

УДК Т612.115.3-615.273.53

## РОЛЬ ГАПТОГЛОБИНА В ЗАЩИТЕ ОРГАНИЗМА ОТ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ГЕМОГЛОБИНА

© 2023 г. М. Г. Голубева\*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

\*e-mail: Mgolubeva46@mail.ru

Поступила в редакцию 16.11.2022 г.

После доработки 19.12.2022 г.

Принята к публикации 19.12.2022 г.

Представлены современные отечественные и зарубежные литературные данные о белке плазмы крови гаптоглобине, его строении, синтезе, функции и взаимодействии с гемоглобином. Показана способность гаптоглобина при взаимодействии с гемоглобином снижать токсическое действие последнего. Приводится описание клинических исследований такого взаимодействия при разных патологических состояниях – при сахарном диабете, серповидно-клеточной анемии, малярии, сепсисе и т.д. Отмечается, что разработка новых производных гаптоглобина может способствовать предотвращению токсичности гемоглобина при гемолитических заболеваниях.

*Ключевые слова:* гаптоглобин, гемоглобин, гемолиз, гемолитические заболевания

DOI: 10.31857/S0042132423020059, EDN: KMBVCP

### ВВЕДЕНИЕ

Из клинической практики известно, что многие тяжелые патологические состояния – малярия, серповидно-клеточная анемия, сепсис, сахарный диабет – а также осложнения при тяжелой физической нагрузке и т.д. сопровождаются внутриклеточным гемолизом с образованием свободного гемоглобина (Hb), который обладает очень высокой токсичностью. Многие наследственные и приобретенные гемолитические анемии, в том числе сопряженные с гемоглобинопатиями, нарушениями комплемента и инфекционными заболеваниями, связаны с внутрисосудистым гемолизом. Разрушение эритроцитов в сосудистой системе приводит к системному воспалению, вазомоторной дисфункции, тромбофилии и пролиферативной васкулопатии (Yalamanoglu et al., 2018; van Avondt et al., 2019).

В норме обычно наблюдается внутриклеточный гемолиз, так как часть эритроцитов ежедневно разрушается, преимущественно в селезенке, а освободившийся Hb превращается в билирубин. Естественный гемолиз представляет собой непрерывную цепочку химических процессов, в результате которых состав эритроцитов обновляется при условии нормального функционирования структур ретикулоэндотелиальной системы (Голубева, 2019). Основным осложнением гемолиза является освобождение большого количества Hb в кровотока и последующее образование вредных метаболитов, в частности лабильного гема. Защит-

ные механизмы – связывание гаптоглобина (Hр) и еще одного защитного белка плазмы гемопексина (Hрх) с гемом и ферментативное расщепление гем-оксигеназой – ограничивают токсичность молекул внеклеточного Hb при гемолизе. При гемолитических заболеваниях высокие уровни продуктов гемолиза снижают возможности этих защитных систем, что вызывает повышение окислительного и провоспалительного риска (Graw et al., 2017). Это актуально у пациентов в критическом состоянии, так как внеклеточный Hb вызывает сужение сосудов путем истощения эндогенного оксида азота NO, окислительного стресса и воспаления. Кроме того, внеклеточный Hb вызывает повреждение тканей, способствуя почечной недостаточности и повреждению слизистой кишечника. Высокий уровень смертности при сепсисе также связан с повышением концентрации внеклеточного Hb. В норме комплексы Hb–Hр и Hрх–гем выводятся из плазмы, поглощаемые печенью или селезенкой (Graw et al., 2018).

### РОЛЬ ГЕМОЛИЗА В РАЗВИТИИ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ

Часто одним из неблагоприятных последствий массивного гемолиза является повреждение почек, которое повышает подверженность гемолитическим заболеваниям и вероятность смертности от них. Внутрисосудистая деструкция эритроцитов и

связанное с ней накопление гемопротеинов могут вызывать повреждение почек через ряд механизмов, включая окислительный стресс, через прямые или косвенные (посредством активации нейтрофилов и моноцитов) провоспалительные эффекты (van Avondt et al., 2019).

Однако далеко не всегда гемолиз вызывает тяжелые последствия и носит патологический характер. Хотелось бы обратить внимание на различные факторы, способствующие развитию анемии, связанной с физической нагрузкой. Они включают увеличение объема плазмы, окислительный стресс, вызванный физической нагрузкой, повышение температуры тела, ацидоз, желудочно-кишечное кровотечение, острое и хроническое воспаление, а также сжатие и повреждение эритроцитов в капиллярах, внутри сокращающихся мышц (Lippi, Sanchis-Gomar, 2019). Гемолиз, вызванный физической нагрузкой, можно условно определить как разрыв и разрушение эритроцитов во время физических упражнений. Значительная степень гемолиза при этом является обычным явлением после бега на дистанции любой протяженности (короткие, средние, длинные и сверхдлинные), что отражается в снижении H<sub>r</sub> в сыворотке или плазме и в повышении концентрации свободного H<sub>b</sub> в плазме. Такой внутрисосудистый гемолиз обычно незначителен и полностью исчезает в течение 24–48 ч. Показатели степени тяжести и точность их определения могут зависеть от метода определения внутрисосудистого гемолиза, от тренированности спортсмена, а также от количества, частоты и интенсивности соприкосновений стоп с поверхностью, но не от техники бега. Во время упражнений на выносливость осмотическая резистентность и структура мембран эритроцитов значительно изменяются. Как отмечают многие исследователи, прямое механическое повреждение, вызванное сильным ударом стопы о землю, повторяющаяся мышечная сократительная активность и сужение сосудов во внутренних органах являются тремя потенциальными источниками гемолиза, вызванного физической нагрузкой. Метаболические нарушения, развивающиеся во время тренировки, могут активно усиливать и ускорять гемолиз. Авторы полагают, что пациенты с эритроцитарными нарушениями могут быть особенно уязвимы к развитию гемолиза, вызванного физической нагрузкой (Lippi et al., 2012). Тем не менее установлено, что бег на длинные дистанции не вызывает клинически значимых изменений уровня H<sub>b</sub>, гематокрита, количества эритроцитов или концентрации калия. Значительное снижение H<sub>r</sub> после тренировки отражает определенную степень гемолиза, но концентрация внеклеточного H<sub>b</sub>, остающаяся ниже 0.5 г/л, и незначительное изменение количества эритроцитов указывают на то, что гемолиз при ударе стопы очень умеренный или даже клинически незначительный (Lippi et al., 2012; Nishiie-Yano et al., 2020).

