



УДК 577.112.854:577.125

ОБРАЗОВАНИЕ ГЕМИХРОМА ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ГЕМОГЛОБИНА С ПОЛЯРНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА

© 1997 г. Г. М. Андреюк, М. А. Кисель[#]

Институт биоорганической химии АН Белоруссии, 220141, Минск, ул. Жодинская, 5/2

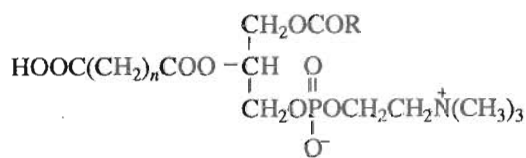
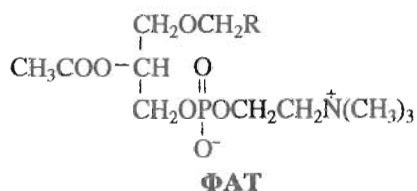
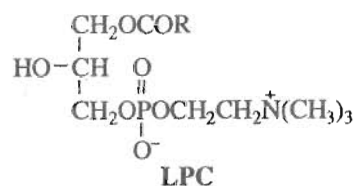
Поступила в редакцию 07.08.96 г.

Полярные производные фосфатидилхолина – 1-ацил-2-лизо-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, 1-алкил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (фактор активации тромбоцитов), 1-ацил-2-глутароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин и 1-ацил-2-азелоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, образующиеся в биологических структурах за счет ферментативных и свободнорадикальных реакций, изучены в качестве эффекторов превращения метгемоглобина и оксигемоглобина в окисленную низкоспиновую форму, так называемый гемихром. Показано, что все вышеперечисленные производные фосфатидилхолина играют эффекторную роль в процессах перехода метгемоглобина и оксигемоглобина в гемихром. Среди исследованных соединений наибольшим влиянием на скорость образования гемихрома обладают производные фосфатидилхолина, содержащие остатки глутаровой и азелаиновой кислот.

Ключевые слова: производные фосфатидилхолина, метгемоглобин, оксигемоглобин, гемихром.

Восстановленная и окисленная формы гемоглобина в эритроцитах существуют в сложном равновесии, которое поддерживается клеточной системой окислительно-восстановительных ферментов. Ранее мы показали [1–3], что взаимодействие гемоглобина с жирными кислотами приводит к образованию низкоспиновой окисленной формы гемопротейна, так называемого обратимого гемихрома. Можно предположить, что наряду с жирными кислотами существуют и другие минорные липиды, способные оказывать эффекторное воздействие на гемоглобин. Чтобы проверить это предположение, в настоящей работе проведено сравнительное исследование лизофосфатидилхолина (LPC), фактора активации тромбоцитов (ФАТ), глутароил- и азелоилфосфатидилхолина в качестве липидных эффекторов перехода оксигемоглобина (HbO₂) и метгемоглобина (mHb) в окисленную низкоспиновую форму. Эти разные по гидрофильности и заряду фосфолипиды имеют в полярной части молекулы одинаковую глицерофосфохолиновую группировку и в той или иной степени могут накапливаться в мембране в результате протекания ферментативных и свободнорадикальных реакций. Так, LPC вместе с жирными кислотами образуется при действии на мембран-

ные фосфолипиды экстрацеллюлярных, внутриклеточных и мембранных фосфолипаз A₂ [4]. ФАТ, в свою очередь, синтезируется в результате ацетилирования алкильных аналогов LPC. ФАТ продуцируется в различных тканях и клетках животных и является важным липидным медиатором [5].



$n = 3$ GPC
 $n = 7$ APC R = C₁₅H₃₁, C₁₇H₃₅

Близкую к LPC и ФАТ структуру имеют фосфатидилхолины, ацилированные во 2-м положении дикарбоновыми кислотами. Последние впервые были обнаружены среди продуктов ПОЛ

Сокращения: ПОЛ – перекисное окисление липидов, HbO₂ – оксигемоглобин, mHb – метгемоглобин, ФАТ – фактор активации тромбоцитов (1-О-алкил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин), LPC – 1-ацил-2-лизо-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; GPC – 1-ацил-2-глутароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; APC – 1-ацил-2-азелоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин.

