

Д. Л. РУБИНШТЕЙН и Р. А. РУТБЕРГ

О ГЕМОЛИПОСТРОМАТИНОВОМ КОМПЛЕКСЕ ЭРИТРОЦИТА

(Представлено академиком А. И. Опариным 5 I 1950)

С начала изучения эритроцита высказывалось два противоположных представления об его структуре. Согласно одному из них, эритроцит представляет собой пузырек, содержащий концентрированный раствор гемоглобина внутри тончайшей оболочки из стромы. С другой стороны, выдвигалось предположение, что гемоглобин связан в виде рыхлого (адсорбционного или химического) соединения со стромой, образующей внутри эритроцита губчатый студень. Оба эти представления в действительности не исключают друг друга. Однако обычно они резко противопоставлялись.

Обе рассматриваемые концепции структуры эритроцита приводят к различным представлениям о механизме гемолиза. В первом случае гемолиз трактуется как повреждение оболочки эритроцита, через разрывы которой гемоглобин свободно диффундирует наружу. Во втором предполагается, что гемолиз зависит от распада комплекса, образуемого гемоглобином с веществом стромы. Общий ход гемолиза должен различным образом протекать в обоих случаях, что открывает возможность экспериментального решения вопроса.

Если гемоглобин свободен и задерживается внутри эритроцита только непроницаемостью его оболочки, то процесс гемолиза должен протекать по закону «все или ничего». Усиление гемолиза по мере роста гипотонии должно зависеть исключительно от увеличения числа поврежденных эритроцитов и делаться полным при повреждении 100% эритроцитов. Если, напротив, гемоглобин в эритроцитах комплексно связан со стромой, то даже после полного разрыва оболочки связанная часть гемоглобина может удерживаться на стромах.

Такой полный разрыв всех эритроцитов, как известно, считается достигнутым при осмотическом гемолизе, когда гипотония гемолизирующего раствора достигает точки так называемой «максимальной резистентности». В этой точке взвесь эритроцитов делается совершенно прозрачной, «лаковой», и гемолиз считается полным. Поставленный нами вопрос, казалось бы, легко мог быть решен путем выяснения того, действительно ли после разрыва оболочки весь гемоглобин оказывается свободным и может быть полностью отделен от стромы простым отмытием.

К сожалению, проведение этого простого опыта наталкивается на большие трудности. Отмывание стромы нельзя производить дистиллированной водой, так как последняя, отнимая возрастающие количества гемоглобина, одновременно приводит к все большему разбуханию и разрыхлению осадка стромы и к невозможности отделить его путем центрифугирования. Давно уже делались попытки отмывать стромы после

осмотического гемолиза физиологическим раствором (0,9%) NaCl. Эти опыты привели к обнаружению своеобразного явления обращения (или реверсии) гемолиза, вызвавшего большие споры в литературе. Согласно господствующему представлению (1), не подтверждаемому нашими опытами (2), обращение гемолиза сопровождается обратным связыванием части растворенного гемоглобина, вновь фиксируемого на стромах. Поэтому отмывание физиологическим солевым раствором также непригодно для однозначного решения вопроса о распределении гемоглобина в гемолизированных стромах.

Поставленный вопрос нам удалось решить при помощи следующего экспериментального приема. После гемолиза, произведенного добавлением к эритроцитам дистиллированной воды, определялась (методом электропроводности) солевая концентрация гемолизата. Так например, при полном гемолизе 1 мл отцентрифугированных эритроцитов (свежей донорской крови) добавлением 4 мл дистиллированной воды получался гемолизат изоосмотичный приблизительно 0,15% NaCl. Раствором такой же концентрации осадок стром повторно отмывался на суперцентрифуге (при скоростях не менее 8000—10000 об/мин.) до получения совершенно бесцветной промывной жидкости. Осадок стром оставался при этом интенсивно красным и сохранял в своем составе около 1/3 исходного содержания гемоглобина. Последний легко было отщепить от стром и освободить для колориметрического определения действием сапонина или какого-либо другого химического гемолитика. Так как промывание производилось в данном случае раствором той же концентрации NaCl, которая вызывала гемолиз, то задержку в стромах гемоглобина нельзя было объяснить действием более концентрированного раствора, уплотняющего оболочку эритроцита и делающего ее вновь непроницаемой для сохранившегося внутри нее растворенного гемоглобина. Даже при понижении солевой концентрации гемолизирующего раствора до 0,05% NaCl в эритроцитных стромах сохраняется около 15—20% «остаточного гемоглобина».

