



УДК 547.915.5

**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕМОГЛОБИНА  
С ФОСФОЛИПИДНЫМИ ВЕЗИКУЛЯРНЫМИ МЕМБРАНАМИ  
РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА***Бондаренко С. В., Ушакова И. П., Левит Л. Ф.,  
Серебряникова Г. А., Евстигнеева Р. П.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Изучено влияние состава везикулярных мембран, содержащих в качестве основных компонентов липиды эритроцитарной мембраны, на включение гемоглобина в везикулы и его окисление. Показано, что добавление отрицательно заряженных фосфолипидов, таких, как фосфатидилсерин и фосфатидная кислота, приводит к значительному увеличению связывания гемоглобина. Добавление сфингомиелина не оказывает существенного влияния на степень включения гемоглобина в везикулы. Присутствие холестерина и дипальмитонилфосфатидилхолина в бислой оказывает стабилизирующее действие на оксигемоглобин.

Липосомы с инкапсулированным гемоглобином (гемосомы) — удобная модель при исследовании липид-белкового взаимодействия и могут быть использованы как нетоксичные, неиммуногенные заменители эритроцитов [1].

Данная работа является дальнейшим развитием выполненных нами исследований [2] и посвящена изучению влияния состава фосфолипидных мембран на включение гемоглобина и его окисление в метформу. Для бинарных смесей фосфолипидов определяли оптимальное соотношение компонентов с точки зрения включения наибольшего количества гемоглобина. Для образования везикулярных мембран мы применяли отдельные типы фосфолипидов, характеризующиеся различными кислотно-основными свойствами и входящие в состав эритроцитарной мембраны: фосфатидилхолин, сфингомиелин, фосфатидилсерин, фосфатидная кислота [3]. Включение гемоглобина в модельные фосфолипидные мембраны, состоящие из смесей фосфатидилхолина, фосфатидилэтанолamina и холестерина, изучалось ранее [2].

В данной работе смесь, полученную обработкой ультразвуком дисперсии фосфолипидов в растворе гемоглобина и содержащую везикулы с гемоглобином, комплексы гемоглобина с фосфолипидами пезикулярной природы, свободный гемоглобин, разделяли гель-фильтрацией на сефарозе 4В по размеру образующихся частиц [2].

Сравнительное изучение включения гемоглобина в везикулы, построенные из смесей фосфатидилхолина и сфингомиелина, показало, что добавление сфингомиелина увеличивает степень включения гемоглобина, но незначительно, о чем свидетельствует восходящий характер зависимостей  $N_{\text{вк}}/P$  от процентного содержания сфингомиелина в смеси (рис. 1, 1). Этот факт можно объяснить тем, что везикулы, построенные из смеси фосфатидилхолина и сфингомиелина, имеют больший радиус, чем фосфатидилхолиновые [4]. Существование максимума на графике зависимости общего количества гемоглобина, включенного в липосомы, от количества сфингомиелина в смеси (рис. 2, 1) объясняется, очевидно, с одной стороны, увеличением включения гемоглобина в липосому и, с другой — уменьшением количества липидов, образующих везикулы.

Сокращения: ФХ — фосфатидилхолин, СМ — сфингомиелин, ФС — фосфатидилсерин, ФК — фосфатидная кислота.

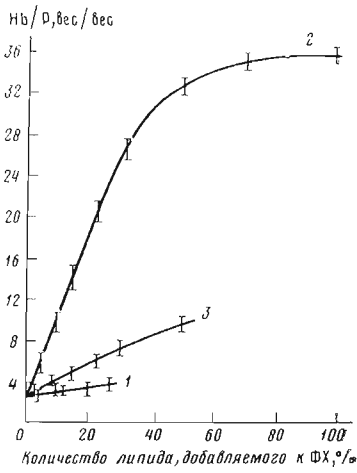


Рис. 1

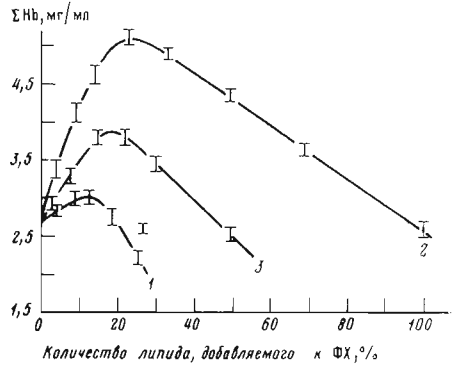


Рис. 2

Рис. 1. Изменение отношения количества гемоглобина и липидного фосфора (Hb/P) в гемосомах, выделенных гель-фильтрацией, в зависимости от липидного состава везикул: 1 — ФХ/СМ, 2 — ФХ/ФС, 3 — ФХ/ФК