[#] Автор для переписки.

γ -облученных липопротеинов высокой плотности и идентифицированы как 1-ацил-2-глутароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (GPC) и 1-ацил-2-азелойл-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (APC) [6]. Было постулировано, что такие липиды образуются при окислительном расщеплении двойных связей жирнокислотных остатков арахидоновой и олеиновой кислот в молекуле фосфатидилохолина [7]. Фосфолипиды аналогичной структуры были обнаружены в одной из фосфолипидных фракций бычьего мозга (Depressor-1B), обладающей гипотензивным действием [8]. С помощью ПОЛ, осуществленного на липидах мозга в модельном эксперименте, было установлено, что эти липиды являются продуктами перекисного окисления ненасыщенных фосфолипидов [9]. В работах [10, 11] было показано, что при гемоглобинзависимом перекисном окислении липидов из ненасыщенных фосфатидилолинов образуется APC, ответственный за везикуляцию и утечку ацетилхолинэстеразы и в конечном счете за лизис эритроцитов.

Для получения вышеуказанных фосфолипидов были выбраны полусинтетические методы с использованием природных фосфатидилолинов в качестве исходных соединений. LPC был получен ферментативным гидролизом яичного фосфатидилохолина с помощью фосфолипазы A_2 из яда среднеазиатской кобры и использован в синтезе GPC. Этот лизофосфолипид содержит жирнокислотные остатки преимущественно пальмитиновой (65%) и стеариновой (33%) кислот [12]. Периодатно-перманганатное окисление яичного фосфатидилохолина, содержащего в положении 2 остатки ($n - 9$) ненасыщенных жирных кислот, приводит к образованию APC [13].

Для получения ФАТ применяли известный способ [14], который заключается в гидрировании плазмемимного аналога фосфатидилохолина из сердца быка на PtO_2 , щелочном метанолизе восстановленного фосфолипида и ацетилировании образующегося лизопродукта уксусным ангидридом. Полученный таким способом ФАТ состоит из смеси гексадецильных (78%) и октадецильных (22%) молекулярных видов [14].

Для оценки глубины превращения метгемоглобина в гемихром использовали прием разностной спектрофотометрии. В основе метода лежит уменьшение интенсивности поглощения в области полосы Soret и сдвиг максимума в длинноволновую область при образовании гемихрома (рис. 1). Введение в опытную кювету, содержащую раствор мНб, производных фосфатидилохолина приводит к возникновению разностного спектра с максимумом на 423 нм и минимумом на 405 нм, что типично для перехода этой формы гемопротейна из высокоспинового в низкоспиновое состояние. На рис. 2а представлены зависимости спектральных изменений от концентрации липидных эф-

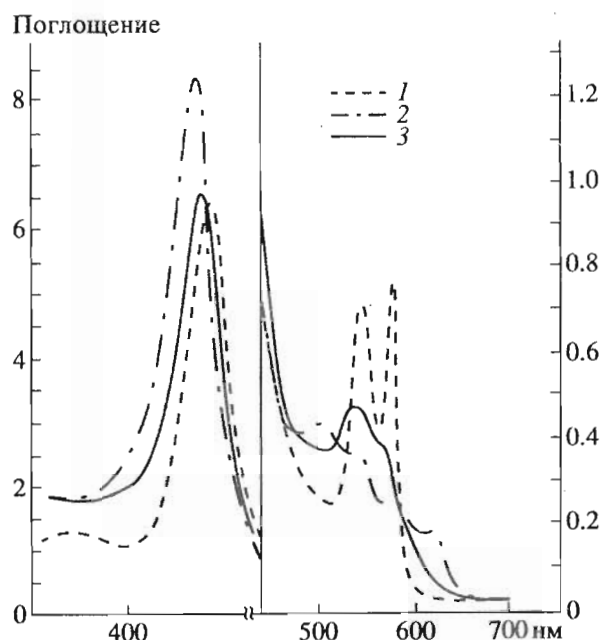


Рис. 1. Спектры поглощения 50 мкМ (в расчете на гем) растворов HbO_2 (1), мНб (2) и гемихрома (3) в 10 мМ трис-НСl, рН 7.4.

