



УДК 616.155.18:577.115:547.953

ИНГИБИРОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТЗАВИСИМОГО ГЕМОЛИЗА ЛИПОСОМАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ЦЕРЕБРОЗИДСУЛЬФАТ

© 2000 г. А. П. Каплун[#], О. О. Бурделев, Н. Н. Иванова*, Ю. М. Краснопольский*, В. И. Швец*Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 117571, Москва, просп. Вернадского, 86;*** Предприятие по производству иммунобиологических препаратов "Биолек", Харьков*

Поступила в редакцию 20.05.99 г. Принята к печати 20.09.99 г.

Обнаружено, что цереброзидсульфат (CGS) способен ингибировать комплементзависимый гемолиз. Изучена зависимость активности липосом, содержащих CGS, от их состава. Были исследованы смеси CGS с фосфатидилэтаноломином, фосфатидилсеринем, сфингомиелином из головного мозга крупного рогатого скота, цереброзидом (CG) из спинного мозга крупного рогатого скота и яичным фосфатидилхолином (ePC). В двойных композициях CGS/ePC при увеличении массовой доли CGS антигемолитическая активность липосом изменяется нелинейно: она резко повышается при изменении доли CGS от 0.3 до 0.5 и снижается на 20–30% по сравнению с максимальной при повышении доли CGS от 0.9 до 1. На основе этих экспериментов оптимальное расстояние между заряженными группами CGS оценено как 0.92–1.6 нм. В тройных композициях CGS/ePC/полярный липид, 4/3/3, только CG повышают активность по сравнению с липосомами состава CGS/ePC, 4/6. Предварительная инкубация CGS-содержащих липосом с комплементом более эффективно снижает гемолиз, чем инкубация с другими компонентами гемолитической системы. Это указывает на то, что взаимодействие с белками комплемента содержащих CGS липосом определяет их антигемолитическую активность.

Ключевые слова: гемолиз; комплемент; ингибирование; липосомы; цереброзидсульфат.

Известно большое количество заболеваний, сопровождающихся гемолизом иммунной природы [1]: гемолитическая болезнь новорожденных, пароксизмальная ночная гемоглобинурия, ряд инфекционных заболеваний [2]; гемолиз также возможен при переливании крови [3], при пересадке костного мозга [4], кроме того, он может вызываться использованием некоторых медикаментов [5]. Таким образом, вещества, способные регулировать систему комплемента, могут оказаться полезными в качестве лекарственных препаратов при лечении перечисленных патологий.

К настоящему времени известно несколько типов полимерных и низкомолекулярных веществ как естественного, так и синтетического происхождения, которые обладают свойством ингибировать активность комплемента и гемолитическую реакцию, вызванную его действием. Есте-

ственными регуляторами самой системы являются растворимые и мембраносвязанные белки и гликопротеины: рецептор комплемента CR1, фактор ингибирования мембраноатакующего комплекса (MACIF), эффекторы гомологичной рестрикции, например ингибитор C1-эстеразы [6–8]. К ним примыкают эндогенные липопротеины низкой плотности, ингибирующие правильную сборку мембраноатакующего комплекса, а также различные иммуностимуляторы и иммуномодуляторы экзогенной природы, осуществляющие свои функции путем первичной атаки на систему комплемента (например, факторы яда кобры [9], секрет медицинской пиявки [10], мурамилдипептид [11] и др.).

Известно также, что заряженные полимеры, например ДНК, поливинилсульфат, полилизин [12–14] и некоторые заряженные липосомы [15, 16] активируют комплемент по классическому или альтернативному пути. Активация комплемента, которая происходит не на мембране эритроцитов, также должна приводить к замедлению гемолиза из-за истощения белков комплемента.

Ранее мы обнаружили, что липосомы, приготовленные из полярных липидов спинного мозга крупного рогатого скота, предотвращают комплементиндуцированный гемолиз [17–19]. На основе этой липосомной дисперсии был создан препарат,

Сокращения: AA – антигемолитическая активность; физраствор – 0.89% раствор хлорида натрия; CG – цереброзид; Chol – холестерин; CGS – цереброзидсульфат; ePC – яичный фосфатидилхолин; DPG – дифосфатидилглицерин; H – степень гемолиза; IC₅₀ – концентрация липидов липосомной дисперсии, при которой происходит 50% ингибирование гемолиза; PC – фосфатидилхолин; PE – фосфатидилэтанол-амин; PG – фосфатидилглицерин; PI – фосфатидилинозит; PS – фосфатидилсерин; SM – сфингомиелин.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 434-83-55; e-mail: alex.kaplun@mtu.net.ru).

предназначенный для лечения гемолитической болезни новорожденных. Цель данной работы – установление активного вещества в названных липосомах и условий проявления им способности ингибировать комплементзависимый гемолиз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения активного вещества смесь липидов, выделенных экстракцией растворителями из спинного мозга, подвергли хроматографии на силикагеле. Смешанные фракции дополнительно разделили с помощью препаративной ТСХ. Получили следующие фракции: CG, PE, CGS, PC, PS, SM. Выделенные вещества идентифицировали в присутствии заведомых образцов по хроматографической подвижности и характеру обнаружения специфическими реагентами. Ряд минорных веществ с полярностью, меньшей CG, идентифицировать не удалось, но они также были протестированы на антигемолитическую активность. Для CG и CGS были получены по две фракции. Известно, что эти сфинголипиды могут содержать в керамидной части как обычные жирные кислоты, так и α -гидроксикислоты. Нам удалось выделить менее полярные фракции (соответствующие данным сфинголипидам с нормальными жирнокислотными остатками) и смешанные фракции. ИК-, ^1H -ЯМР- и масс-спектры выделенного CGS соответствовали предполагаемым структурам. В частности, в масс-спектре наблюдались пики, соответствующие К-солям CGS с кислотами C24 : 0, C24 : 1 ($[M]^+$ 935 более интенсивные) и пики аналогичных соединений с гидроксикислотами ($[M]^+$ 951). Именно эти кислоты являются преобладающими в CGS спинного мозга крупного рогатого скота [20].

