происходит в течение месяца, а при температуре 26°C — за 132 часа (Стародуб, Назаренко, 1987). Повышение температуры, как и ионной силы раствора, способствуют переходу гемоглобина из окси- в мет-форму.

Зависимости констант скорости реакции автоокисления при  $t = 43^\circ\text{C}$  от pH раствора для исследованных гемоглобинов представлены на рисунке. Снижение pH приводит к ускорению реакции. При низких значениях pH 5,15 автоокисление начиналось практически при комнатной температуре. Резкое возрастание константы скорости с уменьшением pH, очевидно, является следствием выраженной взаимосвязи между взаимодействием протонов и кислорода с молекулой гемоглобина.

Скорость автоокисления гемоглобина осетра была на порядок выше, чем у гемоглобинов млекопитающих. Это, возможно, связано с адаптационными изменениями свойств гемоглобинов пойкилотермных животных, приводящими к лабильности связи молекулы белка с кислородом (Misra, Fridovich, 1972; Wilson, Knowles, 1987).

Скорости автоокисления высокоаффинных гемоглобинов человека и псаца в изученном диапазоне pH были больше, чем у представителей жвачных млекопитающих (быка и барана). При сопоставлении с полученными нами ранее (Борисова, Горюнов, 1997) и приведенными во введении данными обнаруживается качественное соответствие между способностью гемоглобинов к автоокислению и устойчивостью соответствующих эритроцитов к температурному лизису. Позвоночные, характеризующиеся более высокой скоростью автоокисления гемоглобинов (человек, песец, осетр), имеют эритроциты, существенно менее устойчивые к термогемолиту по сравнению с эритроцитами барана и быка, гемоглобины которых окисляются с меньшей скоростью.

В основе этой взаимосвязи могут лежать свободно-радикальные процессы, сопутствующие автоокислению гемоглобинов. Известно, что гемоглобин взаимодействует с мембраной эритроцита, а на мембране существуют участки связывания этого пигмента как с белками, так и с фосфолипидами. Активные формы кислорода, образующиеся в каскаде реакций автоокисления, индуцируют процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах, а также модифицируют мембраносвязанные белки. Метформа гемоглобинов, которая является результатом реакции автоокисления, содержит железо гема в окисленной форме ( $\text{Fe}^{3+}$ ) и также может активизировать в клеточных мембранах ПОЛ.



Зависимость константы скорости (lgK) реакции автоокисления гемоглобинов от pH буфера (43°C)

Эти процессы сопровождаются выделением атакующих строму эритроцита супероксид-аниона  $O_2^-$  и перекиси водорода и являются существенным фактором повреждения мембран эритроцитов, которые оказываются менее устойчивыми к гемолизу. Косвенно такое предположение подтверждается и тем фактом, что эритроциты рыб, у которых степень ненасыщенности липидов мембран в целом заметно выше, чем у теплокровных животных, проявляли наименьшую устойчивость к тепловому повреждению, поскольку наиболее подвержены ПОЛ ненасыщенные жирные кислоты (линолевая, арахидоновая, докозоексаеновая).

Вместе с тем, на основании уравнения (1) прослеживается взаимосвязь между сродством гемоглобина к кислороду и скоростью автоокисления. Скорость автоокисления исходной формы  $Hb(Fe^{2+})O_2$  определяется ее концентрацией, которая зависит от сродства. Чем сильнее  $R \rightleftharpoons T$ -равновесие сдвинуто в сторону высокоаффинной R-конформации, тем выше концентрация  $Hb(Fe^{2+})O_2$ . Так, у гемоглобинов жвачных равновесие между R- и T- формами изначально сдвинуто в сторону низкоаффинной конформации и влияние снижения pH на скорость автоокисления не столь выражено (см. рис.).

## Выводы

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу того, что имеет место существенная взаимосвязь между функциональ-

ным состоянием гемоглобина (сродством к кислороду) и эритроцита (устойчивостью к лизису). В основе этой взаимосвязи лежит большая способность гемоглобинов с высоким сродством к автоокислению, которое обуславливает понижение терморезистентности эритроцитов.

## Литература

- Борисова А. Г., Горюнов А. С.* 1997. Термогемолиз эритроцитов, различающихся по сродству гемоглобина к кислороду // Журн. эвол. биох. физиол. Т. 33. №2. С. 142-147.
- Стародуб Н. Ф., Назаренко В. И.* 1987. Гетерогенная система гемоглобина. Киев: Наукова думка. 200 с.
- Antonini E., Brunori M.* 1971. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands // *Frontiers of biology*, V.21 / Eds Neuberger A., Tatum E.L. Amsterdam-London: North Holland Publishing Company. P. 1-152.
- Benesh R. E., Benesh R. and Yung S.* 1973. Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures // *Analytical Biochem.* V.55 N1. P.245-248.
- Misra H. P., Fridovich I.* 1972. The Generation of Superoxide Radical during the Autoxidation of Hemoglobin // *J. Biol. Chem.* V. 247. N 21. P. 6960-6962.
- Van Assendelft O. W.* 1970. Spectrophotometry of haemoglobin derivatives. Assen, Netherlands: Royal Vangorcum Ltd.
- Wilson R. R., Knowles F. C.* 1987. Temperature adaptation of fish hemoglobins reflected in rates of autoxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* V. 255. N 1. P. 210-213.