фекторов, свидетельствующие о том, что при одних и тех же концентрациях добавленного эфффектора глубина превращения мНб в низкоспиновую форму уменьшается в ряду GPC > APC > олеат > > ФАТ = LPC. Важно отметить, что фосфатидилохолины, ацилированные дикарбоновыми кислотами, являются более сильными эффекторами, чем олеиновая кислота, которая среди жирных кислот оказывает наибольшее влияние на процесс образования гемихрома [1]. В то же время степень воздействия на конформационную стабильность мНб у олеиновой кислоты существенно выше, чем у ФАТ и LPC.

Так как HbO_2 и гемихром имеют близкие спектральные характеристики в области полосы Soret (рис. 1), влияние производных фосфатидилохолина было изучено с помощью разностной спектрофотометрии в области 500–600 нм. Добавление эфффектора в опытную кювету приводит к разностному спектру с максимумами на 519, 561 и 603 нм и минимумами на 544 и 578 нм (рис. 2б). Рост пика на 578 нм в разностном спектре характеризует убыль содержания оксигенированной формы гемоглобина в опытной кювете. На рис. 2б представлены кривые, которые отражают зависимость величины спектральных изменений, выраженной как разность между максимумом на 603 нм и минимумом на 578 нм, от концентрации различных эфффекторов. Как и в случае с мНб, ФАТ и LPC являются слабыми эффекторами превращения HbO_2 в гемихром, а степень воздействия GPC и APC на HbO_2 выше, чем у олеиновой кислоты. Однако

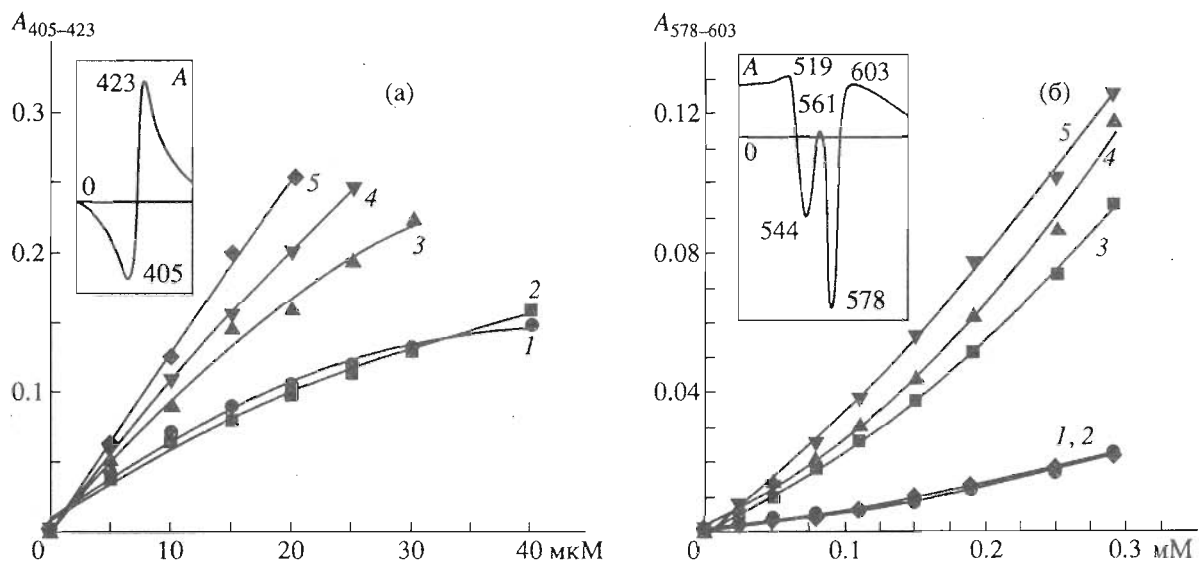


Рис. 2. Зависимость амплитуды спектральных изменений в разностном спектре mHb (а) и HbO₂ (б) от концентрации LPC (1), ФАТ (2), олеиновой кислоты (3), АРС (4) и GPC (5). Концентрация mHb 12 мкМ, HbO₂ 27.4 мкМ в расчете на гем. Температура в ячейке 30°C. На вставке – разностные спектры, полученные после добавления эффектора в опытную кювету.

