



УДК 547.973+547.915.5

**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕТГЕМОГЛОБИНА  
С ФОСФОЛИПИДНЫМИ БИСЛОЙНЫМИ МЕМБРАНАМИ  
МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ*****Ушакова И. П., Василенко И. А., Серебренникова Г. А.,  
Евстигнева Р. П.****Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Исследованы изменения флуоресценции триптофановых остатков метгемоглобина при взаимодействии его с модельными мембранами, построенными из яичного фосфатидилхолина, ряда синтетических фосфатидилхолинов дивалентного, алкилацильного и диалкильного типов; смесей фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, холестерина, а также из отрицательно заряженных дифосфатидилглицерина и *N*-ацетилфосфатидилэтаноламина. Рассмотрено влияние на этот процесс pH и ионной силы внешней среды. Отмечено значительное изменение флуоресценции в присутствии везикул, состоящих из дифосфатидилглицерина, *N*-ацетилфосфатидилэтаноламина, из смеси фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина с высоким значением индекса окисленности. Полученные закономерности позволяют сделать вывод о значительном вкладе ионных взаимодействий в процесс связывания метгемоглобина с бислойными фосфолипидными мембранами.

Взаимодействие между гемоглобином и эритроцитарной мембраной изучалось многими исследователями в основном на процессе взаимодействия этого белка с тениями эритроцитов [1–3]. В меньшей степени исследовано взаимодействие гемоглобина с модельными фосфолипидными мембранами. Так, изучалось влияние гемоглобина на диффузию различных веществ и ионов через везикулярные фосфолипидные мембраны [4], связывание гемоглобина с мономолекулярными липидными пленками [5], изменение температуры и энтальпии фазовых переходов фосфолипидных мембран в присутствии гемоглобина [6].

В результате проведенных исследований показано, что взаимодействие гемоглобина с эритроцитарной мембраной является обратимым процессом, физиологическое значение которого не установлено. До сих пор неясно, почему трудно отделить гемоглобин от эритроцитарной мембраны. Исследование взаимодействия гемоглобина с модельными фосфолипидными мембранами может создать необходимые предпосылки для изучения взаимодействия гемоглобина с эритроцитарной мембраной.

При изучении связывания гемоглобина с фосфолипидными бислойными везикулами может использоваться метод флуоресценции, так как молекула гемоглобина содержит шесть остатков триптофана, которые локализованы в *N*-концевой части субъединиц и не закреплены жестко в структуре, непосредственно взаимодействуя с окружающей средой. В связи с этим изменение водного окружения гемоглобина на какое-либо другое, например липидное, должно сказываться на флуоресценции [7]. Измерения флуоресценции чувствительны и обеспечивают возможность проведения исследований при низких концентрациях гемоглобина, что

Максимальное изменение флуоресценции метгемоглобина при взаимодействии с фосфатидилхолинами (5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

$  \begin{array}{c}  \text{CH}_2\text{OR} \\    \\  \text{R}'\text{OCH} \quad \text{O} \\    \quad \quad    \\  \text{CH}_2\text{OP}(\text{O}^-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3) \\    \\  \text{O}^-  \end{array}  $	Температура фазового перехода, °С	Интенсивность флуоресценции, % *	
		pH 6,0	pH 7,2
Яичный фосфатидилхолин $I_{\text{окисл}} 0,7$	—	49,00	—
Яичный фосфатидилхолин $I_{\text{окисл}} 0,1$	—3—0	35,00	3,50
$\text{R}=\text{R}'=-\text{CO}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$	23	21,50	-2,50
$\text{R}=\text{R}'=-\text{CO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$	41	14,75	-7,75
$\text{R}=\text{R}_2=-\text{CO}(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$	55	8,0	-10,00
$\text{R}=-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_8\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ $\text{R}'=-\text{COC}_{17}\text{H}_{35}$	17	20,75	-3,25
$\text{R}=-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ $\text{R}'=-\text{COC}_{17}\text{H}_{35}$	54	4,75	-10,25
$\text{R}=-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ $\text{R}_2'=-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$	35	13,00	-5,00

\* Относительно 0,5 мкМ метгемоглобина.