Подобного рода опыты, многократно нами повторенные, не оставляют сомнений в существовании достаточно стойкого комплекса, образуемого гемоглобином с веществом эритроцитных стром, в частности со структурным белком эритроцита — строматином. Для обозначения этого комплекса нами еще в 1945 г. было введено название гемостроматин (2, 3).

Тогда же нами было выдвинуто предположение об участии в этом комплексе, кроме гемоглобина и строматина, также некоторых липоидов эритроцита, в случае чего самый комплекс следовало бы обозначить как гемолипостроматин. Это предположение подтверждается дальнейшими работами нашей лаборатории. Они прежде всего показывают, что (в противоположность осмотическому гемолизу, не производящему полного разрушения гемостроматина) химические гемолитики (сапонин, дигитонин, желчнокислые соли и т. п.), разрывающие связи гемоглобина с липоидами, полностью разрушают его комплексную связь со стромой и приводят к отщеплению всего гемоглобина без остатка. Отмывание последнего физиологическим солевым раствором позволяет приготовить чистый строматин, совершенно свободный от гемоглобина (4). Поэтому химический гемолиз положен в основу разработанного нами в настоящее время препаративного метода приготовления чистого строматина, вместо обычно применяемых методов, в основу которых положен гемолиз осмотический.

Структура гемолипостроматина может быть конкретизирована путем изучения тех изменений, которым подвергаются отдельные липоидные фракции эритроцита при гемоглинолизе. Осмотический гемолиз, который, как было выше показано, приводит лишь к частичному отщеплению гемоглобина, как известно, не сопровождается потерей стромой

липоидов. Проведенное одним из нас (Р. Рутберг) в настоящее время исследование показывает, что, в противоположность этому, при гемоглинолизе, вызываемом химическими гемолитиками, одновременно с полным отщеплением гемоглобина (производимым сапонином при конечной концентрации 0,02% и холеинатом натрия при 0,4%) строма теряет до 20—30% содержащегося в ней холестерина. Напротив, фосфатиды не подвергаются в условиях гемоглинолиза каким-либо закономерным изменениям. Эти наблюдения дают основание заключить об участии холестерина, наряду со строматином, в образовании комплексной связи с гемоглином в эритроците.

Химическая структура гемоглипостроматина была точнее установлена проведенными в 1948—1949 гг. опытами (Р. Рутберг), при которых впервые удалось синтезировать этот комплекс из его составных частей.

Для этих опытов были применены совершенно бесцветные стромы, полностью очищенные от следов гемоглинолина по указанному выше методу и отмытые дистиллированной водой от солей. Стромы приводились в соприкосновение с раствором гемоглинолина (оптимальный срок взаимодействия от 2,5 до 24 час.), после чего избыток гемоглинолина повторно отмывался дистиллированной водой до получения совершенно бесцветной промывной жидкости. При этом осадок стром вновь приобретал красную окраску в результате связывания растворенного гемоглинолина, т. е. образования гемоглиноинового комплекса.

Вновь разрушить синтезированный комплекс и освободить связанный гемоглинолин можно было путем обработки стром физиологическим раствором NaCl или изотоническими растворами других солей (KCl, CaCl₂, Na₂HPO₄), а также сывороткой крови. Это действие солевых растворов не зависело от pH в пределах, не вызывающих денатурации дыхательного пигмента (в растворах фосфатного буфера при pH от 5,0 до 7,0). Напротив, комплекс стойко сохранялся в дистиллированной воде, а также в растворах неэлектролитов (например, в изотонических растворах глюкозы и сахарозы). Повидимому, стабилизирующее влияние дистиллированной воды на комплексное связывание гемоглинолина стромой играет существенную роль в невозможности добиться путем предельной гипотонии полного отрыва гемоглинолина при осмотическом гемолизе эритроцитов.