для достижения той же глубины превращения в гемихром требуются большие, чем в случае mHb, концентрации липидного эффектора. Такое поведение HbO₂ объясняется более высокой стабильностью этой формы гемоглобина по сравнению с mHb [15].

Ранее нами было показано, что индуцированное жирными кислотами аутоокисление HbO₂ сопровождается образованием активных частиц кислорода, которые инициируют реакции ПОЛ [2]. Как следует из данных настоящей работы, аутоокисление существенно облегчается в присутствии продуктов перекисного окисления – GPC и APC. Увеличение при аутоокислении концентрации активных частиц кислорода будет инициировать реакции ПОЛ, продуцирующие новые порции эффекторов. Можно предположить, что эти процессы, протекающие по принципу цепной реакции, могут стать причиной быстрой смерти эритроцитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

HbO₂ выделяли из донорской крови по методу, разработанному Хачатурьяном и соавт. [16]. Дальнейшую очистку HbO₂ проводили с помощью хроматографии на DEAE-сефадексе А-50, как описано в работе [17]. Рабочий раствор HbO₂ был приготовлен в 10 мМ трис-НСl-буферном растворе (рН 7.4) и использовался в течение недели. За это время при хранении раствора при 4°C окисление HbO₂ в mHb не превышало 2%. mHb получали в результате окисления HbO₂ феррицианидом калия. Избыток окислителя и ферроцианид калия удаля-

ли с помощью диализа. Концентрацию гемоглобина определяли по полосе поглощения его комплекса с цианидом калия в области 540 нм, используя коэффициент молярной экстинкции 11.5 мМ⁻¹ см⁻¹. В качестве исходного соединения для получения LPC, GPC и APC использовали яичный фосфатидилхолин Харьковского предприятия по производству бактериальных препаратов. LPC был получен ферментативным гидролизом фосфатидилхолина с помощью фосфолипазы А₂ из яда среднеазиатской кобры по методу, описанному в работе [12], и очищен колоночной хроматографией на силикагеле. APC получали окислением фосфатидилхолина в соответствии с методикой, изложенной в статье [13]. ФАТ синтезировали по методу, предложенному в работе [14].

Получение 1-ацил-2-глутароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (GPC). К 30 мг LPC в 5 мл хлороформа добавляли 24.5 мг глутарового ангидрида (перед использованием перекристаллизован из пентана) и 25.2 мг N,N-диметил-4-аминопиридина. Реакционный сосуд заполняли аргоном и смесь перемешивали без доступа света в течение 72 ч. Затем выпавший осадок отделяли центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин), хлороформ упаривали на роторном испарителе и остаток растворяли в 0.6 мл смеси хлороформ-метанол (2 : 1). Раствор наносили на препаративную пластинку с закрепленным слоем силикагеля (Merck, Германия) и хроматографировали в системе растворителей хлороформ-метанол-25% водный раствор аммиака (13 : 5 : 1, по объему). После высушивания край пластинки обрызгивали реагентом на фосфолипиды [13], полосу, соответствующую по

хроматографической подвижности нижнему синему пятну (R_f 0.09; у исходного LPC 0.16), выскребали и продукт элюировали с силикагеля смесью хлороформ-метанол (1 : 9). По данным анализа на липидный фосфор, выход GPC составил 20.8 мг (56%). ИК (пленка, ν , см^{-1}): 1238 (P=O), 1665 (C=O карбоксильной группы), 1740 (C=O сложноэфирных групп), 2855 (CH_2), 2920 (CH_2). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м. д.): 0.86 (т, 3H, ω - CH_3), 1.28 (м, 32 H, 16 CH_2), 2.36 (м, 6H, 3 CH_2CO), 3.3 (с, 9H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$).