## СТРОЕНИЕ ГАПТОГЛОБИНА

Установлено, что многие из побочных эффектов свободного H<sub>b</sub> могут быть ослаблены поглотителем H<sub>b</sub> белком острой фазы – H<sub>r</sub>. H<sub>r</sub> открыт в 1938 г., его название образовано от слова *harto* (лат.) – связывать. Это тетрамерный гликопротеин с молекулярной массой 200–250 кД, участвующий в защите организма от вредного воздействия свободного H<sub>b</sub>, способный связывать H<sub>b</sub>, предотвращая таким образом потерю железа и повреждение почек. В плазме его обычно 1 г/л. Он синтезируется в печени и постоянно присутствует в плазме крови. Под действием гормона роста, инсулина, эндотоксинов бактерий, простагландинов и цитокинов синтез H<sub>r</sub> возрастает. Уровень H<sub>r</sub> снижается при циррозе печени, гемоглобинурии, гемофилии, гемолитических анемиях. Повышение уровня H<sub>r</sub> наблюдается при реакциях острой фазы, холестазе, болезни Ходжкина, коллагенозах, сепсисе, пневмонии, опухолях и др. (Alayash et al., 2013; Di Masi et al., 2020). При воспалении он выполняет функцию антиоксиданта, уменьшая повреждение клеток, препятствует росту некоторых бактерий, подавляет воспаление, снижает синтез простагландинов. Он стимулирует рост сосудов и участвует в регуляции иммунной системы (Шутов, [ayudogov.ru](http://ayudogov.ru)). H<sub>r</sub> также играет роль в модуляции многих аспектов реакции острой фазы.

Подробно изучены (Di Masi et al., 2020) особенности строения H<sub>r</sub>, и показано, что основная молекула H<sub>r</sub> представляет собой тетрамерный белок, построенный из двух  $\alpha/\beta$ -димеров. Каждый  $\alpha/\beta$ -димер H<sub>r</sub> кодируется одним геном и синтезируется в виде одного полипептида. После посттрансляционного протеазозависимого расщепления полипептида H<sub>r</sub>  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи соединяются дисульфидными мостиками остатком Cys15 каждой  $\alpha$ -цепи с образованием зрелого белка H<sub>r</sub>.

Ген H<sub>r</sub> демонстрирует полиморфизм, причем различные генотипы не обладают одинаковой способностью бороться с эффектами свободного H<sub>b</sub> (Fotsing et al., 2021). Поскольку ген H<sub>r</sub> человека характеризуется двумя общими аллелями H<sub>r</sub>1 и H<sub>r</sub>2, могут возникнуть три основных генотипа: H<sub>r</sub>1-1, H<sub>r</sub>2-1 и H<sub>r</sub>2-2 (Di Masi et al., 2020). Эти три структурных аллеля контролируют синтез основных фенотипов H<sub>r</sub>: гомозиготных H<sub>r</sub>1-1 и H<sub>r</sub>2-2 и гетерозиготных H<sub>r</sub>2-1, которые наследуются. Продукты аллелей H<sub>r</sub>1-1 и H<sub>r</sub>2-1 отличаются только одной аминокислотой, тогда как аллель H<sub>r</sub>2-2 является результатом слияния H<sub>r</sub>1-1 и H<sub>r</sub>2-1, присутствует только у людей и дает начало более длинной  $\alpha$ -цепи (Polticelli et al., 2008).

Многочисленные исследования показывают, что по фенотипу H<sub>r</sub> можно судить об индивидуальной предрасположенности человека к различным заболеваниям. Авторы (Naryzny, Legina, 2021) установили, что H<sub>r</sub> претерпевает различные

посттрансляционные модификации (ПТМ). Это структурные превращения (удаление сигнального пептида, расщепление молекулы-предшественника рге-Нр на две субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$ , ограниченный протеолиз  $\alpha$ -цепей, образование дисульфидных связей, мультимеризация), а также химические модификации  $\alpha$ -цепи и гликозилирование  $\beta$ -цепи. Гликозилирование  $\beta$ -цепи на четырех участках Asn — наиболее важная переменная ПТМ, которая регулирует структуру и функцию гликопротеина. Изучение модифицированных олигосахаридов  $\beta$ -цепи Нр стало основным направлением в изучении патологических процессов, в том числе злокачественных новообразований. Эти характеристики указывают на возможность существования Нр в виде множества протеоформ, вероятно, выполняющих различные функции. Гаптоглобины различных фенотипов могут быть разделены капиллярным электрофорезом. Они могут индуцировать расщепление  $\alpha$ -2-глобулиновой зоны в электрофоретическом паттерне. Фенотипы Нр1-1 и Нр2-1 индуцируют значительное и умеренное расщепление зоны  $\alpha$ -2-глобулина соответственно, тогда как Нр2-2 этого не делает. Гемолиз *in vitro* и миграция моноклонального компонента (то есть свободной от иммуноглобулина легкой цепи) также могут индуцировать расщепление  $\alpha$ -2-глобулиновой зоны. В повседневной практике наличие фенотипов Нр1-1 и Нр2-1 в отчете об электрофорезе предупреждает клинициста о возможных патологических последствиях (Simon et al., 2020).

Обладание определенным фенотипом может обеспечить значительную защиту от развития некоторых расстройств: респираторных, сердечно-сосудистых и аутоиммунных заболеваний, злокачественных новообразований. Таким образом, знание фенотипа может помочь в прогнозе заболевания и позволить лучше адаптировать лечение к потребностям человека (Wassel, 2000).

## МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СВОБОДНОГО ГЕМОГЛОБИНА

Внеклеточный Нб признан триггером заболевания при гемолитических состояниях. Признаки первичных физиологических гемолитических состояний — серповидно-клеточной анемии, малярии, сепсиса — вероятно, вызванные свободным Нб, часто обнаруживаются в сердечно-сосудистой системе. В качестве потенциального механизма рассматривается токсичность Нб. Молекулярные механизмы этой токсичности, а также защитной активности Нр все еще не ясны.

Некоторые авторы предположили возможный биологический механизм для объяснения повышенного риска ишемической болезни сердца у лиц с гипергликемией и с генотипом Нр2-2 (Cahill et al., 2013). Нб, высвобождаемый из эритроцитов, быстро связывается с Нр с образованием комплекса Нр-Нб,

который подвергается клиренсу рецептором-поглотителем CD163. Однако этот клиренс CD163 нарушается при Нр2, а также в условиях гипергликемии *in vivo*, что приводит к увеличению количества циркулирующего комплекса Нр2-Нб у индивидуумов Нр2-2 с гипергликемией. Авторы показали, что гликозилирование Нб ухудшает способность белка Нр2-2 действовать в качестве антиоксиданта, что приводит к повышенной окислительной активности гликозилированного комплекса Нр2-Нб. Прооксидантный комплекс Нр2-Нб может связываться с липопротеинами высокой плотности — HDL (high-density lipoprotein) и продуцировать активные формы кислорода, которые окисляют холестерин и связанные с ним компоненты — аполипопротеин А (Apo1), глутатионпероксидазу (GPx) и лецитин-холестериновую ацетилтрансферазу (LCAT) — снижая функцию HDL (Cahill et al., 2013). Связываясь с Нб, они образуют комплекс, который поглощается клетками ретикулоэндотелиальной системы селезенки, претовращая стимуляцию им перекисного окисления липидов и образования свободных радикалов. Железо из Нб возвращается в образующиеся эритроциты, то есть Нр участвует в обмене железа в организме. Усиленный распад эритроцитов в кровяном русле приводит к увеличению поступления Нб и, соответственно, снижению уровня Нр, что является признаком внутрисосудистого гемолиза (Голубева, 2020; Levy et al., 2010).

Исследована (Levy et al., 2010) структурная, биохимическая и клеточная биологическая природа токсичности Нб в эндотелиальной клеточной системе в условиях перекисного стресса. Определены два основных механизма окислительной токсичности Нб, которые опосредованы продуктами деградации глобина и модифицированными видами липопротеинов соответственно. Эти два пути повреждения вызывают разнообразные воспалительные и цитотоксические реакции. Нр обеспечивает структурную стабилизацию Нб и защищает окислительные реакции Нб с липопротеинами, обеспечивая защиту от обоих путей токсичности. С помощью этих механизмов Нр смещает разрушительную псевдоперекисляющую реакцию Нб на потенциальную антиоксидантную функцию во время перекисного стресса (Schaer et al., 2013). Побочные эффекты повышенного Нб плазмы частично опосредованы истощением NO и приводят к сужению сосудов.

В настоящее время в качестве заменителя эритроцитов на основе Нб разрабатывается полимеризованный Нб (PolyHb) — перспективный носитель кислорода. К сожалению, коммерчески разработанные продукты состоят из молекул с низкой молекулярной массой — LMW (low molecular weight), которые удаляют NO и приводят к сужению сосудов и гипертонии. Нр в сочетании с очищенным апогемоглобином (apoHb), погло-

щающим гем, является потенциальным кандидатом на облегчение прессорного эффекта PolyHb. Авторами (Guéye et al., 2006; Buechler et al., 2020) оценивался защитный потенциал введения комплекса ароHb–Hr для смягчения вазоактивного ответа, вызванного переливанием LMW-PolyHb. Связывание Hr с PolyHb характеризовалось *in vitro*. При введении ароHb–PolyHb оценивали сосудосуживающие и прессорные эффекты PolyHb путем измерения системной и микроциркуляторной гемодинамики. Переливание LMW-PolyHb увеличивало среднее артериальное давление при одновременном снижении диаметра артериол и функциональной плотности капилляров. Однако переливание LMW-PolyHb животным, предварительно получавшим ароHb–Hr, предотвращало изменения среднего артериального давления, частоты сердечных сокращений, диаметра артериол, кровотока и функциональной плотности капилляров по отношению к уровню до переливания. Эти результаты показывают, что увеличение размера PolyHb после связывания с комплексом ароHb–Hr может помочь разделить PolyHb в сосудистом пространстве и, таким образом, уменьшить поглощение NO и токсичность, ответственную за сужение сосудов и системную гипертензию (Guéye et al., 2006; Buechler et al., 2020).

### МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГАПТОГЛОБИНА И ГЕМОГЛОБИНА

Несмотря на подробную изученность Hb, его окислительная токсичность, связанная с циркуляцией свободного Hb, и его вклад в воспаление и осложнения при переливании крови только недавно стали активно исследоваться. Новое понимание защитных механизмов Hr и рассмотрение кристаллической структуры комплекса Hb–Hr позволили окончательно связать функциональное и структурное взаимодействие между двумя белками. Современные данные о взаимодействиях между Hb и Hr в условиях окислительного стресса и о том, как используются собственные повреждающие радикалы Hb, приводятся во многих исследованиях. Рассматриваются также потенциальные терапевтические преимущества использования Hr для инактивации и клиренса свободного Hb в ряде клинических условий (Alayash et al., 2013; Sargong-Kumankomah et al., 2022). Образовавшийся комплекс Hb–Hr направляется в систему макрофагов, в которых высвобождаются молекулы железа. Комплекс быстро выводится из кровотока с помощью специфического рецептора CD163 (Carter, Worwood, 2007). Попадая в систему кровообращения, железо соединяется с белком трансферрином и поступает в костный мозг для образования новых эритроцитов.