Овладев таким образом возможностью искусственно связывать гемоглинолин со стромой, мы приступили к изучению структуры образуемого ими комплекса. Прежде всего удалось установить, что гемоглинолин фиксируется на строме белковой, глобиноиной частью своей молекулы, между тем как протетическая группа гема остается реактивной и сохраняет свою физиологическую способность связывать молекулярный кислород. Об этом свидетельствует сохранение фиксированным на строме гемоглином кислородной емкости (определяемой обычным способом на аппарате Ван-Слайка), а также возможность окислять гемоглинолин (перекисью водорода, красной кровяной солью и т. п.) в метгемоглинолин без отрыва его от стром.

Для выяснения участия отдельных химических компонентов стром в связывании гемоглинолина производилась экстракция из них липоидов. С указанной целью применялась горячая экстракция спиртом. Она производилась в аппарате Сокслета (с специальным приспособлением для горячей экстракции) и продолжалась в течение нескольких дней. Многочисленные опыты показали, что полученный в результате такой обработки строматин в значительной степени или полностью терял свою первоначальную способность связывать гемоглинолин в описанных выше условиях. Так например, в одном опыте связывание гемоглинолина составляло на 1 г строматина до экстракции 500 мг, между тем как после экстракции оно падало практически до нуля. В другом опыте оно составляло до экстракции 697 мг, после экстракции снижалось до 48 мг.

Содержание гемоглобина в комплексе определялось после его минерализации по содержанию в нем железа (причем вводилась поправка на содержание «негематинового железа» стром (4), измеряемого в контрольной пробе).

Первоначальная способность стром связывать гемоглобин полностью восстанавливалась при добавлении к строматину экстрагированных липоидов. В дальнейших опытах последние предварительно фракционировались. (С этой целью они после удаления спирта растворялись в эфире, и фосфатидная фракция, осаждавшаяся из эфирного раствора ацетоном, отделялась от стериновой, растворимой в ацетоне). К тщательно растертой навеске чистого строматина обе фракции — фосфатидная и стериновая — добавлялись порознь. Липоиды добавлялись в эфирном растворе (причем эфир удалялся затем путем кратковременного нагревания до 37°) или же в виде тонкой эмульсии с раствором гемоглобина. Навеска строматина составляла обычно 30 мг, что приблизительно отвечало 4,5 мл отцентрифугированных эритроцитов; липоиды соответствовали несколько большему (приблизительно удвоенному) количеству эритроцитов, так как часть их терялась при последующем отмывании осадка от избытка гемоглобина. Следующие примеры фиксации гемоглобина осадком свидетельствуют о решающей роли холестерина.

Фиксация гемоглобина (при пересчете на 1 г строматина):

При добавлении холестерина	1003 мг	591 мг	573 мг
» » фосфатидов	163 »	35 »	36,7 »

Очевидно, соединение гемоглобина со строматином происходит через посредство холестеринавой фракции липоидов: стерины служат связующим звеном между обоими белками.

Синтезированный нами строматин-холестерин-гемоглобиновый комплекс приближает нас к пониманию химической структуры эритроцита, хотя, разумеется, полностью ее не воспроизводит, отличаясь, прежде всего, несравненно большей чувствительностью к действию солей. Выяснение химической природы полученного комплекса требует дальнейших исследований.

Центральный институт гематологии
и переливания крови

Поступило
5 I 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Davson and J. Danielli, *Permeability of Natural Membranes*, Cambridge, 1943. ² Д. Рубинштейн и З. Баринава, *Биохимия*, 10, 243 (1945). ³ Д. Рубинштейн, *Усп. совр. биохим.*, 1, 236 (1947). ⁴ Д. Рубинштейн и Р. Рутберг, *Биохимия*, 13, 147 (1948).