Спектральные методы исследования. Спектры поглощения и разностные спектры регистрировали на приборе Specord UV VIS (Carl Zeiss, Германия). Для получения разностных спектров в опытную кювету вводили мицеллярный раствор эффектора в 10 mM трис-HCl, pH 7.4, а в контрольную кювету – такой же объем буферного раствора. Через 1 мин записывали разностный спектр в области 400–430 нм для mHb и в области 570–610 нм для HbO₂.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахрем А.А., Андреюк Г.М., Кисель М.А., Курбако В.З., Киселев П.А. // Биохимия. 1987. Т. 52. С. 1927–1934.
2. Ахрем А.А., Андреюк Г.М., Гуринович Н.А., Кисель М.А., Киселев П.А. // Биохимия. 1987. Т. 52. С. 2015–2021.
3. Akhrem A.A., Andreyuk G.M., Kisel M.A., Kiselev P.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1989. V. 992. P. 191–194.
4. Литвинко Н.М., Кисель М.А. Эндогенные фосфолипазы A₂: структура и функция. Минск: Наука и техника, 1991.
5. Hanahan D.J. // Annu. Rev. Biochem. 1986. V. 55. P. 483–509.
6. Doussset N., Douste-Blazy L. // Bull. Soc. Chim. Biol. 1969. V. 51. P. 1013–1020.
7. Doussset N., Ferre G., Massol M., Douste-Blazy L. // Arch. Biochem. Biophys. 1986. V. 246. P. 716–724.
8. Tokumura A., Asai T., Takauchi K., Kamiyasu K., Ogasawa T., Tsukatani H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988. V. 155. P. 863–869.
9. Tanaka T., Minamino H., Unesaki S., Tsukatani H., Tokumura A. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. V. 1166. P. 264–274.
10. Itabe H., Kobayashi T., Inoue K. // Biochim. Biophys. Acta. 1988. V. 961. P. 13–21.
11. Itabe H., Kushi Ya., Handa S., Inoue K. // Biochim. Biophys. Acta. 1988. V. 962. P. 8–15.
12. Hanahan D.J., Brockerhoff H., Barron E.J. // J. Biol. Chem. 1960. V. 235. P. 1917–1923.
13. Barsukov L.I., Dam C.W., Bergelson L.D., Muzja G.I., Wirtz K.W.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 519. P. 198–204.
14. Demopoulos C.A., Pinckard R.N., Hanahan D.J. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 9355–9358.
15. Antonini E., Brunori M. Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands. Amsterdam–London: North-Holland Publishing Company, 1971.
16. Хачатурьян А.А., Вязова Е.П., Морозова Г.М., Розенберг Г.Я. // Проблемы гематологии и переливания крови. 1979. № 1, С. 58–60.
17. Huisman T.H.J., Dossy A.M. // J. Chromatogr. 1965. V. 19. P. 160–169.

The Formation of Hemichrome upon Interaction of Hemoglobin with Polar Phosphatidylcholine Derivatives

G. M. Andreyuk and M. A. Kisel*

Institute of Bioorganic Chemistry, Belorussian Academy of Sciences, ul. Zhodinskaya 5/2, Minsk, 220141 Belarus

Abstract—Polar phosphatidylcholine derivatives [1-acyl-2-lyso-*sn*-glycero-3-phosphocholine, 1-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor), 1-acyl-2-glutaryl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, and 1-acyl-2-azelaoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine], which are formed in biological structures by enzymatic and free-radical reactions, were studied as effectors of the conversion of methemoglobin and oxyhemoglobin into an oxidized low-spin form referred to as hemichrome. It is shown that all these phosphatidylcholine derivatives act as effectors in the course of the transition of met- and oxyhemoglobin to hemichrome. Among the compounds studied, phosphatidylcholine derivatives containing glutaric and azelaic acids residues have the greatest effect on the rate of hemichrome formation.

Key words: phosphatidylcholine derivatives, methemoglobin, oxyhemoglobin, hemichrome.