Рецептор поглотителя Hb – CD163 – макрофаг-специфический белок, и повышенная экс-

прессия этого рецептора – одно из основных изменений в переходе макрофагов на альтернативные активированные фенотипы при воспалении. Соответственно, высокая экспрессия CD163 в макрофагах характерна для тканей, реагирующих на воспаление. Удаление окислительного и провоспалительного Hb, приводящее к стимуляции гем-оксигеназы-1 и производству противовоспалительных метаболитов гема, указывает на то, что CD163 косвенно способствует противовоспалительной реакции. Таким образом, CD163 является потенциальным биомаркером воспаления и терапевтической мишенью, и эта биомаркерная форма CD163 представляет собой растворимый плазменный CD163, который возникает в результате повышенного выделения CD163, опосредованного ферментом расщепления – фактором некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Из литературы известно, что плазменный уровень растворимого CD163 повышен в большом спектре острых и хронических воспалительных заболеваний. Как правило, повышение уровня CD163 гораздо более выражено при острых воспалениях – бактериемии, сепсисе, где уровень CD163 имеет отрицательную корреляцию с выживаемостью (Meher et al., 2021).

Мембранная форма CD163 в макрофагах представляет собой мишень для лекарств, направленных на макрофаги при воспалении. На модели воспаления у животных (крысы, мыши, свиньи) для значительного увеличения терапевтического индекса противовоспалительного глюкокортикоидного препарата, использовали антитела против CD163. В других исследованиях, выполненных также на животных, показано, что инъекции Hr ослабляют повреждения, вызванные Hb после переливания крови. Учитывая результаты экспериментов для оценки диагностических и терапевтических свойств этого белка, необходимо провести дальнейшие клинические исследования (Etzerodt, Moestrup, 2013).

Говоря о защитном действии Hr, необходимо кратко остановиться на другом защитном белке плазмы крови – Hrx. Это бета-1В-гликопротеин с молекулярной массой 63 кД, состоящий из одной полипептидной цепи, включающей 439 аминокислотных остатков. Этот белок кодируется геном *hpx* и принадлежит к семейству белков гемопексинов. Он обладает самым высоким родством к связыванию с гемом. Поступление Hrx и последующее его связывание со свободным гемом не только предотвращают его прооксидантное и провоспалительное действие, но и способствуют детоксикации свободного гема.

Как уже отмечалось, токсическое действие Hb связано не только с оксидативным стрессом и появлением свободных радикалов, но и с истощением NO, что приводит к сужению сосудов и гипертензии. В экспериментах на мышах линии CS781/6

проверена способность человеческих Нр или Нрх ингибировать неблагоприятные эффекты поглощения NO циркулирующим мышинным Нб. У здоровых бодрствующих мышей системные гемодинамические эффекты внутривенной коинфузии внеклеточного Нб и Нрх сравнились с гемодинамическими эффектами инфузии свободного Нб или только контрольного белка (альбумина). При этом изучались гемодинамические эффекты введения Нб и Нр, а также инъекции либо Нб, либо только альбумина мышам, которых кормили диетой с высоким содержанием жиров – HFD (high-fat diet), и мышам с диабетом. Сочетание Нр, но не Нрх, со свободным Нб в весовом соотношении 1 : 1 предотвращало системную гипертензию, вызванную Нб, у здоровых бодрствующих мышей. У мышей, получавших HFD, и у мышей с диабетом коинфузия Нр, смешанного с равной массой свободного Нб, не снимала гемоглобин-индуцированную гипертензию. Нр сохранил свободный Нб в плазме, но ни Нр, ни Нрх не влияли на способность Нб поглощать NO *ex vivo*. Авторы (Graw et al., 2017, 2018) полагают, что у здоровых мышей линии CS781/6 с нормальным эндотелием одновременное назначение Нр, но не Нрх, со свободным Нб предотвращает острую системную гипертензию, вызванную Нб, путем разделения Нб в плазме. При заболеваниях мышей, связанных с эндотелиальной дисфункцией, терапия Нр, по-видимому, недостаточна для предотвращения вазоконстрикции, вызванной Нб, поскольку лечение таким же количеством Нр не способно предотвратить вызванное Нб сужение сосудов у мышей с гиперлипидемией или сахарным диабетом – расстройствами, которые связаны с эндотелиальными нарушениями.

Интересное исследование было проведено *in vitro*, чтобы определить различаются ли фенотипы Нр по их защитному действию против окислительного стресса, вызванного внеклеточным Нб. Показано, что в мембранах эритроцитов человека в присутствии Нб и различных концентраций трех типов очищенного Нр наиболее активным показал себя Нр1-1, а Нр2-2 – наименее активным по защитному действию. Сообщается (Polticelli et al., 2008), что удалось впервые полностью смоделировать оба варианта Нр с их базовыми четвертичными структурами. Антиоксидантная роль Нр и фенотипическая зависимость подтверждены для предотвращения возможного окислительного повреждения, вызванного свободным Нб и высвобождением железа во время его катаболизма.

#### РОЛЬ ГАПТОГЛОБИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

В настоящее время известно множество факторов, способных поражать эритроциты. Прежде всего это наследственные дефекты эритроцитов

(гемоглобина, мембран, ферментов). Эритроциты могут поражаться при инфекционных заболеваниях – малярии, газовой гангрене, при поражении гемолитическими ядами. Усиленный распад эритроцитов может происходить при гемодиализе или при переливании несовместимой группы крови и после различных операций. Во всех случаях возникает гемолитическая анемия (Dhaliwal et al., 2004).

Поскольку Нр продуцируется паренхимой печени, ее гепатоциты способствуют повышению Нр в крови. Но биохимический анализ крови не всегда подтверждает факт возрастания концентрации Нр.