Рис. 2. Изменение количества связанного с везикулами гемоглобина ( $\Sigma$ Hb) в мл гемосом, выделенных гель-фильтрацией, в зависимости от липидного состава везикул: 1 — ФХ/СМ, 2 — ФХ/ФС, 3 — ФХ/ФК

Таким образом, включение сфингомиелина в мембрану с точки зрения увеличения связывания гемоглобина нецелесообразно. Однако сфингомиелин повышает устойчивость фосфолипидных мембран к действию липопротеинов плазмы крови [5]. В связи с этим для пролонгирования циркуляции гемосом в крови добавление сфингомиелина желательно.

Полученные ранее результаты по изучению взаимодействия гемоглобина с отрицательно заряженными фосфолипидами [6] свидетельствуют о необходимости продолжения этих исследований. Так как фосфатидилсерин полностью локализован на внутренней поверхности эритроцитарной мембраны и играет важную роль при ее взаимодействии с гемоглобином [7], нами было изучено включение гемоглобина в везикулы, состоящие из фосфатидилхолина и фосфатидилсерина. Показано, что добавление фосфатидилсерина приводит к значительному увеличению включения гемоглобина в везикулы, о чем свидетельствует плавный подъем на графике зависимости Hb/P от содержания фосфатидилсерина (рис. 1, 2). Это, несомненно, обусловлено постепенным нарастанием отрицательного заряда везикул [1]. Ранее было показано, что при включении гемоглобина в фосфатидилсериновые везикулы только 3–5% липида участвует в образовании везикулярного комплекса [6]. Увеличение содержания фосфатидилсерина в исходной смеси липидов приводит к уменьшению доли везикул, содержащих гемоглобин, и увеличению содержания агрегатов липидов с гемоглобином невезикулярной природы (рис. 3, 2). В связи с этим график зависимости содержания гемоглобина в липосомах от содержания фосфатидилсерина в фосфолипидной смеси (рис. 2, 2) имеет максимум при 25–30% фосфатидилсерина.

Известно, что эритроцитарная мембрана содержит сравнительно небольшое количество фосфатидной кислоты — 1,7% [3]. Однако, поскольку фосфатидная кислота заряжена отрицательно, изучалось включение гемоглобина в везикулы, содержащие этот фосфолипид. Мы показали, что фосфатидная кислота, так же как и фосфатидилсерин, увеличивает включение гемоглобина в липосомы, очевидно, за счет усиления электростатического взаимодействия (рис. 1, 3); максимальное включение гемоглобина достигается при 18–20% фосфатидной кислоты (рис. 2, 3). Это, по-видимому, обусловлено, как и в случае фосфатидилсерина, перераспределением молекул липида между везикулами и агрегатами гемоглобина

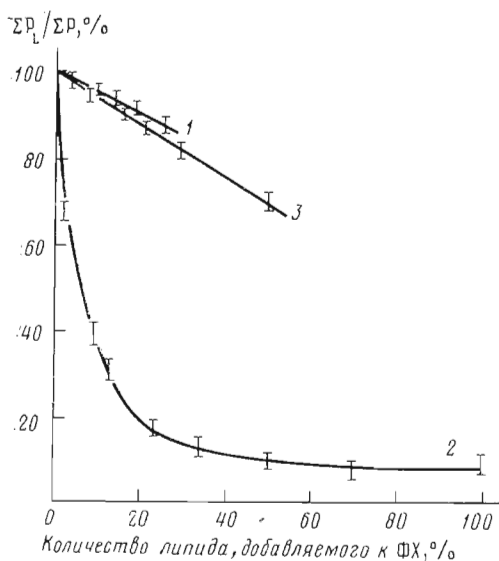


Рис. 3

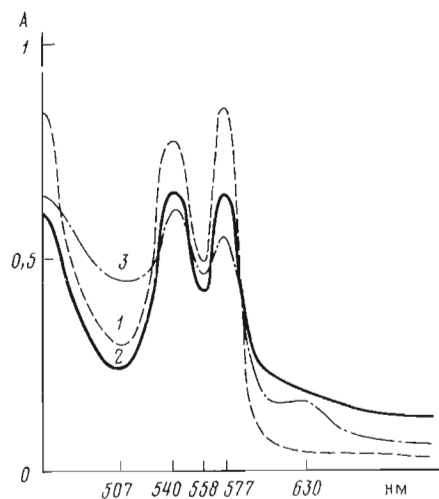


Рис. 4

Рис. 3. Изменение отношения количества фосфора, определяемого в гемосомах, к суммарному количеству фосфора, присутствующему во всех фракциях ( $\Sigma P_L/\Sigma P$ ), в зависимости от липидного состава везикул: 1 — ФХ/СМ, 2 — ФХ/ФС, 3 — ФХ/ФК

