



УДК 547.973:915.5

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕМОГЛОБИНА  
С ОТРИЦАТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫМИ ФОСФОЛИПИДАМИ*Ушакова И. П., Василенко И. А., Серебренникова Г. А.,  
Евстигнева Р. П.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Исследовано образование комплексов гемоглобина с дифосфатидилглицерином, фосфатидилсерином, N-ацетилфосфатидилэтанололамином. Для выделения комплексов использована гель-фильтрация. Получены количественные характеристики агрегатов гемоглобина с отрицательно заряженными фосфолипидами.

Гемоглобин в составе эритроцитов является эффективным переносчиком кислорода. Важно исследовать взаимодействие гемоглобина с фосфолипидными мембранами в плане создания синтетического эритроцита, так как внеэритроцитарный гемоглобин быстро теряет свою функциональную активность [1, 2].

Ранее нами было изучено связывание оксигемоглобина и метгемоглобина с везикулами, построенными из яичного и ряда синтетических фосфатидилхолинов, фосфатидилэтанололамина, различающихся по степени окисленности гидрофобных остатков кислородом воздуха, и холестерина [3, 4].

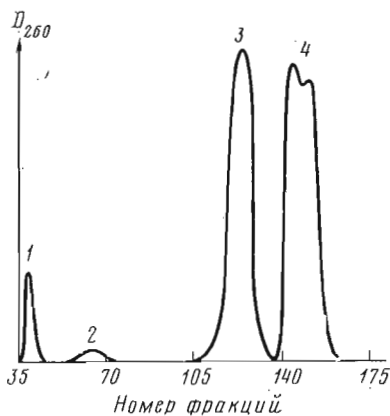
Известно, что отрицательно заряженные фосфолипиды, такие, как фосфатидилсерин, играют важную роль при взаимодействии гемоглобина с эритроцитарной мембраной [5].

Проведенные ранее исследования влияния фосфолипидных везикул на флуоресценцию триптофановых остатков гемоглобина подтвердили существование значительного сродства гемоглобина к таким отрицательно заряженным фосфолипидам, как дифосфатидилглицерин, N-ацетилфосфатидилэтанололамин [4]. С помощью метода флуоресценции установлено, что процесс взаимодействия гемоглобина с отрицательно заряженными фосфолипидами имеет сложный, отличный от взаимодействия с нейтральными фосфолипидами, характер. Так, например, при взаимодействии гемоглобина с дифосфатидилглицериновыми везикулами образуются два вида комплексов. В одном из них флуоресценция триптофановых остатков гемоглобина усиливается, а в другом тупится.

В связи с этим представляло интерес изучить этот процесс более детально. С этой целью смесь, образующуюся после обработки ультразвуком дисперсии фосфолипидов в водном растворе гемоглобина, разделяли методом гель-фильтрации на сефарозе 4В.

На рисунке показана последовательность, в которой выходят с колонки при гель-фильтрации компоненты исследуемой смеси: фосфолипидные везикулы, содержащие гемоглобин, фосфолипидные везикулы, агрегаты гемоглобина с отрицательно заряженными фосфолипидами, свободный гемоглобин. Полученные данные показывают, что в случае включения гемоглобина в мембраны, построенные из отрицательно заряженных фосфолипидов, только 3—5% первоначально взятых липидов расходуется на образование комплекса с белком в везикулярной форме. Кроме того, наблюдается образование липид-белковых агрегатов, имеющих иное строение. Результаты опытов представлены в таблице.

Количественной характеристикой этих агрегатов является липид-белковое соотношение, вычисленное на основании данных анализа содержания белка и фосфора во фракциях при гель-фильтрации дисперсии фосфо-



Гель-фильтрация на сефарозе 4В продуктов взаимодействия гемоглобина с озвученными везикулами: 1 — фосфолипидные везикулы с встроенным гемоглобином, 2 — фосфолипидные везикулы, 3 — агрегаты гемоглобина с отрицательно заряженными фосфолипидами, 4 — свободный гемоглобин

липидов в растворе гемоглобина, обработанных ультразвуком (таблица). Весовое соотношение белок — фосфолипид в исходной схеме 5 : 1.

Представляет интерес структурная организация агрегатов, образующихся при взаимодействии гемоглобина с отрицательно заряженными фосфолипидами. По данным гель-фильтрации, полученным в результате четырех опытов для каждого фосфолипида, образующиеся комплексы имеют постоянный размер. Если предположить, что липид-белковый агрегат имеет однородную структуру, т. е. плотность во всех его частях одна и та же, то можно установить его ориентировочный «молекулярный» вес. Для этого нами была использована колонка, откалиброванная с помощью следующих белков: гемоглобина ( $M$  64 000), ферритина ( $M$  450 000) и каталазы ( $M$  240 000).

«Молекулярные» веса агрегатов гемоглобина с отрицательно заряженными фосфолипидами приведены в таблице.