Каждую фракцию затем проверяли на антигемолитическую активность. Для этого 1%-ные дисперсии липосом, содержащие липиды каждой фракции, добавляли к гемолитической системе, состоящей из эритроцитов барана, антител к ним и комплемента морской свинки. В контроле (полный гемолиз) добавляли вместо липосом такой же объем физиологического раствора. После инкубирования всех образцов при 37°C отделяли интактные и разрушенные эритроциты центрифугированием и измеряли в супернатанте концентрацию гемоглобина по оптической поглощению при 412 нм. Антигемолитическую активность (AA) выражали как уменьшение концентрации гемоглобина по сравнению с контролем: $AA = (1 - H) \times 100\%$, при этом $H = A_E/A_C$, где A_E – оптическое поглощение при 412 нм в эксперименте, A_C – оптическое поглощение при 412 нм в контроле (при 100% гемолизе). Так как липосомные дисперсии в концентрациях более 0.04 мг/мл заметно рассеивают свет, для таких образцов вводили поправку, вычитая из значения A_E значение оптического поглощения образца, полученного из тестируе-

мой дисперсии липосом, разбавленной до концентрации, равной концентрации липосом в экспериментальных образцах (A_L). В качестве такого контроля использовали систему, содержащую эритроциты и дисперсию липосом, но вместо сыворотки и комплемента вносили эквивалентное количество физраствора. Тогда

$$AA = \left(1 - \frac{A_E - A_L}{A_C}\right) \times 100\%. \quad (1)$$

Из всех выделенных липидов только CGS показали выраженную антигемолитическую активность в описанных условиях. Для сравнения AA различных образцов использовали величину IC_{50} – концентрацию липидов липосомной дисперсии, при которой происходило 50% ингибирование гемолиза.

Изучение антигемолитической активности липосом, содержащих CGS. Взаимодействие CGS с компонентами гемолитической системы (белками системы комплемента, иммуноглобулинами, эритроцитами) может быть специфическим (комплементарным, подобно взаимодействию лиганд–рецептор), неспецифическим (электростатическим, гидрофобным) или смешанным. В случае специфического взаимодействия важную роль должно играть молекулярное окружение CGS.

Поскольку CGS нерастворим в воде, в водном растворе он может существовать в составе надмолекулярных комплексов: мицелл, липосом или жировых эмульсий. Таким образом, только полярные головки и непосредственно примыкающие к ним фрагменты гидрофобной части молекулы могут быть опознаны белками (например, антителами, компонентами системы комплемента). Если монослой состоит лишь из одних молекул CGS, то полярные головки тесно примыкают друг к другу, образуя “гладкую” поверхность. В этом случае тесный контакт белков с молекулами CGS затруднен, очевидно, взаимодействие может носить в основном электростатический характер. Таким образом, для проявления возможных специфических взаимодействий монослой CGS должен быть разбавлен другими полярными липидами, имеющими менее объемистые полярные головки или более короткие гидрофобные хвосты.

Исходя из сказанного выше, мы исследовали антигемолитическую активность липосом двойных составов (с яичным PC, с CG из спинного мозга крупного рогатого скота и с SM из бычьего головного мозга), а также тройных композиций (с яичным PC и другими полярными липидами).

Двойные композиции. На рис. 1 приведены зависимости от концентрации CGS антигемолитической активности липосомных дисперсий, состоящих из CGS или его смесей с PC, с CG и с SM с соотношением 3 : 1 по массе. Из этих графиков видно, что активность CGS в смесях с PC в не-

Антигемолитическая активность липосом, состоящих из разных образцов CGS из спинного мозга крупного рогатого скота и из двойных смесей CGS с ePC, с CG из спинного мозга крупного рогатого скота и с SM из бычьего головного мозга. Массовое соотношение CGS/(полярный липид) 3 : 1

№	Состав	IC ₅₀ (мкг CGS/мл)
1.	CGS (общая фракция)	75 ± 7
2.	CGS (фракция с нормальными жирнокислотными остатками)	106 ± 13
3.	CGS/ePC	8 ± 0.5
4.	CGS/CG (общие фракции)	60 ± 7
5.	CGS (общая фракция)/CG (фракция с нормальными жирнокислотными остатками)	104 ± 11
6.	CGS/SM	70 ± 10

сколько раз выше, чем активность чистого CGS (см. также таблицу). Разбавление CGS сфингомиелином практически не сказывается на активности. Были испытаны разные образцы CGS и CG – как общие фракции этих липидов, так и фракции с нормальными жирными кислотами. В таблице приведены значения IC₅₀ для исследованных образцов.

Результаты этой серии экспериментов показывают, что, чем больше отличаются липиды, составляющие липосомы, тем больший наблюдается эффект. Так, липосомы общей фракции CGS, включающей молекулы этого сульфолипида как с гидроксикислотами, так и с нормальными жирными кислотами, проявляют антигемолитическую активность, увеличенную по сравнению с липосомами, состоящими только из фракции CGS с гидроксикислотами. Та же закономерность прослеживается при сравнении смесей 4 и 5 (таблица). Особенно наглядно это проявляется при

сравнении смесей CGS с яичным PC и SM из головного мозга. Эти два фосфолипиды имеют очень сходные полярные головки, при этом для сфинголипидов SM и CGS гидрофобные части также подобны, но резко отличаются от гидрофобной области ePC (структурно, по длине и по степени насыщенности).

В композициях CGS/ePC, где длина гидрофобных фрагментов второго компонента меньше длины гидрофобных остатков CGS, полярные головки CGS, по-видимому, лучше экспонированы над бислоем и, таким образом, более доступны для взаимодействия с ними белков, чем в более однородных смесях. Аналогичные наблюдения приводятся в работе, посвященной изучению факторов, влияющих на поверхностную экспрессию гликолипидов [21]. Более эффективное связывание анти-CGS-антител происходило с липосомами, содержащими PC с более короткими жирнокислотными цепями. Авторы также объясняют это явление лучшей экспозицией полярной головки CGS для взаимодействия с антителами при уменьшении толщины бислоя.

Дисперсии липосом, состоящие только из CGS, проявляют меньшую антигемолитическую активность, чем липосомы из смеси CGS и ePC, а липосомы из ePC не активны, следовательно, существует некий оптимальный состав для данной двойной смеси.