и было использовано ранее для изучения взаимодействия гемоглобина или его метформы с жирными кислотами, солюбилизированными в воде детергентом [8], а также с тениями эритроцитов [1].

В данной работе исследовано взаимодействие метгемоглобина с фосфолипидными бислойными мембранами методом флуоресценции. Выбор метгемоглобина в качестве объекта исследования обусловлен стабильностью этой формы гемоглобина. К тому же при этом существенно уменьшается влияние состояния гема на флуоресценцию триптофановых остатков в молекуле. Так, при переходе от метгемоглобина к оксигемоглобину флуоресценция уменьшается на порядок, а при переходе к апогемоглобину — в 66 раз [8]. Кроме того, при концентрациях, необходимых для флуориметрических исследований, оксигемоглобин быстро окисляется до метгемоглобина.

В связи с тем что в эритроцитарной мембране представлены все основные типы фосфолипидов, а также холестерина [9], казалось целесообразным проследить влияние на флуоресценцию триптофановых остатков метгемоглобина различных классов фосфолипидов, различающихся структурой полярной части и гидрофобного компонента. В работе использованы также фосфолипиды, имеющие различную степень окисленности ( $I_{\text{окисл}}$ ) [10].

Метгемоглобин при постоянной концентрации (0,5 мкМ) инкубировали с бислойными мембранами, построенными из яичного фосфатидилхолина или синтетических фосфатидилхолипов диацильного [11], алкилацильного [12, 13], диалкильного [14] типа (таблица); из смесей фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, холестерина, а также из отрицательно заряженных фосфолипидов — дифосфатидилглицерина и N-ацетилфосфатидилэтаноламина, полученного ацилированием яичного фосфатидилэтаноламина [15].

При взаимодействии метгемоглобина с везикулярными мембранами отдельные части белковой глобулы обращены не в водную среду, а кон-

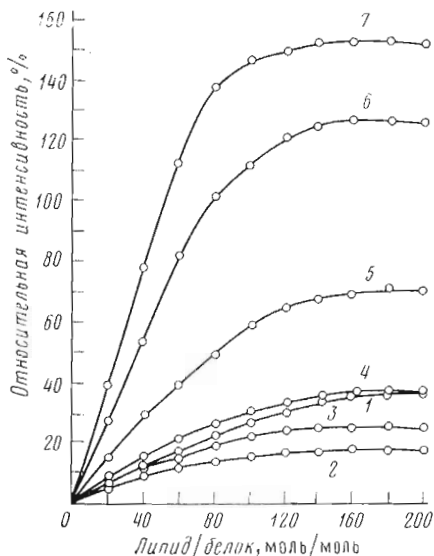


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции 0,5 мкМ метгемоглобина от количества добавляемого липида: 1 — яичный фосфатидилхолин, pH 6,0; 5 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 2 — фосфатидилхолин — фосфатидилэтанолламин, 3:1,  $I_{\text{окисл}}$  0,2, pH 6,0; 5 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 3 — фосфатидилхолин — фосфатидилэтанолламин, 3:1,  $I_{\text{окисл}}$  0,8, pH 6,0; 5 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 4 — фосфатидилхолин — фосфатидилэтанолламин, 3:1,  $I_{\text{окисл}}$  0,2, pH 7,2; 5 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 5 — фосфатидилхолин — фосфатидилэтанолламин, 3:1,  $I_{\text{окисл}}$  0,8, pH 7,2; 5 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 6 — N-ацетилфосфатидилэтанолламин, pH 6,0; 50 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 7 — N-ацетилфосфатидилэтанолламин, pH 6,0; 5 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ .

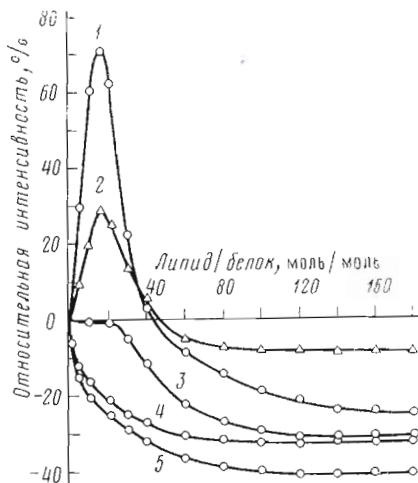


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции метгемоглобина от количества добавляемого дифосфатидилглицерина: 1 — pH 6,0; 5 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 2 — pH 7,2; 5 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 3 — pH 6,0; 20 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 4 — pH 7,2; 50 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 5 — pH 6,0; 50 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ .

тактируют с липидным бислоем, что должно приводить к усилению флуоресценции [7]. С другой стороны, при конформационных изменениях в молекуле гемоглобина, в результате которых гем становится более доступен для взаимодействия с окружающей средой, должно наблюдаться гашение флуоресценции.

Как уже отмечалось, связывание гемоглобина эритроцитарной мембраной обратимо. Поэтому можно предположить, что взаимодействие метгемоглобина с фосфолипидными везикулами представляет собой равновесный процесс. Изменение флуоресценции можно объяснить с точки зрения образования и распада липид-белкового комплекса в зависимости от липидного состава, pH, ионной силы с учетом изменения конформации молекул метгемоглобина.

Исследование взаимодействия метгемоглобина с жирными кислотами продемонстрировало постоянство при этом максимума флуоресценции триптофановых остатков и увеличение квантового выхода [8]. Этот метод перенесен нами на изучение взаимодействия метгемоглобина с фосфолипидными мембранами.

На основании данных анализа изменения флуоресценции метгемоглобина от соотношения липид — белок можно получить три параметра: 1) минимальное липид-белковое соотношение, при котором все молекулы метгемоглобина связаны с везикулами: чем меньше эта величина, тем больше белка связывается непосредственно с мембранами; 2) константу связывания, характеризующую взаимодействие метгемоглобина с липидом и позволяющую сравнивать степень сродства различных липидов к метгемоглобину; 3) максимальное изменение флуоресценции метгемоглобина при взаимодействии с липидом (в %).

Для исследования влияния гидрофобной части фосфолипидов на флуоресценцию триптофановых остатков метгемоглобина изучалось взаимодействие метгемоглобина с везикулами, построенными из природного и ряда синтетических фосфатидилхолинов. При этом было обнаружено, что флуоресценция меняется от  $-10$  до  $49\%$  (таблица). Общий вид зависимости интенсивности флуоресценции триптофановых остатков метгемоглобина от концентрации липида для изученных фосфатидилхолинов показан на рис. 1 (кривая 1). При мольном отношении фосфатидилхолин — белок, большем 100, относительное изменение флуоресценции остается постоянным, т. е. это минимальное отношение, при котором все молекулы метгемоглобина связаны с везикулами. Размеры везикул, определенные с помощью электронной микроскопии, составляют  $250-300$  Å в диаметре. Предполагая, что везикула образована более 2000 молекулами фосфолипида [16], можно считать, что количество молекул метгемоглобина на везикулу составляет 20—30. При низких концентрациях липида, когда концентрация белка выше уровня насыщения, изменение флуоресценции пропорционально количеству присутствующего липида.

В результате исследования влияния везикул, построенных из природного и синтетических фосфатидилхолинов, было показано, что максимальное относительное изменение флуоресценции метгемоглобина при  $20^\circ\text{C}$  находится в линейной зависимости от температуры фазового перехода этих соединений (таблица). Усиление флуоресценции метгемоглобина при взаимодействии с везикулами, построенными из фосфатидилхолинов с более низкими температурами фазового перехода, может быть вызвано большим погружением триптофановых остатков в бислой, а этому благоприятствует большая подвижность углеводородных остатков молекулы липида. Существенное влияние на флуоресценцию метгемоглобина, включенного в состав фосфатидилхолиновых везикул, оказывает изменение pH от 6,0 до 7,2 — диапазон, в котором гемоглобин выполняет свою основную функцию — обратимый транспорт кислорода. Уменьшение флуоресценции при увеличении pH можно объяснить изменением поверхностного заряда белка, так как в данном интервале значений влияние на степень диссоциации полярной части фосфатидилхолинов незначительно, а температура фазового перехода — величина, независимая от pH.