Зная эти величины и липид-белковое соотношение в комплексе, мы вычислили наиболее вероятный средний состав агрегатов, т. е. количество молекул гемоглобина и липида, входящих в состав одного агрегата (таблица).

Результаты опытов свидетельствуют о том, что дифосфатидилглицерин по сравнению с другими отрицательно заряженными фосфолипидами имеет способность наиболее эффективно связывать гемоглобин.

Фосфатидилсерин и N-ацетилфосфатидилэтаноламин при взаимодействии с гемоглобином образуют аналогичные комплексы (таблица). Однако вследствие наличия у фосфатидилсерина положительного заряда его взаимодействие с гемоглобином несколько слабее, относительные размеры агрегатов с белком меньше.

Характеристики агрегатов гемоглобина с отрицательно заряженными фосфолипидами

Фосфолипид	Весовое соотношение белок — фосфолипид	Молярное соотношение фосфолипид — белок	Количество молекул гемоглобина в комплексе	«Молекулярный» вес агрегата
Дифосфатидилглицерин	2,9	15,7	3,2	275 000
N-Ацетилфосфатидилэтаноламин	1,8	47,4	1,8	180 000
Фосфатидилсерин	1,6	51,8	1,5	157 500

При инкубации отрицательно заряженных фосфолипидных везикул с водным раствором гемоглобина наблюдалась дезинтеграция белковых везикулярных структур и образование комплексов, рассмотренных выше.

Аналогичным образом при взаимодействии с отрицательно заряженными фосфолипидами ведет себя и метгемоглобин.

## Экспериментальная часть

Для исследования использованы дифосфатидилглицерин бычьего сердца отечественного производства, дрожжевой фосфатидилсерин [6], N-ацетилфосфатидилэтанолламин, полученный N-ацетилированием [7] фосфатидилэтанолламина, выделенный из яичных желтков.

Гемоглобин, выделенный из эритроцитов крови человека, предоставлен Центральным научно-исследовательским институтом гематологии и переливания крови\*. Метгемоглобин получали окислением водных растворов оксигемоглобина кислородом воздуха.

Для калибровки колонки по молекулярному весу использованы ферритин и каталаза (Pharmacia, Швеция).

Для приготовления бислойных везикул раствор липида в бензоле упаривали досуха в вакууме, добавляли 27% раствор гемоглобина в воде (весовое соотношение фосфолипид — гемоглобин 1:5), образец встряхивали в течение 10 мин. Полученную грубую дисперсию обрабатывали 6 мин ультразвуком на приборе УЗДН-1 (частота 44 кГц) при охлаждении льдом.

Полученную дисперсию центрифугировали 10 мин при 10 000g, а затем разделяли гель-фильтрацией на сефарозе 4В (колонка 16×950 мм). Элюировали буфером 0,005 М трис-HCl/0,001 М EDTA, pH 7,4. Объем фракции 1 мл, скорость элюирования 12 мл/ч.

Количество гемоглобина во фракциях анализировали по методу Лоури [8].

Концентрацию фосфолипидов во фракциях определяли по содержанию фосфора с помощью модифицированного метода Барлета [9].

Электронные спектры сняты на спектрофотометре «Hitachi EPS-3T» (Япония).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Rabiner S. F., Helbert J. R., Lopas H., Friedman L. H. *J. Exptl Med.*, 1967, v. 126, № 6, p. 1127–1142.
2. Rabiner S. F., O'Brein K., Peskin G. W., Friedman L. H. *Ann. Surgery*, 1970, v. 471, № 4, p. 615–622.
3. Ушакова И. П., Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. И. *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 7, с. 1062–1067.
4. Ушакова И. П., Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. И. *Биоорганическая химия*, 1981, т. 7, № 4, с. 613–620.
5. Szundi I., Szelényi J. G., Brener J. H., Berczi A. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 595, № 1, p. 41–46.
6. Ansell G. B., Hawthorne J. N., Dawson R. M. C. *Form and function of phospholipids*. Amsterdam — London: American Elsevier Publishing Co., Inc.— N. Y., 1973, 494 p.
7. Aneja R., Chudhe J. S., Knagg J. A. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1969, v. 36, № 3, p. 401–406.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *Biol. Chem.*, 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.
9. Bartlett G. R. *J. Biol. Chem.*, 1959, v. 234, № 3, p. 466–468.

Поступила в редакцию  
23.VII.1981

## A STUDY ON HEMOGLOBIN INTERACTION WITH NEGATIVELY CHARGED PHOSPHOLIPIDS

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

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

Interaction of hemoglobin with diphosphatidylglycerol, phosphatidylserine and N-acetylphosphatidylethanolamine was studied. Hemoglobin-lipid complexes were isolated by gel filtration and their parameters were determined.

\* Авторы выражают благодарность проф. Г. Я. Розенбергу и ст. научн. сотр. Г. Н. Кольцовой за предоставление гемоглобина (ЦНИИ гематологии и переливания крови).