Для определения оптимальной концентрации CGS в составе таких липосом мы использовали ряд композиций с различным массовым соотношением компонентов CGS/ePC: 10/0, 9/1, 8/2, 7/3, 6/4, 5/5, 4/6, 3/7, 2/8, 1/9, 0/10. С липосомами, приготовленными из каждой композиции, были проведены две серии экспериментов. В первой серии исследовали образцы с постоянной суммарной концентрацией липидов (рис. 2). В таких условиях концентрация CGS различна для каждой композиции. Для более корректного сравнения значений антигемолитической активности мы привели найденные значения к одинаковой концентрации CGS (рис. 2, кривая 3). Во второй серии экспери-

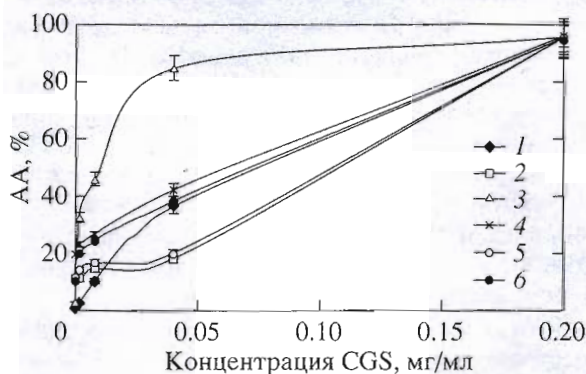


Рис. 1. Антигемолитическая активность липосом из CGS и из двойных смесей CGS с полярными липидами с массовым соотношением 3 : 1 при различных концентрациях CGS. CGS и CG из бычьего спинного мозга; PC из яичного желтка; SM из головного мозга крупного рогатого скота. 1 – CGS (общая фракция); 2 – CGS (фракция, содержащая нормальные жирные кислоты); 3 – CGS/ePC; 4 – CGS/CG (общая фракция); 5 – CGS/CG (фракция, содержащая нормальные жирные кислоты); 6 – CGS/SM. Приведены средние значения из трех экспериментов.

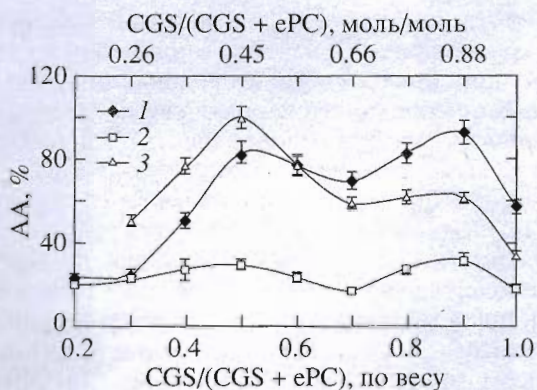


Рис. 2. Зависимость антигемолитической активности липосом, полученных из смеси CGS и ePC, от массовой доли CGS при постоянной общей концентрации липидов. 1 – концентрация липидов 0.02 мг/мл; 2 – концентрация 0.06 мг/мл; 3 – антигемолитическая активность, приведенная к равной концентрации CGS и нормированная по максимальному значению. Сверху указаны соответствующие мольные доли CGS. Приведены средние значения из трех экспериментов.

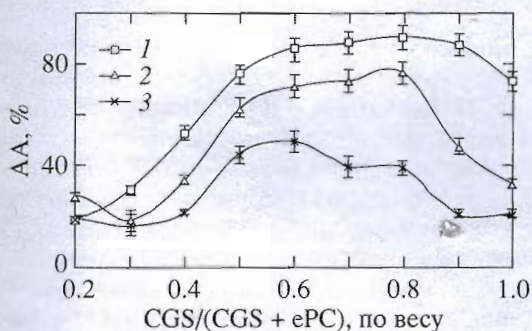


Рис. 3. Зависимость антигемолитической активности липосом, полученных из смеси CGS и ePC, от массовой доли CGS при постоянной концентрации CGS. 1 – концентрация CGS 0.02 мг/мл; 2 – концентрация CGS 0.01 мг/мл; 3 – концентрация CGS 0.005 мг/мл. Приведены средние значения из трех экспериментов.

ментов использовались липосомы с одинаковой концентрацией CGS (рис. 3). В этом случае возможно непосредственное сравнение данных, однако при уменьшении доли CGS общая концентрация липидов увеличивается, следовательно, для композиций с малым содержанием CGS неспецифические взаимодействия возрастают.

Обе серии экспериментов показали аналогичные результаты: при уменьшении массовой доли CGS меньше 0.50 (мольной доли 0.45) ингибирующая активность липосомных дисперсий резко падает. Наибольшее ингибирование гемолиза проявляется для дисперсий состава CGS/ePC 9/1 – 5/5 и снижается на 20–30% по сравнению с максимальной при повышении доли CGS от 0.9 до 1. Причем в первой серии экспериментов наблюдается два максимума; во второй это явление проявляется в смещении максимума активности при уменьшении концентрации CGS (от приблизительно 8.5/1 при концентрации CGS 0.02 мг/мл до приблизительно 5.5/1 при концентрации CGS 0.005 мг/мл).

Для объяснения этого явления мы предложили следующую гипотезу. Белок-мишень взаимодействует сразу с несколькими молекулами CGS (рис. 4). При разбавлении CGS яичным PC от массовой доли 1 (рис. 4а) до 0.9 происходит повышение активности за счет улучшения доступности отдельных молекул CGS для взаимодействия с мишенью (рис. 4б). При дальнейшем уменьшении доли CGS наступает закономерное снижение активности вследствие неоптимального расстояния между молекулами CGS, а в первой серии экспериментов и за счет понижения концентрации CGS (рис. 4в). Следующее повышение активности, возможно, связано с уменьшением вязкости бислоя при значительных долях ePC, имеющего температуру фазового перехода $-15...-5^{\circ}\text{C}$ [22])

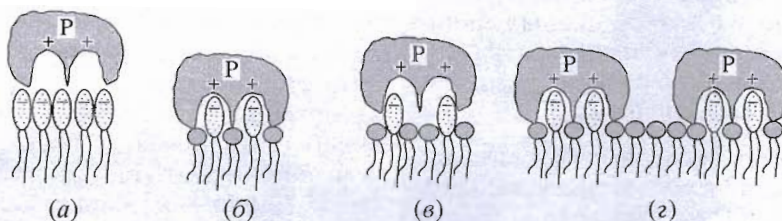


Рис. 4. Возможное объяснение изменения антигемолитической активности липосом, состоящих из смеси CGS и ePC, в зависимости от массовой доли CGS. Белок-мишень (P) содержит несколько мест связывания отрицательно заряженных полярных головок CGS. Экспозиция полярных головок CGS в бислоях, состоящих из смеси CGS и ePC, лучше, чем в бислое, содержащем только CGS, вследствие меньшей длины гидрофобных хвостов у ePC и большего объема полярных головок CGS. (а) – липосомы состоят лишь из CGS. Невозможен плотный контакт белка с молекулами CGS. (б) – липосомы состава CGS/ePC 9/1. Бислоем в виде геля; расстояние между молекулами CGS соответствует сайту связывания белка-мишени, поэтому возможен плотный контакт белка с несколькими молекулами CGS. (в) – липосомы состава CGS/ePC от 7/3 до 9/1. Бислоем в виде геля; расстояние не соответствует сайту связывания белка-мишени, поэтому невозможно оптимальное связывание белка с несколькими молекулами CGS. (г) – липосомы состава CGS/ePC от 7/3 до 5/5. Жидкокристаллический бислой; среднее расстояние не соответствует сайту связывания белка-мишени, но диффузия молекул CGS позволяет подстраиваться для такого взаимодействия: возможен плотный контакт белка с несколькими молекулами CGS.