С одной стороны, Нр действует как антиоксидант, а с другой – как мощный иммунодепрессор функции лимфоцитов, и моделирует баланс Т-хелперов 1-го и 2-го типов в организме (Sadrzadeh, Vozorgmehr, 2004). При гемолизе, сопровождающем воспалительные реакции, количество Нб в крови очень велико. Поэтому требуется создание тяжело дисперсных комплексов и их транспортировка в систему макрофагов. В этом случае концентрация Нр должна уменьшаться. Для получения объективной картины без учета действия гемолиза важно сравнить полученные результаты с аналогичными тестами, полученными при диагностировании других белков из категории острофазных протеинов (Шутов, ayzdorov.ru).

Было продемонстрировано несколько функциональных различий между фенотипами Нр, которые, по-видимому, имеют важные биологические и клинические последствия. Полиморфизм Нр связан с распространенностью и клиническим развитием многих воспалительных заболеваний, включая инфекции, атеросклероз и аутоиммунные заболевания. Эти эффекты объясняются фенотипически зависимой модуляцией окислительного стресса и синтеза простагландинов. В последнее время появляется все больше данных о том, что Нр также участвует в иммунном ответе. Сильное генетическое давление, благоприятствующее фенотипу 2-2, предполагает важную роль Нр в патологии человека (Langlois, Delanghe, 1996; Cahill et al., 2013).

Как отмечают некоторые авторы (Alayash et al., 2013; Di Masi et al., 2020), поскольку Нр синтезируется в печени, ее повреждение приводит к снижению концентрации белка. При повреждении почек многие белки теряются с мочой, например Нр1-1 – форма Нр с наименьшей молекулярной массой. При аутоиммунных заболеваниях повышается активность фермента, участвующего в синтезе Нр, и его концентрация в крови нарастает.

Особое внимание уделяется серповидно-клеточной анемии (СКА) – наследственному заболеванию, обусловленному синтезом аномального гемоглобина S (HbS), изменением формы и свойств эритроцитов крови. При этом в крови присутствуют эритроциты серповидной формы. Дефект

структуры Hb характеризуется заменой глутаминовой кислоты валином в  $\beta$ -полипептидной цепи. Образующийся при этом HbS после потери присоединенного кислорода приобретает консистенцию высокополимерного геля и становится в 100 раз менее растворимым, чем нормальный HbA. В результате этого эритроциты, несущие дезоксигемоглобин S, деформируются и приобретают характерную полулунную (серповидную) форму. Измененные эритроциты становятся ригидными, малопластичными, могут закупоривать капилляры, вызывая ишемию тканей, легко подвергаются аутогемолизу ([krasotaimedicina.ru/diseases](http://krasotaimedicina.ru/diseases); Dhaliwal et al., 2004; Gbotosho et al., 2021).

Белки плазмы Hр и Hрх могут снижать внеклеточный Hb и общую липидно-окислительную способность гема плазмы, но истощаются при СКА. У больных с СКА, проходящих регулярную обменно-трансфузионную терапию, оценивали уровень окисления липидов. Образование малонового диальдегида – конечного продукта перекисного окисления липидов – увеличено у пациентов с СКА, по сравнению с контрольной группой. У пациентов степень окисления липидов связана с отсутствием Hр, а также со снижением Hрх в образцах плазмы. В посмертной легочной ткани, полученной от умерших от СКА, обнаружено окисленное отложение липопротеинов низкой плотности в легочной артерии. Отсутствие Hр и снижение уровня Hрх приводит к потере защиты от свободного Hb и от общего, опосредованного гемом, окисления липопротеинов низкой и высокой плотности и к повреждению тканей. Стратегия защиты от окисления липидов плазмы внеклеточным Hb и общим плазменным гемом (например, терапевтическая замена Hр и Hрх) может уменьшить вредное воздействие внеклеточного Hb и общего плазменного гема на сосудистую систему при СКА (Fotsing et al., 2021).

Многие авторы отмечают, что заболеваемость СКА распространена, главным образом, в странах Африки, Ближнего и Среднего Востока, Средиземноморского бассейна, Индии. Здесь частота носительства HbS среди коренного населения может достигать 40%. Так, при сопоставлении показателей крови пациентов с разной степенью тяжести СКА в Западном Камеруне сравнивали влияние разных генотипов Hр на гематологические показатели, а также клинические проявления тяжести заболевания. Генотип Hр 102 серповидно-клеточных пациентов (SS) и 115 здоровых лиц (60 AA и 55 AS) определяли аллельспецифической полимеразной цепной реакцией. Результаты показали, что генотип Hр2-2 был достоверно чаще ( $p < 0.05$ ) представлен у пациентов с SS (54%), чем в контрольной группе AA и AS (27% и 29% соответственно), в то время как Hр2-1 был в основном обнаружен ( $p < 0.05$ ) в AS (42%) и AA. Распределение генотипов Hр не выявило каких-то существенных различий по гематологическим пара-

метрам между больными СКА и контрольной группой и по клиническим проявлениям тяжести заболевания между группами больных. Однако авторы отмечают, что необходимо комплексное исследование для изучения полиморфизма Hр (с учетом антиоксидантного, липидного профилей и функциональности некоторых тканей при СКА) в Камеруне и других странах южных регионов (Fotsing et al., 2021; Meher et al., 2021).

Другая группа наследственных заболеваний – талассемии, развившиеся в результате нарушения соотношения  $\alpha$ - или  $\beta$ -цепей специального белка глобина, образующего Hb. Талассемия проявляется гемолитической анемией различной степени выраженности.  $\alpha$ -Талассемия – результат недостаточного образования  $\alpha$ -глобиновых цепей.  $\beta$ -Талассемия – результат недостаточного синтеза  $\beta$ -глобиновых цепей (Сметанина, 2022).

СКА и талассемия – это гемоглобинопатии, характеризующиеся хроническим гемолизом.