Рис. 4. Спектр гемоглобина в видимой области. Содержание метгемоглобина, %: 1 — <10; 2 — ~10; 3 — >10

с липидами невезикулярной природы, о чем свидетельствует график 3 на рис. 3.

При выборе оптимального липидного состава для получения гемосом необходимо не только установить количественные закономерности влияния отдельных липидов на включение гемоглобина в липосомы, но и определить степень их взаимодействия с гемоглобином и воздействия на его функциональные свойства. Одно из необходимых условий для нормального функционирования гемоглобина — отсутствие его метформы. В связи с этим исследовалось влияние различных липидных смесей на окисление оксигемоглобина. Для проведения функциональных испытаний гемоглобин должен содержать не более 10% окисленной формы. Раствор гемоглобина, содержащий ~10% метформы, характеризуется спектром, в котором одинаковы интенсивности поглощений при 540 и 577 нм [8, 9] ( $A_{577}/A_{540}=1$ , рис. 4а). В данной работе это соотношение взято за критерий сравнения влияния фосфолипидных дисперсий на окисление оксигемоглобина.

Известно, что стабильность гемоглобина в гемосомах зависит от метода их получения [10]. Так, показано, что приготовление гемосом эфирно-пипеткорным методом сопровождается окислением и денатурацией гемоглобина [10]. В связи с этим эксперименты по определению устойчивости гемоглобина в везикулах мы проводили в стандартных условиях при одинаковом весовом соотношении липид — белок; для исключения влияния метода получения липосом на окисление белка гемоглобин, содержащий в исходном состоянии 2% метформы, инкубировали с везикулярными фосфолипидными дисперсиями различного состава.

Взаимодействие гемоглобина с липидными бислоями зависит от комплекса факторов, таких, как жидкость мембраны, природа полярных групп липидов, плотность поверхностного заряда.

Ранее при исследовании влияния гидрофобной части фосфолипидов на взаимодействие гемоглобина с мембранами флуоресцентным методом было показано, что с повышением степени ненасыщенности фосфатидилхолина увеличивается степень погружения в бислой триптофановых остатков белка [11]. При высокой степени ненасыщенности липидов создаются условия, способствующие окислению гемоглобина, который при инкубации

с везикулами из яичного фосфатидилхолина уже через сутки содержит ~10% метгемоглобина. Это находится в соответствии с известным фактом, что гемоглобин и другие гемсодержащие белки катализируют перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот, продукты окисления которых в свою очередь окисляют гемоглобин [12, 13]. Везикулы, состоящие из фосфатидилхолина с насыщенными жирнокислотными остатками, оказывают стабилизирующее влияние на гемоглобин, о чем свидетельствует спектр гемоглобина, инкубируемого с дипальмитоилфосфатидилхолиновыми везикулами, в котором  $A_{577}/A_{540} \geq 1$  в течение 2 мес, т. е. содержание метформы менее 10%. Полученные данные находятся в соответствии с ранее опубликованными результатами [14].

Включение эквимольного количества холестерина в везикулы из яичного фосфатидилхолина способствует более высокой степени связывания оксигемоглобина [2] и вместе с тем ингибирует окисление гемоглобина, препятствуя проникновению гема гемоглобина в липидный бислой. Изменения в спектре гемоглобина, свидетельствующие о значительном накоплении метгемоглобина, происходят по истечении 30–35 сут. Кроме того, известно [15], что холестерин делает фосфолипидный бислой более устойчивым к воздействию сыворотки крови. Следовательно, в мембрану гемосом необходимо включать холестерин.