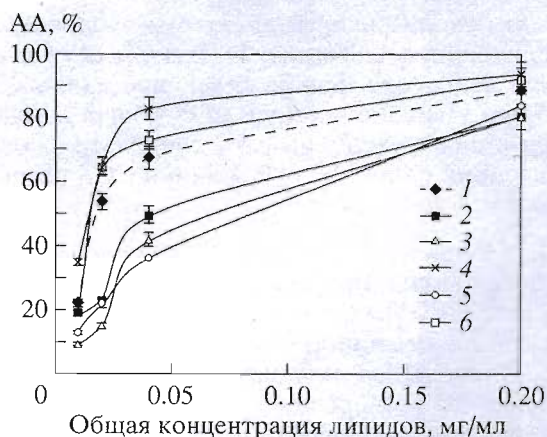


Рис. 5. Антигемолитическая активность липосом из тройных композиций CGS/ePC/(полярный липид) в молярном соотношении 4/3/3 при различных концентрациях липосом. Полярный липид: 1 – ePC; 2 – PE из головного мозга крупного рогатого скота; 3 – PS из головного мозга крупного рогатого скота; 4 – SM из головного мозга крупного рогатого скота; 5 – CG из бычьего спинного мозга, фракция с нормальными жирными кислотами; 6 – CG из бычьего спинного мозга (общая фракция). Приведены средние значения из трех экспериментов.

намного ниже, чем у CGS бычьего мозга (52–59°C [23]). Можно предположить, что температура фазового перехода композиций CGS/ePC находится между этими значениями (ср. [24]). Другими словами, есть вероятность, что композиции с массовой долей CGS 0.7 и ниже в условиях определения антигемолитической активности находятся в жидкокристаллическом состоянии. Нам кажется возможным, что в жидкокристаллическом бислое даже при неоптимальном среднем расстоянии между отдельными молекулами CGS возможна “подстройка” под сайт связывания белка-мишени в результате быстрой диффузии молекул CGS (рис. 4₂). В пользу этого предположения можно привести наблюдения Ченна и сотр. о том, что липосомы, составленные из ненасыщенных липидов существенно более эффективные активаторы комплемента по сравнению с липосомами, состоящими из насыщенных липидов [15].

На основе описанных экспериментов и величины площади молекул используемых липидов [24] мы оценили оптимальное расстояние между несущими заряд сульфатами как 0.92–1.6 нм (меньшее значение соответствует расстоянию между центрами контактирующих молекул, большее – расстоянию между центрами молекул, имеющих двух общих соседей при гексагональной упаковке в монослое).

Безусловно, не исключено, что возможны и другие объяснения найденных закономерностей, например связанные с существованием кластеров или изменением рыхлости упаковки при различ-

ных соотношениях сульфолипида и PC. Выбор из альтернативных объяснений может быть сделан после дополнительных исследований. Так или иначе, описанные эксперименты показали, что активность связана с поверхностной концентрацией CGS не линейно, что можно было бы ожидать, если бы белок-мишень взаимодействовал только с одной молекулой CGS или чисто электростатически. Похожий вид зависимости эффекта от содержания отрицательно заряженных фосфолипидов в липосомах была получена Папахаджопулосом с сотр. [25] при изучении поглощения липосом макрофагами линии J774. Максимальный эндоцитоз наблюдался для липосом, содержащих 50 мол.% отрицательно заряженных липидов, в то время как липосомы с менее 30% анионных фосфолипидов практически не поглощались; а уровень поглощения липосом, состоящих только из отрицательно заряженных липидов, составлял 2/3 максимального. Авторы также предполагают, что это явление может свидетельствовать о связывании нескольких молекул анионных липидов с клеточным рецептором.

Тройные композиции. Также были изучены тройные композиции CGS/ePC/полярный липид состава 4/3/3 (моль/моль). В качестве третьего компонента использовались наиболее обычные типы полярных липидов: CG спинного мозга быка, PE, PS, SM (все из головного мозга быка). Липиды этих типов входят в состав препарата, выделенного из спинного мозга крупного рогатого скота. В качестве эталона для сравнения была выбрана двойная композиция CGS/ePC с молярным соотношением компонентов 4/6 (соответствует весовому соотношению 4.5/5.5). Этот состав не является оптимальным (см. рис. 2 и 3), что давало возможность фиксировать как положительный, так и отрицательный эффект. Заменяя в описанной композиции половину (в молях) ePC на полярный липид, мы получали тройную композицию CGS/PC/полярный липид, антигемолитическую активность которой определяли. Из исследованных полярных липидов PE, PS и SM понижали антигемолитическую активность, тогда как для композиции CGS/PC/CG антигемолитическая активность оказалась больше (рис. 5). Таким образом, замена части ePC на другие фосфолипиды с более длинными жирнокислотными остатками приводит к уменьшению активности смешанных липосом вне зависимости от структуры полярной головки, что наиболее явно проявляется в случае SM, в состав которого входит тот же фосфолиновый гидрофильный блок. CG выпадает из этого ряда. Гидрофобные области SM и CG очень схожи, однако влияние этих липидов на антигемолитическую активность противоположно. Главным отличием CG от других липидов, используемых в качестве третьего компонента, является наличие нескольких гидроксильных групп. В свя-

зи с этим небезынтересно обратить внимание на следующие два факта: липосомы, содержащие отрицательно заряженные фосфолипиды, способствуют активации комплемента, которая приводит к опсонизации липосом фрагментами C3 [15, 26–28]; гидроксильные и аминогруппы служат мишенями для ковалентного связывания активированного компонента комплемента C3b [29, 30]. Если предположить, что липосомы, содержащие CGS, так же как и анионные фосфолипиды, вызывают активацию комплемента, то весьма вероятно, что увеличение на поверхности липосом ОН-групп CG может усиливать такую активацию.