Увеличение ионной силы от 5 до 50 мМ приводит к уменьшению флуоресценции остатков триптофана от 12 до  $-4,5\%$  (для везикул, построенных из яичного фосфатидилхолина).

При исследовании взаимодействия метгемоглобина с везикулами, состоящими из смеси фосфатидилхолин — фосфатидилэтанолламин (3:1), показано, что общий вид изменения флуоресценции такой же, как и для фосфатидилхолинов (рис. 1). Изменение флуоресценции остается постоянным при соотношении липид — белок 90—100, что несколько меньше, чем для фосфатидилхолинов. Это можно объяснить увеличением ионных взаимодействий за счет нарастания общего отрицательного заряда мембраны, а также вследствие нарушения бислоя, вызываемого фосфатидилэтанолламином [17]. В предыдущей работе было показано, что добавление фосфатидилэтанолламина увеличивает степень связывания гемоглобина с везикулами [18]. В отличие от фосфатидилхолиновых везикул мембраны из смеси фосфатидилхолин — фосфатидилэтанолламин (3:1) вызывают большее увеличение флуоресценции при pH 7,2, чем при pH 6,0.

В результате исследований показано, что степень окисленности фосфолипидов влияет на взаимодействие метгемоглобина с модельными мембранами, что отражается на флуоресценции триптофановых остатков белка. Так, обнаружено, что везикулы, образованные из яичного фосфатидилхолина разного индекса окисленности ( $I_{\text{окисл}}$ ), отличаются по степени взаимодействия с метгемоглобином и, следовательно, по влиянию на флуоресценцию триптофановых остатков.

При  $I_{\text{окисл}}$  0,1 максимальное относительное изменение флуоресценции 35%, а при 0,7–49% (рН 6,0; 5 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ). Методом ЯМР ранее было показано, что окисление фосфатидилхолина, образующего бислои, вызывает искажения в мембране [10]. Таким образом, можно предположить, что искажения в бислое способствуют лучшему встраиванию метгемоглобина в везикулярную мембрану. Изменение степени окисленности фосфатидилэтаноламина влияет на взаимодействие с метгемоглобином еще в большей степени, чем в случае фосфатидилхолина. Например, при увеличении индекса окисленности фосфатидилэтаноламина от 0,2 до 0,8 при неизменной окисленности фосфатидилхолина относительное увеличение флуоресценции меняется от 36 до 70% (рис. 1). Расчет константы связывания метгемоглобина с фосфатидилэтаноламином ( $I_{\text{окисл}}$  0,8) по методу [19] показывает присутствие нескольких центров взаимодействия. В среднем константа связывания метгемоглобина с фосфатидилхолин-фосфатидилэтаноламиновыми везикулами составляет  $1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$  (рН 7,2; 5 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ )\*. Увеличение интенсивности флуоресценции при окислении фосфатидилэтаноламина обусловлено, по-видимому, большими искажениями в бислое.

Согласно литературным данным [5] и результатам, полученным нами ранее [18], гемоглобин взаимодействует в большей степени с отрицательно заряженными фосфолипидами (фосфатидилсерин, дифосфатидилглицерин). В связи с этим нами были предприняты попытки исследования взаимодействия метгемоглобина не только с нейтральными, но и с отрицательно заряженными фосфолипидами, такими, как N-ацетилфосфатидилэтаноламин и дифосфатидилглицерин.