Добавление 20–25% яичного фосфатидилэтаноламина к яичному фосфатидилхолину приводит к нарушению бислоя, что способствует встраиванию гемоглобина [2]. Согласно данным  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии, в мембранах, построенных из смеси фосфатидилхолин — фосфатидилэтаноламин, появляются участки гексагональной фазы [16]. Эти изменения в незначительной степени стабилизируют гемоглобин при его контакте с фосфолипидными бислоями,  $A_{577}=A_{540}$  через 3 сут.

Использование мембран, содержащих 15–20% дигексадецилфосфатидилхолина или сфингомиелина, необходимого для повышения устойчивости фосфолипидного бислоя [15, 17], не оказывает заметного стабилизирующего действия на гемоглобин при его контакте с фосфолипидными бислоями ( $A_{577}=A_{540}$  через 2–3 сут).

Выше была показана необходимость использования отрицательно заряженных фосфолипидов для получения гемосом с увеличенным содержанием гемоглобина. Однако стабильность гемоглобина при этом понижается вследствие взаимодействия его с отрицательно заряженными фосфолипидными и (или) из-за действия продуктов перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот фосфатидилсерина бычьего мозга.

При инкубации гемоглобина с везикулярными димерсиями, образованными дипальмитоилфосфатидилхолином с 10–15% содержащем фосфатидилсерина, белок через 45–50 сут содержал менее 10% метформы. Следовательно, такое содержание фосфатидилсерина в условиях данного эксперимента необходимо для поддержания функциональных свойств гемоглобина, тогда как везикулы из чистого фосфатидилсерина вызывают деструкцию гемоглобина, сопровождающуюся потерей гема [18].

Таким образом, наши исследования показывают, что липидная смесь, предназначенная для приготвления гемосом, имеющих высокое содержание гемоглобина и сохраняющих длительное время устойчивость и активность, должна включать фосфатидилхолин с насыщенными жирнокислотными остатками, холестерин, фосфатидилсерин или фосфатидную кислоту, а также сфингомиелин или диалкилфосфатидилхолин.

### Экспериментальная часть

Использовали яичный фосфатидилхолин, очищенный колоночной хроматографией на оксид алюминия и силикагеле [19], сфингомиелин, выделенный из поджелудочной железы крупного рогатого скота [20], фосфатидилсерин бычьего мозга (Serva), фосфатидную кислоту, полученную ферментативным гидролизом яичного фосфатидилхолина фосфолипазой D [21], дипальмитоилфосфатидилхолин [22], дигексадецилфосфатидилхолин [23].

Гемоглобин человека выделяли по методу [24], он содержал 2% метгемоглобина и был использован в оксигенированной форме.

Для получения везикул со связанным гемоглобином смесь липидов, растворенную в бензоле, выпаривали в вакууме досуха, добавляли раствор гемоглобина в воде (весовое соотношение липид — гемоглобин 1 : 5), встряхивали 10 мин и полученную грубую дисперсию обрабатывали 8 мин при 0°С ультразвуком на приборе УЗДН-2Т при частоте 22 кГц. Полученную смесь затем центрифугировали 10 мин при 10 000 g, разделяли гель-фильтрацией на колонке (15×500 мм) с сефарозой 4В (Pharmacia, Швеция) и элюировали в 5 мМ трис-НСl-буфере, рН 7,4, содержащем 1 мМ ЕДТА.

Однотомеллярные везикулы (для включения гемоглобина и определения его устойчивости) готовили обработкой ультразвуком грубых дисперсий фосфолипидов в 5 мМ трис-НСl-буфере, рН 7,4, содержащем 0,15 М NaCl, в течение 10 мин при 0°С. Раствор гемоглобина инкубировали с полученными фосфолипидными везикулами (40 мг/мл) при 5°С, весовое соотношение липид — белок 1 : 3. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-240 (Япония). Перед измерением образцы, содержащие бислоиные везикулы и гемоглобин, разбавляли в 100 раз. Светорассеяние, вызываемое фосфолипидными дисперсиями, компенсировали помещением в кювету сравнения везикулярных дисперсий той же концентрации, что и при инкубации с гемоглобином.

Концентрацию гемоглобина, связанного с везикулами, определяли по методу Лоури [25]. При добавлении реактива Фолипа вследствие осмотического шока везикулы лопались, и перед измерением образцы центрифугировали 10 мин при 10 000 g.

Содержание фосфора в образцах и весовую концентрацию фосфолипидов определяли с помощью модифицированного метода Бартлета [26] и с использованием аммонийферротрициптата [27].