Также мы обнаружили, что CG с негидроксилированными жирными кислотами в большей степени усиливают антигемолитическую активность, чем общая фракция CG (рис. 5, кривые 5, 6). Подобное явление наблюдалось при исследовании взаимодействия CGS с антителами [21].

Жировые эмульсии. Кажется очевидным, что проявление исследуемой активности зависит только от состава и структуры поверхностного монослоя. Другими словами, если на поверхности частиц экспонирован CGS с определенной поверхностной концентрацией, то эффект должен проявляться вне зависимости от того, что находится под поверхностным монослоем. Это утверждение было проверено сравнением антигемолитической активности липосомной дисперсии и жировой эмульсии. Названные образцы были приготовлены так, чтобы была равная концентрация полярных липидов, доступных для взаимодействия с белками. То есть начальная концентрация полярных липидов жировой эмульсии была выбрана равной половине концентрации липидов в липосомной дисперсии в предположении, что в липосомах количество липидов в монослоях приблизительно равно и распределение липидов между монослоями симметрично. Это справедливо для липосом с диаметром, значительно превышающим толщину бислоя; в этом случае соотношение площадей внешней и внутренней поверхностей близко к единице (в частности, для используемого липосом со средним диаметром 151 нм это соотношение равно 1.07), а из-за небольшой кривизны поверхности распределение липидов между внешней и внутренней поверхностью практически равномерно.

Жировую эмульсию готовили из раствора липидов коммерческого препарата для внутривенного введения INTRALIPOS (состав: соевое масло/Chol/соевый PC с соотношением 100/22/12 по массе) и CGS. После выпаривания органического растворителя, добавления физраствора и озвучивания получали композицию с составом масло/Chol/PC/CGS 100/22/12/24. Содержание CGS составило 44% по массе от всех полярных липидов. Это соответствует 27 мол.%. Принимая во

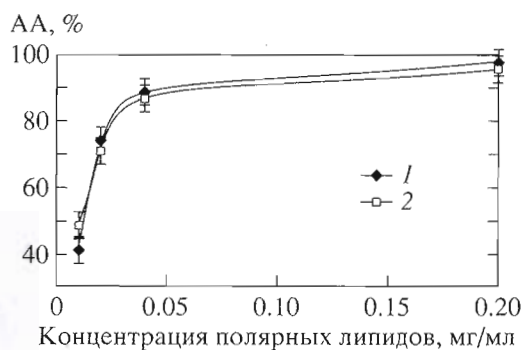


Рис. 6. Сравнение антигемолитической активности жировой эмульсии состава: соевое масло/Chol/PC/CGS с массовым соотношением 100/22/12/24 (1) и липосомной дисперсии состава CGS/ePC с массовым соотношением 6/4 (2). Приведены средние значения из трех экспериментов.

внимание, что средняя площадь, занимаемая молекулой PC в присутствии холестерина практически не меняется [31] и полагая площади, занимаемые ePC и CGS, равными [32], можно оценить долю поверхности частиц жировой эмульсии, приходящуюся на CGS; она составила 0.68. Для сравнения готовили липосомы состава CGS/ePC 6/4 по массе (молярная доля CGS 0.55 и приблизительно та же доля занимаемой молекулами CGS поверхности). Таким образом, сравнивались дисперсии липосом и частиц жировой эмульсии с равной концентрацией экспонированных во внешний водный слой CGS, причем значения доли CGS в монослое липосом и частиц жировой эмульсии находились в области проявления близких к максимальной активности (см. рис. 3). Результаты этих экспериментов, представленных на рис. 6, показывают, что высказанное выше предположение об определяющем значении лишь состава поверхностного монослоя, верно.

Молекулярная мишень и предполагаемый механизм антигемолитической активности. Возможно представить несколько причин ингибирования гемолиза липосомами и частицами жировых эмульсий, содержащих CGS: взаимодействие с антителами и их инактивация; сорбция липосом на эритроцитах с возможной защитой мембраны эритроцитов против действия комплемента [18]; взаимодействие с компонентами комплемента, приводящее к понижению концентрации активных белков комплемента (либо вследствие ингибирования активации комплемента, либо из-за активации и расходования компонентов комплемента). Для определения молекулярной мишени среди названных компонентов гемолитической системы была проведена следующая серия экспериментов. Сравнивали антигемолитическую активность одной и той же композиции липосом состава CGS/ePC (6/4 по массе) в трех вариантах. В первом

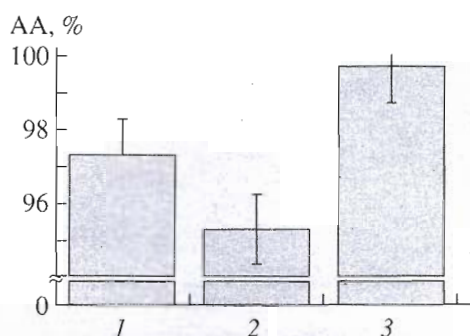


Рис. 7. Сравнение антигемолитической активности 0.2% липосомной дисперсии состава CGS/ePC с массовым соотношением 6/4 при предварительной инкубации ее в течение 30 мин при 20°C: с эритроцитами (1), с антителами (2), с комплементом (3). Приведены средние значения из трех экспериментов.

случае к эритроцитам, предварительно инкубированным с липосомами в течение 30 мин при 20°C, добавляли антитела и комплемент; во втором к эритроцитам последовательно прибавляли антитела, предварительно инкубированные с липосомами в тех же условиях, и комплемент; и в третьем к эритроцитам и антителам добавляли предварительно инкубированный с липосомами комплемент. Наибольший эффект наблюдался в последнем случае (рис. 7). Эти результаты свидетельствуют о том, что липосомы, содержащие CGS, вероятней всего, инактивируют белки комплемента (либо блокируя их действие, либо приводя к активации комплемента и расходованию компонентов комплемента).