При исследовании влияния N-ацетилфосфатидилэтаноламиновых везикул на изменение флуоресценции было обнаружено увеличение интенсивности флуоресценции до 150%. Относительное изменение флуоресценции остается постоянным при соотношении липид — белок 76:1 (рис. 1). Это меньше, чем для фосфатидилхолина и смеси фосфатидилхолин — фосфатидилэтаноламин. Константа связывания, рассчитанная по методу [19], составляет  $10 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  (рН 6,0; 5 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ), что несколько больше, чем для фосфатидилсерина —  $6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  [20]. На флуоресценцию метгемоглобина в присутствии N-ацетилфосфатидилэтаноламина увеличение молярности  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$  до 50 мМ (рН 6,0) оказывает меньшее влияние, чем на другие липидные комплексы, рассмотренные ранее (150% при 5 мМ и 125% при 50 мМ). Константа связывания при 50 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$  составляет  $5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ , а соотношение липид — белок, при котором изменение флуоресценции становится постоянным, увеличивается до 96:1. Эти свойства можно объяснить наличием значительного отрицательного заряда у N-ацетилфосфатидилэтаноламина и обусловленного этим погружением метгемоглобина в бислои без заметного нарушения конформации белка.

При рассмотрении взаимодействия метгемоглобина с везикулами, состоящими из дифосфатидилглицерина, показано, что все зависимости при различных значениях рН и ионной силы среды имеют аномальный характер (рис. 2). При концентрации фосфатного буфера 5 мМ при соотношении липид — белок 13:1 при различных рН наблюдается резкое увеличение флуоресценции, достигающее 70%, а при увеличении этого отношения до 160:1 происходит интенсивное гашение флуоресценции до 25% относительно флуоресценции метгемоглобина (рН 6,0). При высокой молярности (50 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) наблюдается гашение флуоресценции, достигающее 40% при соотношении липид — белок 90:1 (рН 6,0). При 20 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$  наблюдается промежуточная картина. Так как дифосфатидилглицерин находится в анионной форме, можно ожидать увеличения флуоресценции метгемоглобина, как и в случае N-ацетилфосфатидилэ-

\* Для липидных смесей, дающих увеличение флуоресценции меньше 50%, расчет константы связывания не проводился вследствие большой погрешности.

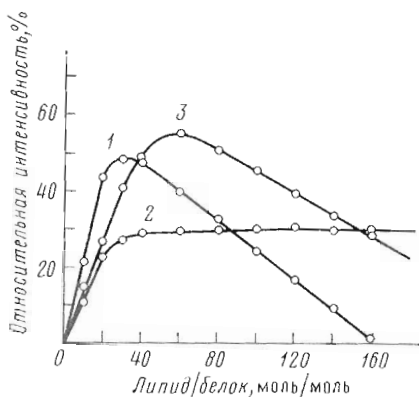


Рис. 3. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции метгемоглобина в зависимости от количества добавляемого липида: 1 — фосфатидилхолин — холестерин, 3:1, pH 6,0; 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2 — фосфатидилхолин — холестерин, 3:1, pH 7,2; 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 3 — фосфатидилхолин — холестерин — фосфатидилэтаноламин, 3:1:1, pH 6,0; 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

ноламина, но в действительности наблюдается обратная картина — эффективное гашение флуоресценции. Это, по-видимому, можно объяснить значительными конформационными перестройками молекулы метгемоглобина, в результате которых гем становится более доступен окружающей среде.

При инкубации метгемоглобина с везикулами, состоящими из смеси фосфатидилхолин — холестерин (3:1) и фосфатидилхолин — фосфатидилэтаноламин — холестерин (3:1:1), были получены зависимости, также имеющие аномальный характер. Добавление холестерина приводит к увеличению флуоресценции по сравнению с везикулами, состоящими из фосфатидилхолина или смеси фосфатидилхолина и фосфатидилэтанолamina при равных pH и молярностях буфера (рис. 3).

Таким образом, данное исследование показало, что взаимодействие метгемоглобина с бислойными мембранами в большей степени носит ионный характер и зависит от липидного состава везикул. Однако нельзя исключить и гидрофобное взаимодействие, следующее за ионным. Приведенные результаты согласуются с полученными ранее с помощью гель-фильтрации количественными данными о связывании оксигемоглобина с бислойными фосфолипидными мембранами [18].