Известно, что после субарахноидального кровоизлияния в головном мозге происходит длительное воздействие токсического свободного Hb. Большая его часть не вступает в комплекс с Hр, присутствующим в очень низких концентрациях в мозге. В первые две недели после субарахноидального кровотечения экзогенно добавляемый Hр связывается со свободным Hb, что рассматривается как его терапевтическое действие. В экспериментах на мышцах-самцах C57BL/6 показано, что моделирование субарахноидального кровоизлияния приводило к различным нарушениям в поведении животных. При этом вызванные Hb микроглиальные и синаптические изменения ослаблялись Hр. Лечение не ослабляло спазма крупных сосудов мозга, но улучшало клинический результат, ограничивая диффузию Hb в паренхиму и уменьшая спазм мелких сосудов. Авторы полагают, что токсичность Hb может быть предотвращена Hр независимо от спазма крупных сосудов (Garland et al., 2020).

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) – тяжелое заболевание, связанное с ожирением и повышенным окислительным стрессом. В литературе представлены исследования, в которых оценивали связь между уровнями Hр, полиморфизмом гена Hр1–Hр2 и клиническими и лабораторными параметрами у пациентов с СД2. Выборка исследования состояла из 102 пациентов с СД2 и 62 контрольных – без СД2. Уровни Hр измеряли с помощью иммуноферментного анализа, а генотипирование Hр проводили с использованием специальной двухступенчатой полимеразной цепной реакции. Установили, что уровень Hр выше у пациентов с СД2, по сравнению с контрольной группой. Пациенты с СД2 с высоким кровяным давлением имели более высокие уровни Hр, чем пациенты без этой сопутствующей патологии. Пациенты с ожирением и СД2 имели более высокие уровни

Hp, по сравнению с контрольной группой с ожирением и с пациентами с СД2 без ожирения. Эти результаты свидетельствуют о том, что на уровне Hp влияет полиморфизм Hp1–Hp2, ожирение, воспалительный статус и высокое кровяное давление (Rodrigues et al., 2019; Deckmyn et al., 2022). Некоторые авторы полагают: лица с генотипом Hp2-2 и с СД, по-видимому, подвергаются значительно более высокому риску микрососудистых и макрососудистых осложнений. Фармакологическая стратегия введения доз антиоксидантов конкретно лицам с СД2 и Hp2-2 может быть клинически эффективной (Asleh et al., 2005; Levy et al., 2010).

У пациентов с ожирением развивается хроническое воспалительное состояние, в результате чего возникают осложнения, причем источником большинства воспалительных молекул является белая жировая ткань – WAT (white adipose tissue), которая при чрезмерном наборе веса инфильтрируется макрофагами и лимфоцитами и претерпевает важные изменения в экспрессии своих генов. Давно известно, что Hp – типичный маркер воспаления и основной носитель свободного Hb – входит в состав печеночной острой фазы ответа, но также по его экспрессии в WAT и в плазме можно судить о степени ожирения (Maffei et al., 2016).

Большое внимание в литературе уделяется изучению связи метаболического синдрома (МС) с уровнем Hp в кровотоке. Хотя печень является основным источником Hp, в исследованиях выявлено, что Hp также секретируется в плазму жировой ткани. Ранее показано, что уровень Hp в сыворотке положительно связан с размерами жировых отложений. Исследования подтверждают более высокие уровни Hp в сыворотке у пациентов с МС и у пациентов с повышенным уровнем или глюкозы, или артериального давления.

Некоторые исследователи при изучении влияния Hp на риски ожирения и кардиометаболической дисфункции обнаружили связь определенных фенотипов белка с потерей веса, вызванной диетой. Пациенты были поделены на группы в зависимости от фенотипа Hp и используемой диетической программы. Фенотипирование выполняли с использованием гель-электрофореза.

Значительное снижение массы тела, окружности талии, уровня инсулина в плазме, свободного Hb обнаруживали женщины с фенотипом Hp1-1. У них отмечены снижение ряда показателей, улучшение общего состояния, снижение степени абдоминального ожирения и повышение чувствительности к инсулину, а также уменьшение выраженности МС при соблюдении низкокалорийной диеты. Результаты этого исследования подтверждают вероятное влияние генов и возможность диеты обуславливать потерю веса (Tang et al., 2020).

Установлено, что у лиц с МС уровни Hb, ферритина, а также эритропоэтина и Hp были выше, чем в контрольной группе. Повышение уровней отдельных белков может быть связано с разными осложнениями при МС: показано, что уровень Hp имеет прямую корреляцию с уровнями и артериального давления, и глюкозы в кровотоке, тогда как уровень Hb был выше при любых отклонениях при МС (Hämäläinen et al., 2012).

В наше время в условиях коронавирусной пандемии изучали взаимосвязь уровней Hp, эритропоэтина, других биохимических показателей сыворотки крови и степени тяжести заболевания COVID-19. Установлено, что уровень Hb значительно ниже у пациентов с тяжелым и умеренным течением болезни, а также в группе умерших. Уровень ферритина, который, как известно, является внутриклеточным депо железа, положительно коррелировал с тяжестью заболевания. Уровень железа достоверно ниже у больных, по сравнению со здоровыми. Обнаружено, что значения Hp значительно ниже в группе интубированных и умерших также, как уровень эритропоэтина (Yağci et al., 2021).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как уже отмечалось ранее, Hp является белком связывания и клиренса Hb в плазме человека и эффективным антагонистом токсичности Hb в результате физиологического оборота красных клеток крови. Однако эндогенные концентрации Hp недостаточны для обеспечения защиты от заболеваний, вызванных Hb, – СКА, сепсиса, реакции переливания, гемолиза различного происхождения, или после субарахноидального кровоизлияния. В результате растет интерес к разработке терапии Hp как блокатора токсичности свободного Hb. Открываются перспективы использования Hp в качестве терапевтического белка (Buechler et al., 2020).