Изучение взаимодействия отрицательно заряженных липосом с комплементом было стимулировано наблюдениями, что клиренс таких липосом происходит значительно быстрее, чем незаряженных или заряженных положительно [33]. Первое упоминание о влиянии отрицательно заряженных липосом на активацию комплемента относится к 1986 г. [34]. В дальнейшем было показано, что все исследованные анионные природные фосфолипиды: PA, PS, PG, PI, DPG [15, 26, 35, 36], а также синтетический амфифил, содержащий фосфатную группу (дицетилфосфат) [27], — вызывают в составе липосом активацию комплемента *in vitro* по классическому пути. Это вызывает истощение белков комплемента и, следовательно, может приводить к уменьшению литической активности последнего. Активность названные липиды проявляют при включении их в липосомы, не содержащие холестерин, при мольной доле более 0.4, а в липосомах, в которых холестерин составляет 30–45%, при мольной доле 0.2 и более [37]. Принимая во внимание конденсирующее действие холестерина на бислои [31], поверхностная доля анионных липидов во всех активных композициях превосходит 0.28. То есть пороговое

увеличение активности при повышении мольной доли CGS от 0.26 до 0.45, найденное нами для липосом с CGS, видимо, характерно для липосом с любыми отрицательно заряженными липидами. Причем концентрации проявления активности для липосом, содержащих более 40 мол. % PG, PI или DPG, близки к найденным нами для липосом состава CGS/ePC 3/1: IC₅₀ для перечисленных липидов составляют 22, 15 и 10 мкг/мл [35].

Полученные результаты показывают многие черты сходства во взаимодействии с комплементом липосом, содержащих отрицательно заряженные фосфолипиды и CGS. Поэтому не исключено, что липосомы с отрицательно заряженным CGS также способны активировать комплемент, вызывая его истощение и, возможно, опсонизацию липосом. Исследование этих аспектов взаимодействия CGS-содержащих липосом и комплемента представляет значительный интерес. Было найдено, что степень опсонизации липосом коррелирует с уменьшением времени их циркуляции в кровотоке [38]. Именно с этим явлением связывают быстрое поглощение клетками ретикулоэндотелиальной системы липосом, в состав которых входят анионные фосфолипиды [36]. Однако не все отрицательно заряженные липиды ускоряют клиренс липосом. Например, введение в липосомы PI, ганглиозида GM1 приводит к замедлению поглощения ретикулоэндотелиальной системой [25]. Есть сведения, что и сульфогалактозилцерамиды пролонгируют время циркуляции липосом [39]. О сложных взаимосвязях в системе эритроциты–комплемент–липосомы свидетельствует работа [40]. В ней продемонстрировано, что ганглиозиды (также несущие отрицательный заряд) в составе липосом вызывают активацию комплемента (но в отличие от анионных фосфолипидов по альтернативному пути) и тем самым ингибируют гемолиз сенсibilизированных бараньих эритроцитов, в то время как сенсibilизированные эритроциты человека в присутствии тех же липосом подвергаются гемолизу.

Таким образом, хотя, по всей видимости, любые липосомы, несущие отрицательный заряд определенной плотности, модулируют действие комплемента, результат зависит как от структуры липидов, придающих отрицательный заряд, так и от происхождения эритроцитов и комплемента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, сфингомиелин из головного мозга крупного рогатого скота были приобретены у Sigma (США); яичный фосфатидилхолин, кроличья гемолитическая сыворотка (Гемолизин, титр 1 : 1200), лиофилизированный комплемент морской свинки, эритроциты барана получены от предприятия “Биолек” (Харьков, Украина). Для получения жировой

эмульсии, содержащей CGS, использовали 10% жировую эмульсию для парентерального питания INTRALIPOS, в которой соотношение липидов соевое масло/Chol/PC составляло 100/22/12 (Midori-Juji, Япония). Липиды из говяжьего спинного мозга выделяли как описано нами ранее [19].

Масс-спектр был получен на приборе Joel JMS-NX-110A/110A, бомбардировка быстрыми атомами Ar (Япония). Оптическое поглощение измеряли на спектрометре Beckman DU-68 (США). ИК-спектр получали на приборе Bomem MB-100 FT-IR в таблетках KBr. ^1H -ЯМР-спектр снимали на спектрометре Joel GSX-500 (Япония) в смеси (D_6)DMSO/ D_2O . Растворители упаривали на роторном вакуумном испарителе при температуре ниже 40°C . Температуру плавления определяли в блоке Кофлера (не исправлена). Для получения липосом использовали ультразвуковую баню Branson 2210 (США) и прибор Microfluidizer 110Y (Microfluidics Corp., США). Размер липосом определяли с помощью спектрометра лазерного корреляционного рассеяния, смонтированного из He-Ne-лазера (632.8 нм; Model 127, Lexel Laser, Inc., США), гониометра BI-200 SH (Brookhaven Instruments Co., США), цифрового коррелятора BI-8000 AT (Brookhaven Instruments Co., США) и циркулятора (Neslab RTE-100, США), при 25°C . Колоночную хроматографию проводили на Silica gel 60 (0.063–0.200 мм), ТСХ – на пластинках Silica gel 60 F-254 (толщина слоя 0.5 мм) (Merck, Германия) в системе хлороформ–метанол–вода (65 : 25 : 4), обнаружение 5% H_2SO_4 в метаноле реактивом Дрангендорфа или нингидрином.

Средние молекулярные массы природных фосфолипидов рассчитывали, исходя из их жирнокислотного состава.

Разделение смеси липидов из спинного мозга. Липиды (1.3 г), выделенные из спинного мозга крупного рогатого скота, разделяли хроматографией на 70 г силикагеля в изократической системе (хлороформ–метанол–вода, 70 : 10 : 1), собирая фракции по 7 мл. Были получены следующие фракции: 1) неидентифицированные вещества (4 компонента, 30 мг), 2) цереброзиды (два компонента, 236 мг), 3) PE (с незначительной примесью лизо-PE, 132 мг), 4) CGS + PC (320 мг), 5) PC + PS (154 мг), 6) PS (98 мг), 7) SM (80 мг, элюировали смесью хлороформ–метанол, 1 : 1). Фракции 4 и 5 разделяли затем с помощью препаративной ТСХ в системе хлороформ–метанол–вода (65 : 25 : 4). Выделенные фракции тестировали на проявление антигемолитической активности.