### Экспериментальная часть

Метгемоглобин получали окислением оксигемоглобина. Для создания бислойной везикулярной мембраны использовали яичные фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, полученные по методу [21], дифосфатидилглицерин, выделенный из бычьих сердец [22]. Коммерческий холестерин очищали перекристаллизацией из этанола. Фосфатидилхолины диацильного ряда синтезировали по методу [11], алкилацильного — по методу [12, 13], диалкильного — по методу [14]. N-Ацетилфосфатидилэтаноламин получен из яичного фосфатидилэтанолamina ацилированием по методу [15].

Бислойные везикулярные мембраны готовили обработкой фосфолипидных дисперсий ультразвуком [23]. Размеры везикул, определенные с помощью электронной микроскопии с использованием метода контрастирования 1% молибденовокислым аммонием, составляли 250–300 Å. Съемку проводили на электронном микроскопе IEM-7A (Япония).

Молярное отношение липид — белок меняли от 2:1 до 200:1. Концентрация метгемоглобина оставалась постоянной (0,5 мкМ). Измерения проводили в 5 и 50 mM растворах  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , доводимых титрованием едким натром до pH 7,2 и 6,0. Инкубацию растворов метгемоглобина с модельными фосфолипидными мембранами проводили 6 ч при 5° C.

Измерения осуществляли на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-2A» (Япония) при 20° C. Длина волны возбуждения 275 нм. Интенсивность



флуоресценции измеряли в относительных единицах при 330 нм и сравнивали с флуоресценцией стандартного раствора метгемоглобина (0,5 мкМ).

Индекс окисленности измеряли с помощью спектрофотометра «Hitachi EPS-3T» (Япония) по отношению поглощения при длинах волн 235/215 нм [10].

Точность определения контролировали 10-кратным повторением измерения флуоресценции одного и того же образца. Для фосфатидилхолинов она составляла  $\pm 1\%$ , для N-ацетилфосфатидилэтанолamina и дифосфатидилглицерина  $\pm 5\%$ .