Образование комплекса Hb–Hp снижает окислительные свойства гема Hb и способствует распознаванию макрофагальным рецептором-поглотителем CD163. Это приводит к разрушению комплекса Hb–Hp и катаболизму гема гемоксигеназой и биливердинредуктазой. Генные дубликации части или всего гена Hp в эволюции приматов привели к вариантным продуктам генов Hp, которые в совокупности могут быть обозначены как гаптоглобины (Hps), поскольку все они связывают Hb. Эти вариантные продукты включают в себя специфичные для человека мультимерные фенотипы Hp у индивидуумов. Белок, связанный с Hp (Hpr), – еще один продукт дубликации Hp у человека и других приматов. Об альтернативных функциях варианта Hps свидетельствуют многочисленные сообщения об ассоциации между фенотипами Hp и заболеванием, а также выяснение специфической роли Hpr во врожденной иммунной защите. Изучение структурно-функциональной обуслов-

ленности эффектов Нр дает представление о том, как Нр выполняет важные функции, в частности детоксикации/удаления Нв. Разработка новых производных Нр может способствовать предотвращению токсичности Нв при гемолитических заболеваниях. Кроме того, новые структурные знания позволят идентифицировать еще неизвестные функции, основанные на других, относящихся к патологии, биологических взаимодействиях, связанных с Нps (Andersen et al., 2017).

Нр в основном вырабатывается в печени и функционально важен для связывания свободного Нв с лизированными эритроцитами *in vivo*, предотвращая его токсическое действие. Поскольку уровень Нр истощается в присутствии большого количества свободного Нв, снижение уровня Нр является маркером гемолиза. Несмотря на всю важность и актуальность проблемы, небольшое количество литературы затрудняет интерпретацию результатов. Для тестирования разработаны различные методики, включая спектрофотометрию, иммунореактивные методы и гель-электрофорез. Каждая из них обладает определенными преимуществами и недостатками. До последнего времени нет единого стандарта для определения гемолиза. Все исследования должны опираться на комбинацию факторов, при этом необходимо учитывать возможные различия и ограничения тестирования. Возможно положительные результаты могут возникать при неправильной подготовке образцов, циррозе печени, повышенном уровне эстрогена и гемодилюции, при применении андрогенов и кортикостероидов. Все эти обстоятельства могут затруднять тестирование Нр в условиях воспаления. С учетом широкого использования Нр-тестирования отмечены (Shih et al., 2014) важность понимания принципов и необходимость правильной интерпретации этого теста клиницистами и сотрудниками лабораторий.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты проводили в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF), и с декларацией о гуманном отношении к животным.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Голубева М.Г. Осмотическая резистентность эритроцитов, методы определения и коррекции, значение при различных патологиях // Успехи соврем. биол. 2019. Т. 139. № 5. С. 446–456.

Голубева М.Г. Влияние физической нагрузки на функциональное состояние мембран эритроцитов // Спорт. мед. 2020. Т. 10. № 2. С. 55–64.

Сметанина Н.С. <https://rare-diseases.ru/docs/talas.pdf>

Шутов М.Е. Гаптоглобин — что это такое? Показатели нормы // [https://www.ayzdorov.ru/ttermini\\_gaptoglobin.php](https://www.ayzdorov.ru/ttermini_gaptoglobin.php)

Alayash A.I.A., Andersen F.C.B., Maestrup S.K., Bülow L. Haptoglobin: the hemoglobin detoxifier in plasma // Trends Biotechnol. 2013. V. 31. № 1. P. 2–3.

Andersen C.B.F., Stødkilde K., Sæderup K.L. et al. Haptoglobin // Antioxid. Redox Signal. 2017. V. 26. № 14. P. 814–831.

Asleh R., Guetta J., Kalet-Litman S. et al. Haptoglobin genotype- and diabetes-dependent differences in iron-mediated oxidative stress *in vitro* and *in vivo* // Circ. Res. 2005. V. 96. № 4. P. 435–441.

Belcher D.A., Munoz C., Pires I.S. et al. Apohemoglobin — haptoglobin complexes attenuate the hypertensive response to low-molecular-weight polymerized hemoglobin // Blood Adv. 2020. V. 4. № 12. P. 2739–2750.

Buechler P.W., Humar R., Schaer D.J. Haptoglobin therapeutics and compartmentalization of cell-free hemoglobin toxicity // Trends Mol. Med. 2020. V. 26. № 7. P. 683–697.

Cahill L., Levy A., Chiuve E. et al. Haptoglobin genotype is a consistent marker of coronary heart disease risk among individuals with elevated glycosylated hemoglobin // J. Am. Coll. Cardiol. 2013. V. 61. P. 728–737.

Carter K., Worwood M. Haptoglobin: review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases // Int. J. Lab. Hematol. 2007. V. 29. № 2. P. 92–110.

Deckmyn O., Poynard T., Bedossa P. et al. Clinical interest of serum alpha-2 macroglobulin, apolipoprotein A<sub>1</sub>, and haptoglobin in patients with non-alcoholic fatty liver disease, with and without type 2 diabetes, before or during COVID-19 // Biomedicines. 2022. V. 10. № 3. P. 699.

Dhaliwal G., Cornett P., Tierney L. Hemolytic anemia // Am. Fam. Physician. 2004. V. 69. № 11. P. 2599–2606.

Di Masi A., De Simone G., Ciaccio C. et al. Haptoglobin: from hemoglobin scavenging to human health // Mol. Aspects Med. 2020. V. 73. P. 100851.

Etzerodt A., Moestrup S.K. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects // Antioxid. Redox Signal. 2013. V. 18. № 17. P. 2352–2363.

Fotsing C.B.K., Pieme C.A., Nya P.C.B. et al. Haptoglobin gene polymorphism among sickle cell patients in West Cameroon: hematological and clinical implication // Adv. Hematol. 2021. V. 2021. P. 6939413.

Garland P., Morton M., Haskins W. et al. Haemoglobin causes neuronal damage *in vivo* which is preventable by haptoglobin // Brain Commun. 2020. V. 2. № 1. P. fcz053.

Gbotosho O., Kapetanaki M., Kato J. The worst things in life are free: the role of free heme in sickle cell disease // Front. Immunol. 2021. V. 11. P. 561917.

Graw J.A., Baron D.M., Francis R.C.E. The relevance of hemolysis in anesthesia and intensive care medicine // Anasthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 2018. V. 53. № 4. P. 296–305.