Выделение CG и CGS. 4 г смеси липидов из спинного мозга крупного рогатого скота растворяли в 80 мл смеси хлороформ–метанол (2 : 1) и добавляли раствор 0.7 г KOH в 25 мл метанола, смесь перемешивали 3 ч при $35\text{--}40^\circ\text{C}$ и промывали 30 мл физраствора. Органический раствор упаривали,

остаток промывали ацетоном (3×10 мл). По данным ТСХ в остатке присутствуют CG, CGS, SM, лизо-PC, лизо-PE (от плазмалогенных форм) и небольшие количества метиловых эфиров жирных кислот.

Остаток (1.6 г) хроматографировали на колонке с 86 г силикагеля. Элюировали (4.5 мл/мин) смесями хлороформ–метанол 95 : 5 (130 мл), 90 : 10 (150 мл), 85 : 15 (150 мл), 80 : 20 (600 мл). Получали: 130 мг CG с нормальными жирными кислотами, один компонент (R_f 0.66), 230 мг CG, два компонента (R_f 0.66 и 0.62); а также 120 мг CGS с нормальными жирными кислотами, один компонент (R_f 0.38; т. пл. $224.1\text{--}225.3^\circ\text{C}$ (с разложением)) и 190 мг CGS, два компонента (R_f 0.38 и 0.36, т. пл. $237.5\text{--}238.8^\circ\text{C}$ (с разложением)); ИК-спектр (ν , cm^{-1}): O–H (3416, широкая), C–H (2920, 2850), C=O, амид (1643), C–N, амид (1550), S=O (1242, 1063); масс-спектр (m/z): $[M]^+$ ($\text{C}_{48}\text{H}_{92}\text{KNO}_{11}\text{S}$) 935 (36%) и $[M]^+$ ($\text{C}_{48}\text{H}_{92}\text{KNO}_{12}\text{S}$) 951 (13%); ^1H -ЯМР (δ , м.д.): 0.81 (CH_3), 1.19 (CH_2), 1.43 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$, CH_2CHOH), 1.97 (CH_2CO), 3.2–4.0 (CHOH , CH_2OH), 4.17 (β -гликозид CHO), 5.2–5.5 ($\text{CH}=\text{CH}$).

Получение мультиламеллярных липосом и липидных эмульсий. Раствор липидов упаривали в круглодонной колбе, добавляли физраствор и интенсивно встряхивали до полного удаления пленки липидов со стенок колбы. Конечная концентрация липидов, как правило, 1 мг/мл.

Липосомы, используемые для скрининга липидных компонентов, получали озвучиванием дисперсии мультиламеллярных липосом до достижения постоянной оптической плотности (~ 15 мин) при температуре выше температуры фазового перехода любого из присутствующих компонентов.

Образцы липосомных дисперсий, используемые для определения IC_{50} , получали, пропуская дисперсию мультиламеллярных липосом (1 мг/мл) через прибор Microfluidizer 4 раза. Средний размер липосом составлял 100–180 нм. Затем полученную дисперсию разводили физраствором до нужных концентраций.

Для получения липидных эмульсий использовали липиды, выделенные из INTRALIPOS. 10 мл этой эмульсии экстрагировали хлороформом (3×10 мл), экстракты сушили сульфатом натрия, упаривали и выдерживали в вакууме (< 1 мм Hg) до постоянного веса. К раствору липидов в хлороформе добавляли раствор CGS в смеси хлороформ–метанол 2 : 1 (массовое соотношение липидов INTRALIPOS и CGS 134 : 24), растворитель упаривали. К остатку добавляли физраствор, колбу интенсивно встряхивали и затем обрабатывали ультразвуком до достижения постоянной оптической плотности (~ 20 мин) при 60°C , затем пропускали через Microfluidizer 7 раз.

Определение антигемолитической активности. В пробирки вносили по 0.25 мл суспензии ба-

ранних эритроцитов в физрастворе с концентрацией 3%, 0.25 мл кроличьей гемолитической сыворотки, 0.25 мл физраствора, 0.25 мл образца исследуемой дисперсии и 0.25 мл водного раствора комплемента морской свинки (8.5 мг/мл). В контрольной пробе на полный лизис вместо исследуемого образца вносили 0.25 мл физраствора. В контрольном образце для определения вклада рассеивания липосомной дисперсии использовали систему, содержащую те же количества эритроцитов и липидов, а вместо сыворотки и комплемента вносили физраствор. Содержимое пробирок перемешивали встряхиванием и инкубировали при 37°C в течение 20–40 мин (до наступления полного лизиса в контрольных пробирках), дважды за это время аккуратно встряхивая. После этого пробы охлаждали до 4°C, разбавляли физраствором в 8 раз, центрифугировали при 2500g 3 мин при 10°C, супернатант отделяли декантированием и в пробах измеряли оптическое поглощение при 412 нм. Антигемолитическую активность рассчитывали по формуле 1.

Определение молекулярной мишени. Готовили следующий ряд образцов с 2 мг/мл дисперсией липосом состава CGS/ePC, 6 : 4.

1. 0.25 мл дисперсии липосом и 0.25 мл суспензии эритроцитов инкубировали в течение 20 мин при 20°C, затем добавляли 0.25 мл раствора комплемента, 0.25 мл раствора антител и 0.25 мл физраствора.

2. 0.25 мл дисперсии липосом и 0.25 мл раствора антител инкубировали в течение 20 мин при 20°C. Добавляли 0.25 мл раствора комплемента, 0.25 мл суспензии эритроцитов и 0.25 мл физраствора.

3. 0.25 мл дисперсии липосом и 0.25 мл раствора комплемента инкубировали в течение 20 мин при 20°C. Эту смесь добавляли к суспензии 0.25 мл раствора антител, 0.25 мл суспензии эритроцитов и 0.25 мл физраствора.

Полученные образцы инкубировали 40 мин при 37°C, центрифугировали и определяли в них антигемолитическую активность.

