



УДК 547.953/672.1:577.336

МЕМБРАННЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ

I. ВВЕДЕНИЕ АНТРИЛЬНОГО ФЛУОРОФОРА В ГИДРОФОБНУЮ ЧАСТЬ ПРИРОДНЫХ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА И ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛАМИНА

*Богомолов О. В., Каплун А. П., Швец В. И.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Описан метод получения флуоресцентных аналогов фосфатидилхолина и фосфатидилэтанолamina взаимодействием яичных фосфолипидов с антраценом в условиях реакции Фриделя — Крафта. При этом образуется 22% антрилфосфатидилхолина и 11% антрилфосфатидилэтанолamina. Антрильная группа в основном вводится в ацильный остаток, находящийся во втором положении глицеринового скелета молекулы фосфолипида: 95% — в случае фосфатидилхолина и 90% — в случае фосфатидилэтанолamina.

Флуоресцентные зонды липидной природы нашли широкое применение в качестве инструмента для исследования модельных и биологических мембран [1]. Простейшим методом получения липидных зондов является введение флуоресцентной метки в полярную часть природных фосфолипидов. Так были получены модифицированные по полярной группе фосфатидилэтанолamin [2—6] и фосфатидилсерин [7]. Однако модификация полярной головки приводит к потере классовой принадлежности фосфолипида; более предпочтительно введение флуорофора в гидрофобную часть молекулы.

Наиболее распространенный метод получения флуоресцентно-меченного по гидрофобной части фосфатидилхолина состоит в ацилировании активированными производными флуоресцентных жирных кислот лизофосфатидилхолина [8—11]. Модификация по гидрофобной части других фосфолипидов осложняется необходимостью защищать функциональные группы [12].

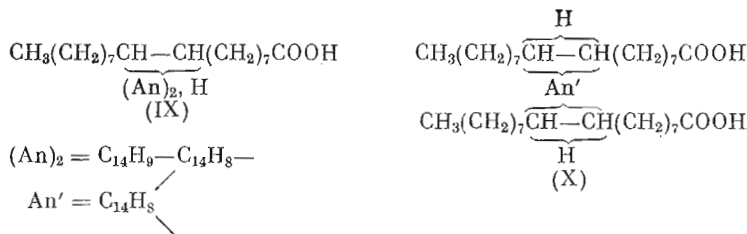
Многостадийность синтеза большинства флуоресцентных липидных зондов ограничивает их использование, поэтому наши исследования были направлены на поиск метода прямого введения флуорофора в гидрофобную часть природных фосфолипидов.

Наличие двойных связей в большинстве природных липидов определило метод введения флуоресцентной метки. На примере алкилирования антрацена олеиновой кислотой по Фриделю — Крафту [13] была продемонстрирована принципиальная возможность такого подхода и были определены основные условия оптимального проведения реакции и структура образующихся веществ. Этот метод был использован нами для получения антрилмеченых фосфатидилхолина [14] и фосфатидилэтанолamina исходя из соответствующих яичных фосфолипидов.

Реакции проводили так же, как и в случае получения 9(10)-антрилстеариновой кислоты (V) [13] — в дихлорэтane при 18—22°С (схема 1). Меченые фосфолипиды выделяли колоночной хроматографией на силикагеле. По хроматографической подвижности полученные вещества (III), (IV) не отличались от природных фосфатидилхолина (I) и фосфатидилэтанолamina (II), их УФ-спектры и спектры флуоресценции подобны спектрам 9(10)-антрилстеариновой кислоты (V).

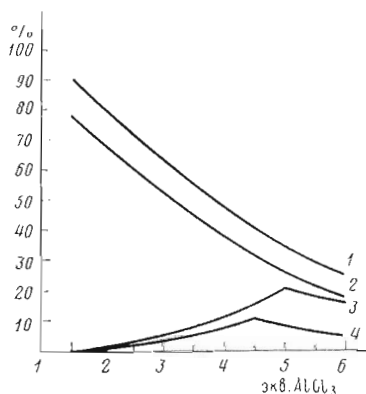
Для количественной оценки содержания метки в полученных веществах (III), (IV) был синтезирован фосфатидилхолин (VIII) (схема 2), содержащий во втором положении глицеринового остатка 9(10)-антрилстеариновую кислоту (V).