- Graw J.A., Yu B., Rezoagli E. et al. Endothelial dysfunction inhibits the ability of haptoglobin to prevent hemoglobin-induced hypertension // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2017. V. 312. № 6. P. H1120–H1127.
- Guéye P.M., Glasser N., Féraud G., Lessinger J.-M. Influence of human haptoglobin polymorphism on oxidative stress induced by free hemoglobin on red blood cells // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2006. V. 44. № 5. P. 542–547.
- Hämäläinen P., Saltevo J., Kautiainen H. et al. Erythropoietin, ferritin, haptoglobin, hemoglobin and transferrin receptor in metabolic syndrome: a case control study // *Cardiovasc. Diabetol.* 2012. V. 11. P. 116.
- Langlois M.R., Delanghe J.R. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans // *Clin. Chem.* 1996. V. 42. № 10. P. 1589–1600.
- Levy A.P., Asleh R., Blum S. et al. Haptoglobin: basic and clinical aspects // *Antioxid. Redox. Signal.* 2010. V. 12. № 2. P. 293–304.
- Lippi G., Schena F., Salvagno G.L. et al. Foot-strike haemolysis after a 60-km ultramarathon // *Blood Transfus.* 2012. V. 10. № 3. P. 377–383.
- Lippi G., Sanchis-Gomar F. Epidemiological, biological and clinical update on exercise-induced hemolysis // *Ann. Transl. Med.* 2019. V. 7. № 12. P. 270.
- Maffei M., Barone I., Scabia G., Santini F. The multifaceted haptoglobin in the context of adipose tissue and metabolism // *Endocr. Rev.* 2016. V. 37. № 4. P. 403–416.
- Meher S., Mohanty P.K., Patel S. et al. Haptoglobin genotypes associated with vaso-occlusive crisis in sickle anemia patients of Eastern India // *Hemoglobin.* 2021. V. 45. P. 358–364.
- Naryzny S.N., Legina O.K. Haptoglobin as a biomarker // *Biochem. Mosc. Suppl. B Biomed. Chem.* 2021. V. 15. № 3. P. 184–198.
- Nishiie-Yano R., Hirayama S., Tamura M. et al. Hemolysis is responsible for elevation of serum iron concentration after regular exercises in judo athletes // *Biol. Trace Elem. Res.* 2020. V. 197. № 1. P. 63–69.
- Polticelli F., Bocedi A., Minervini G., Ascenzi P. Human haptoglobin structure and function – a molecular modelling study // *FEBS J.* 2008. V. 275. № 22. P. 5648–5656.
- Rodrigues K.F., Pietrani N.T., Carvalho L.M.L. et al. Haptoglobin levels are influenced by Hp1–Hp2 polymorphism, obesity, inflammation, and hypertension in type 2 diabetes mellitus // *Endocrinol. Diabetes Nutr.* 2019. V. 66. № 2. P. 99–107.
- Sadrzadeh S., Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders // *Am. J. Clin. Pathol.* 2004. V. 121. Suppl. S97–104.
- Sarpong-Kumankomah S.K.B., Knox K.B., Kelly M.E. et al. Quantification of human plasma metalloproteins in multiple sclerosis, ischemic stroke and healthy controls reveals an association of haptoglobin–hemoglobin complexes with age // *PLoS One.* 2022. V. 17. № 1. P. e0262160.
- Schaer C.A., Deuel J.W., Bittermann A.G. et al. Mechanisms of haptoglobin protection against hemoglobin peroxidation triggered endothelial damage // *Cell. Death Differ.* 2013. V. 20. № 11. P. 1569–1579.
- Shih A., MacFarlane A., Verhovsek M. Haptoglobin testing in hemolysis: measurement and interpretation // *Am. J. Hematol.* 2014. V. 89. № 4. P. 443–447.
- Simon A., Schneider N., Gillery Ph., Oudart J.-B. Clinical and biological features of haptoglobin phenotypes // *Ann. Biol. Clin.* 2020. V. 78. № 5. P. 493–498.
- Tang K., Huang S., Cheng T. et al. Haptoglobin phenotype influences the effectiveness of diet-induced weight loss in middle-age abdominally obese women with metabolic abnormalities // *Clin. Nutr.* 2020. V. 39. № 1. P. 225–233.
- van Avondt K., Nur E., Zeerleder S. Mechanisms of hemolysis-induced kidney injury // *Nat. Rev. Nephrol.* 2019. V. 15. № 11. P. 671–692.
- Wassel J. Haptoglobin: function and polymorphism // *Clin. Lab.* 2000. V. 46. № 11–12. P. 547–552.
- Yağci S., Serin E., Acicbe O. et al. The relationship between serum erythropoietin, hepcidin, and haptoglobin levels with disease severity and other biochemical values in patients with COVID-19 // *Int. J. Lab. Hematol.* 2021. V. 43. Suppl. 1. P. 142–151.
- Yalamanoglu A., Deuel J.W., Hunt R.C. et al. Depletion of haptoglobin and hemopexin promote hemoglobin-mediated lipoprotein oxidation in sickle cell disease // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2018. V. 315. № 5. P. L765–L774.

## Role of Haptoglobin in Protecting the Toxic Effects of Hemoglobin in Various Pathologies

M. G. Golubeva\*

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

\*e-mail: Mgolubeva46@mail.ru

The review presents modern domestic and foreign literature data on the blood plasma protein haptoglobin, its structure, synthesis, function and interaction with hemoglobin. The ability of haptoglobin in interaction with hemoglobin to reduce the toxic effect of the latter is shown. Clinical studies of such interaction in various pathological conditions such as diabetes mellitus, sickle cell anemia, malaria, sepsis, etc. are described. It is noted that the development of new haptoglobin derivatives can contribute to the prevention of hemoglobin toxicity in hemolytic diseases.

**Keywords:** haptoglobin, hemoglobin, hemolysis, hemolytic diseases