Мы выражаем благодарность компании Донг Кук Фарм. (Республика Корея) и РФФИ (грант № 99-04-48793) за финансовую поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sokol R. J., Hevitt S. // Crit. Rev. Oncol. Hematol. 1985. V. 4. P. 125–154.
2. Bercowitz F.E. // Rev. Infect. Diseases. 1991. V. 13. P. 1151–1162.
3. Kumar P., Sarkar S., Narang A. // Eur. J. Pediatr. 1994. V. 153. P. 98–99.
4. Lopez J., Steegmann J.L., Perez G., Otero M.J., Berberana M., Camara R., Lamana M., Fernandez-Villal-
ta M.J., Fernandez-Ranada J.M. // Am. J. Hematol. 1994. V. 45. P. 237–239.
5. Petz L.D., Branch D.L. // Immune Hemolytic Anemias / Ed. H. Chaplin Jr. N. Y.: Churchill Livingstone, 1985. P. 47–94.
6. Sugita Y., Ito K., Shiozuka K., Suzuki H., Gushima H., Tomita M., Masuho J. // Immunology. 1994. V. 82. P. 34–41.
7. Ziccardi R. J., Coper N. R. // J. Immunol. 1979. V. 123. P. 788–792.
8. Fearon D.T. // J. Exp. Med. 1980. V. 152. P. 20–30.
9. Козлов Л.В., Шойбонов Б.Б. // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. С. 372–378.
10. Баскова И.П., Никонов Г.И., Миркалмова Э.Г., Зинченко А.А., Козлов Л.В. // Казанский медицинский журнал. 1988. Т. 69. С. 334–336.
11. Козлов Л.В., Ростовцева Л.И., Ломака Т.С., Сутовская Н.С., Сорокина И.Б., Баркова Т.И. // Био-
органич. химия. 1985. Т. 11. С. 1510–1518.
12. Uwatoko S., Mannik M. // J. Immunol. 1990. V. 144. P. 3484–3488.
13. Van Schravendijk M.R., Dwek R.A. // Mol. Immunol. 1982. V. 19. P. 1179–1187.
14. Jiang H., Cooper B., Robey F.A., Gewurz H. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 25597–25601.
15. Chonn A., Cullis P. R., Devin D. V. // J. Immunol. 1991. V. 146. P. 4234–4241.
16. Plank C., Mechtler K., Szoka F.C., Jr., Wagner E. // Hum. Gene Ther. 1996. V. 7. P. 1437–1446.
17. Иванова Н.Н., Петров В.И., Осташко Ф. И., Грищенко В. И., Гень С. А., Дибиров М. К. // Липосомы. Взаимодействие с клетками и тканями. Матер. Всесоюз. симп. М.: Наука, 1981. С. 92–95.
18. Иванова Н.Н., Василенко И.А., Каплун А.П., Сениников Г.А., Боровягин В.Л., Швеиц В.И. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 341–348.
19. Иванова Н.Н., Петров В.И., Каплун А.П., Швеиц В.И., Савина Л.С., Мартынова В.А., Макаров В.А. // Вестник АМН СССР. 1990. № 6. С. 38–40.
20. Svennerholm L., Boström K., Fredman P., Jungbjer B., Månsson J.E., Rymark B. M. // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1128. P. 1–7.
21. Crook S.J., Boggs J.M., Vistnes A.I., Koshy K.M. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 7488–7494.
22. Chapman D. // Quart. Rev. Biophys. 1975. V. 8. P. 185–235.
23. Koynova R., Caffey M. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1255. P. 213–236.
24. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя. М.: Наука, 1981. С. 236.
25. Kuung-Dall Lee, Keelung Hong, Papahadjopoulos D. // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1103. P. 185–197.
26. Devin D.V., Wong K., Serrano K., Chonn A., Cullis P.R. // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1191. P. 41–53.
27. Funato K., Yoda R., Kiwada H. // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1103. P. 198–204.

28. Harashima H., Komutsu S., Kojima S., Yanagi C., Mar-ioka Y., Naito M., Kiwada H. // *Pharm. Res.* 1996. V. 13. P. 1049–1054.
29. Law S.K., Minich T.M., Levine R.P. // *Mol. Immunol.* 1982. V. 19. C. 1383.
30. Devin D.V., Bradley A.J. // *Adv. Drug Del. Rev.* 1998. V. 32. P. 19–39.
31. Lecuyer H., Dervichian D.G. // *J. Mol. Biol.* 1969. V. 45. P. 39–57.
32. Noda M., Kurono M., Ohoshi N., Yagi K. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1153. P. 127–131.
33. Juliano R.L., Stamp D. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975. V. 63. P. 651–685.
34. Comis A., Easterbrook-Smith S.B. // *FEBS Lett.* 1986. V. 197. P. 321–327.
35. Marjian J., Xie Z., Devin D.V. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1994. V. 1192. P. 35–44.
36. Liu D., Liu F., Song Y.K. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1235. P. 140–146.
37. Harashima H., Matsuo H., Kiwada H. // *Adv. Drug Del. Rev.* 1998. V. 32. P. 61–79.
38. Chonn A., Semple S.C., Cullis R.P. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 18759–18765.
39. Wassef N.M., Alving C.R. // *Chem. Phys. Lipids.* 1993. V. 64. P. 239–248.
40. Horikawa K., Nakakuma H., Nagakura S., Kawakita M., Kagimoto T., Iwamori M., Nagai Y., Abe T., Takatsuki K. // *J. Exp. Med.* 1991. V. 174. P. 1385–1391.

The Inhibition of Complement-Dependent Hemolysis by Liposomes Containing Cerebroside Sulfate

A. P. Kaplun*#, O. O. Burdelev*, N. N. Ivanova**, Yu. M. Krasnopol'skii**, and V. I. Shvets*

*Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

**Biolek Immunobiological Company, Kharkov, Ukraine

Cerebroside sulfate (CGS) was found to be capable of inhibiting complement-dependent hemolysis. The activity dependence of CGS-containing liposomes on their composition was studied. Mixtures of CGS with phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, sphingomyelin from cattle brain, cerebroside from cattle spinal cord (CG), and egg yolk phosphatidylcholine (ePC) were investigated. In the case of binary CGS/ePC mixtures, the antihemolytic activity varied nonlinearly with an increase in the mass part of CGS: it sharply increased with an increase in the CGS part from 0.3 to 0.5 and decreased by 20–30% of the maximum value with an increase in the CGS part from 0.9 to 1. On the basis of these experiments, the optimum distance between the charged groups of CGS was estimated to be 0.92–1.6 nm. In the ternary compositions of 4 : 3 : 3 CGS/ePC/polar lipid, only CG increased the activity of liposomes as compared to that of liposomes from the 4 : 6 CGS/ePC. The preliminary incubation of CGS-containing liposomes with complement decreased hemolysis more effectively than incubation with other components of the hemolytic system. This suggests that the interaction of CGS-containing liposomes with the complement proteins is responsible for their antihemolytic activity.

Key words: hemolysis, inhibition; complement; liposomes; cerebroside sulfate

To whom correspondence should be addressed; phone: +7(095) 434-8355; e-mail: alex.kaplun@mtu.net.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.