ном гидролизе были выделены кислоты (IX), (X), полученные и при алкилировании антрацена олеиновой кислотой [13].



Эти побочные реакции приводили к существенному уменьшению выхода целевых веществ (III), (IV) при использовании более 5 экв. хлористого алюминия в реакции с фосфатидилхолином (I) или 4,5 экв. — с фосфатидилэтанололамином (II) (рисунок).

Таким образом, наилучшие результаты получались при проведении реакции в дихлорэтаноле при 18–22° С с 4–5-кратным избытком хлористого



Зависимость выхода флуоресцентно-меченых фосфолипидов от количества хлористого алюминия: 1 — антрилфосфатидилхолина (III) в смеси с исходным фосфатидилхолином; 2 — антрилфосфатидилэтанол-амина (IV) в смеси с исходным фосфатидилэтанол-амином; 3 — антрилфосфатидилхолина (III); 4 — антрилфосфатидилэтанол-амина (IV)

алюминия. При этом выход флуоресцентно-меченого фосфатидилхолина (III) достигал 22%, а фосфатидилэтанол-амина (IV) — 11%.

По данным масс-спектрометрии, при гидролизе меченых фосфолипидов (III), (IV) образовывалась в основном 9(10)-антрилстеариновая кислота (V) (M^+ , m/z 460), из других антрилсодержащих кислот только в случае фосфатидилэтанол-амина отмечалось образование антрилоктадеценовой кислоты (интенсивность молекулярного иона (m/z 458) составляла ~5% интенсивности молекулярного иона кислоты (V)). Фосфолипиды (III), (IV) расщеплялись фосфолипазой A₂ змеиного яда (на 85–90%)*, при этом 90–95% флуоресцентной метки содержалось в жирных кислотах, а 5–10% — в лизофосфолипидах.

Таким образом, описанный метод получения флуоресцентно-меченых фосфатидилхолина и фосфатидилэтанол-амина мало уступает традиционным методам по селективности введения метки, но намного превосходит их по простоте. Спектральные и другие физико-химические свойства антрилмеченых фосфолипидов (III, IV, VIII) позволяют использовать их в традиционных областях приложения липидных флуоресцентных зондов [1].

Экспериментальная часть

УФ-спектры и спектры флуоресценции измерены на спектрофотометре Hitachi EPS-3T (Япония), масс-спектры — на спектрометре Varian MAT-311A (США). Удаление растворителей проводили в вакууме при температуре не более 36° С. Для колоночной хроматографии применяли силикагель L40/100 (Chemapol, СССР), для ТСХ — силуфол UV-254. ТСХ

* Дальнейшее расщепление фосфолипидов (III), (IV) проходило с незначительной скоростью и сопровождалось накоплением продуктов неспецифического гидролиза.

осуществляли в системах хлороформ — метанол — вода, 65:25:4 (А), хлороформ — метанол — конц. NH_4OH , 65:35:5 (Б). Для обнаружения веществ на хроматограммах использовали флуоресценцию при УФ-облучении (а), молибденовый синий (б) и вингидрин (в).

Дициклогексилкарбодимид, 4-диметиламинопиридин (Fluka, Швейцария) и яичный фосфатидилхолин (отечественного производства) использовали без дополнительной очистки. Яичный фосфатидилэтанолламин выделяли из фосфолипидной смеси (отечественное производство) колоночной хроматографией на силикагеле ([15], с. 141, 142). Лизофосфатидилхолин получали из яичного фосфатидилхолина ([15], с. 117, 118).