Спектрофотометрические измерения по определению количества белка и фосфора проводили на спектрофотометре Hitachi EPS-3Т (Япония).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Djordjević L., Miller I. F. *Exp. Hematol.*, 1980, v. 8, № 5, p. 584—592.
2. Ушакова Н. П., Василенко И. А., Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П. *Биоорг. химия*, 1980, т. 6, № 7, с. 1062—1067.
3. Diagne A., Fauvel J., Record M., Chap H., Douste-Blazy L. *Biochim. et biophys. acta*, 1984, v. 793, № 2, p. 221—231.
4. Berden J. A., Barker R. W., Radda G. K. *Biochim. et biophys. acta*, 1975, v. 375, № 2, p. 186—208.
5. Hunt C. *Biochim. et biophys. acta*, 1983, v. 734, № 1, p. 125—128.
6. Ушакова Н. П., Василенко И. А., Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П. *Биоорг. химия*, 1982, т. 8, № 2, с. 177—179.
7. Szundi I., Szelenyi J. G., Breuer J. H., Berczi A. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 595, № 1, p. 41—46.
8. Winterbourn C. C., McGrath B. M., Carrell R. W. *Biochem. J.*, 1976, v. 155, № 4, p. 493—502.
9. Riggs A. *Methods Enzymol.*, 1981, v. 76, № 1, p. 5—29.
10. Szebeni J., Breuer J. H., Szelenyi J. G., Bathori G., Lelkes C., Hollan S. R. *Biochim. et biophys. acta*, 1984, v. 798, № 1, p. 60—67.
11. Ушакова Н. П., Василенко И. А., Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П. *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 4, с. 613—620.
12. Haurowitz F., Groh M., Gansinger G. J. *Biol. Chem.*, 1973, v. 248, № 12, p. 3810—3818.
13. Haurowitz F., Schwerin R., Yenson M. M. J. *Biol. Chem.*, 1941, v. 140, № 2, p. 353—359.
14. Szebeni J., Winterbourn C. C., Carrell R. W. *Biochem. J.*, 1984, v. 220, № 3, p. 685—692.
15. Allen T. M. *Biochim. et biophys. acta*, 1981, v. 640, № 2, p. 385—397.
16. Чупин В. В., Ушакова Н. П., Бондаренко С. В., Василенко И. А., Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П., Розенберг Г. Я., Кольцова Г. Н. *Биоорг. химия*, 1982, т. 8, № 9, с. 1275—1280.
17. Pallauf F. *Biochim. et biophys. acta*, 1983, v. 752, № 3, p. 444—450.
18. Shviro Y., Zilber I., Shaklai N. *Biochim. et biophys. acta*, 1982, v. 687, № 1, p. 63—70.
19. Dawson R. W. *Biochem. J.*, 1963, v. 88, № 3, p. 414—423.
20. Nanakan D. J. *Biochem. Preparat.*, 1961, v. 8, № 1, p. 121—124.
21. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г. *Препаративная биохимия липидов*. М.: Наука, 1981, с. 256.
22. Lekim D., Biedermann J., Ghyczy M. Заявка ФРГ, кл. С 07 F 9/10, № 2647395, заявл. 20.10.76, опубл. 27.04.78.

23. *Gibs H.* Chem. Phys. Lipids, 1980, v. 26, № 4, p. 405–409.
24. *Хачатурьян А. А., Вязова Е. П., Морозова Г. М., Розенберг Г. Я.* Пробл. гематол. и переливания крови, 1979, т. 24, № 1, с. 58–60.
25. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Biol. Chem., 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.
26. *Bartlett G. R.* J. Biol. Chem., 1959, v. 234, № 3, p. 466–468.
27. *Stewart J. C. M.* Anal. Biochem., 1980, v. 104, № 1, p. 10–14.

Поступила в редакцию  
5.III.1985  
После доработки  
6.V.1985

## INTERACTION OF HEMOGLOBIN WITH PHOSPHOLIPID VESICULAR MEMBRANES OF DIFFERENT COMPOSITION

BONDARENKO S. V., USHAKOVA I. P., LEVIT L. F.,  
SĖREBRENNIKOVA G. A., EVSTIGNEEVA R. P.

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow*

Incorporation of hemoglobin into vesicles and its oxidation were studied as a function of composition of the vesicular membrane containing erythrocyte membrane lipids as main components. The addition of negatively charged lipids such as phosphatidylserine and phosphatidic acid, was shown to considerably increase the extent of hemoglobin binding, while sphingomyelin did not produce such an effect. Cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine stabilized oxyHb.