Авторы выражают благодарность Г. Я. Розенбергу и Г. Н. Кольцовой за предоставление оксигемоглобина (ЦНИИ гематологии и переливания крови), В. А. Образцову (Институт биофизики АН СССР, Пущино) за помощь в определении размеров везикул методом электронной микроскопии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Shaklai N., Ygnerabide J., Ranney H. M.* Interaction of hemoglobin with red blood cell membranes as shown by a fluorescent chromophore.— *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 25, p. 5585–5592.
2. *Zau P. W., Hung C., Minacata K., Schwartz E., Asakura T.* Spin-label studies of membrane-associated denatured hemoglobin in normal and sickle cells.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 552, № 3, p. 499–508.
3. *Salkany J. M., Shaklai N.* Functional properties of human hemoglobin bound to the erythrocyte membrane.— *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 5, p. 893–899.
4. *Bossi L., Alema S., Calissano E., Marra E.* Interaction of different forms of haemoglobin with artificial lipid membranes.— *Biochim. et biophys. acta*, 1975, v. 375, № 3, p. 477–482.
5. *Szundi I., Szélnyi J. G., Breuer J. H., Bérczi A.* Interactions of haemoglobin with erythrocyte membrane phospholipids in monomolecular lipid layers.— *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 595, № 1, p. 41–46.
6. *Papahadjopoulos D., Moscarello M., Eylar E. H., Isac T.* Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes.— *Biochim. et biophys. acta*, 1975, v. 401, № 3, p. 317–335.
7. *Burstein E. A., Vedenkina N. S., Ivkova M. N.* Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules.— *Photochem. and Photobiol.*, 1973, v. 18, № 4, p. 263–279.
8. *Grossman S., Hammerman I. S., Schaap T.* Fluorescence changes resulting from methemoglobin and fatty-acid interaction.— *J. of Food Sci.*, 1979, v. 44, № 3, p. 685–689.
9. *Bretscher M.* Membrane structure. General principles.— *Science*, 1973, v. 181, № 4100, p. 622–629.
10. *Викторов А. В., Василенко И. А., Евстигнеева Р. П.* Структурные изменения, возникающие в фосфолипидной мембране при перекисном окислении липидов при действии лизофосфатидилхолина.— *Биоорганическая химия*, 1979, т. 5, № 10, с. 1584–1586.
11. *Суханов В. А., Жданов Р. И., Швец В. И., Евстигнеева Р. П.* Биологически активные стабильные радикалы. IX. Синтез фосфатидилхолина, содержащего спин-меченый ацильный остаток в положении 1 (3).— *Биоорганическая химия*, 1978, т. 4, № 6, с. 785–790.
12. *Розин А. Э., Гудкова С. Ф., Серебrenникова Г. А., Евстигнеева Р. П.* Синтез 1-О-акил-2-акил-sn-глицерипов.— *Ж. орган. химии*, 1980, т. 11, № 11, с. 2308–2311.
13. *Чупин В. В., Малина Е. В., Василенко И. А., Серебrenникова Г. А., Евстигнеева Р. П.* Синтез ненасыщенных фосфатидилхолинов с простой и сложной эфирной связью.— *Ж. орган. химии*, 1980, т. 16, № 1, с. 31–33.
14. *Евстратова Н. Г., Василенко И. А., Попова Т. П., Серебrenникова Г. А.* Синтез модифицированных фосфолипидов.— *Биоорганическая химия*, 1979, т. 5, № 8, с. 1140–1145.
15. *Ancja R., Chadhe J. S., Knagg J. A.* N-acylphosphatidylethanolamines: occurrence in nature, structure and stereochemistry.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1969, v. 36, № 3, p. 401–406.
16. *Mason J. T., Huang C.* Hydrodynamic analysis of egg phosphatidylcholine vesicles.— *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1978, v. 308, p. 29–49.
17. *Cullis P. R., De Kruijf B.* Lipid polymorphism and the functional roles of lipid in biological membranes.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 559, № 4, p. 399–420.
18. *Ушакова И. П., Василенко И. А., Серебrenникова Г. А., Евстигнеева Р. П.* Взаимодействие гемоглобина с бислойными фосфолипидными мембранами.— *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 7, с. 1062–1067.

19. *Cogan U., Kopelman M., Mokady S., Shinitky M.* Binding affinities of retinol and related compounds to retinol binding proteins.—*Eur. J. Biochem.*, 1976, v. 65, № 1, p. 71–78
20. *Shaktai N., Ygenerabide J., Ranney H. M.* Classification and localization of hemoglobin binding sites on the red blood cell membrane.—*Biochemistry*, 1977, v. 16, № 25, p. 5593–5597.
21. *Dawson R. W.* On the mechanism of action of phospholipase A.—*Biochem. J.*, 1963, v. 88, № 3, p. 414–423.
22. *Rose H. G.* Studies on the molecular structure of rat liver cardiolipin.—*Biochim. et biophys. acta*, 1964, v. 84, № 2, p. 109–127.
23. *Huang C.* Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics.—*Biochemistry*, 1969, v. 8, № 4, p. 414–420.

Поступила в редакцию  
29.VII.1980

После доработки  
23.IX.1980

### FLUORESCENCE STUDIES OF METHAEMOGLOBIN INTERACTION WITH PHOSPHOLIPID BILAYER MEMBRANES

USHAKOVA I. P., VASILENKO I. A., SEREBRENNIKOVA G. A.,  
EVSTIGNEEVA R. P.

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

The influence of artificial membranes, prepared from different phospholipids or their mixtures, on the changes of tryptophan fluorescence in methaemoglobin was studied. The largest changes in fluorescence were observed in the presence of diphosphatidylglycerol and N-acetylphosphatidylethanolamine vesicles. A strong influence of the phospholipid oxidation on the tryptophan fluorescence was demonstrated. From the data obtained a conclusion was made that ionic interactions contribute considerably in the process of methaemoglobin binding with bilayer phospholipid membranes.