1-Ацил-2-[9(10)-антрилстеариол]-sn-глицеро-3-фосфохолин (VIII). Раствор 17,5 мг дициклогексилкарбодимида в 0,5 мл сухого свежеперегнанного CCl_4 прибавляли к раствору 78 мг 9(10)-антрилстеариновой кислоты (V) [13] в 1,5 мл CCl_4 , смесь выдерживали 3 ч при 18–20° С и упаривали. Остаток растворяли в 2 мл CH_2Cl_2 и прибавляли при перемешивании к смеси 28 мг лизофосфатидилхолина (высушенного в вакууме в течение 1 сут) и 15 мг 4-диметиламинопиридина. Смесь перемешивали 1 сут в атмосфере аргона при 20° С, разбавляли 10 мл хлороформа, промывали 1% HCl с 1% NaCl (2×3 мл), 1% NaCl (2×3 мл) и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с 17 г силикагеля в ступенчатой градиентной системе хлороформ — метанол, получали 30 мг (56%) антрилмеченого фосфатидилхолина (VIII) в виде желтоватой воскообразной массы, R_f 0,4 (А), 0,5 (Б, обнаружение: а, б), $[\alpha]_D +8,8^\circ$ (с 1,5; хлороформ). УФ-спектр (метанол), $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ε): 257 (56 000), 330 (1600), 345 (2700), 364 (3500), 382 (2900); спектр флуоресценции (метанол) при $\lambda_{\text{возб}}$ 360 нм: $\lambda_{\text{макс}}$ испускания 415 нм.

Антрилфосфатидилхолин (III). 118 мг фосфатидилхолина (I) и 41 мг антрацена растворяли в 4 мл сухого дихлорэтана и при перемешивании прибавляли постепенно 103 мг безводного AlCl_3 . Смесь перемешивали 1 ч при 18–22° С, последовательно прибавляли 1,5 мл 1% HCl , 6 мл MeOH и 1 мл воды. Органический слой отделяли, водно-метанольный промывали хлороформом (3×5 мл), объединенные хлороформные экстракты промывали водой (10 мл) и упаривали. Остаток (165 мг) хроматографировали на колонке с 16 г силикагеля в ступенчатой градиентной системе хлороформ — метанол. Получали 47 мг антрилфосфатидилхолина (III) в виде желтоватого воскообразного вещества, R_f 0,4 (А), 0,5 (Б, обнаружение: а, б); $[\alpha]_D +8,7^\circ$ (с 1,5; хлороформ). По данным УФ-спектра, подобного спектру фосфатидилхолина (VIII), содержание метки составляло 67% (выход 22%).

Антрилфосфатидилэтанолламин (IV). Из 105 мг фосфатидилэтанолламина (II), 38 мг антрацена и 86 мг безводного AlCl_3 по методике, описанной для фосфатидилхолина (III), получали 37 мг хроматографически однородного антрилмеченого фосфатидилэтанолламина (IV) в виде желтоватого воскообразного вещества, R_f 0,65 (А, обнаружение: а, б, в); $[\alpha]_D +6,7^\circ$ (с 1,5; хлороформ). По данным УФ-спектра, содержание метки составляло 38% (выход 11%); спектр флуоресценции тот же, что и для фосфатида (VIII).

Расщепление антрилмеченых фосфолипидов (III), (IV), (VIII) фосфолипазой A_2 . 1) В пробирке объемом 15 мл выпаривали 0,5 мл 0,1% бензольного раствора антрилмеченого фосфатидилхолина (VIII) и 45 мкл 10% спиртового раствора яичного фосфатидилхолина. К ним добавляли 5 мл эфира и 0,5 мл раствора 1 мг лиофилизованного яда *Crotalus adamanteus* (Serva, США) в 0,1 М боратном буфере (pH 7,5), содержащем 1,6 мг CaCl_2 . Смесь энергично встряхивали 15 мин при 35° С и инкубировали 4 ч при 20° С. Растворители упаривали, остаток растворяли в 2 мл смеси хлороформ — метанол (1:1), центрифугировали, супернатант перенесли в другую пробирку, упаривали и остаток разделяли на колонке с 1 г силикагеля в градиентной системе хлороформ — метанол. Фосфатидилхолин отсутствовал. Количество антрильной метки, определенное по поглощению при 364 нм, составляло: во фракции жирных кислот — 95%, а во фракции лизофосфатидилхолина — 5%.

2) Ферментативное расщепление антрилфосфатидилхолина (III) осуществляли так же, как в пункте 1. В реакционной смеси присутствовал нерасщепившийся флуоресцентно-меченый фосфатидилхолин. Во фракции жирных кислот содержалось 80% метки, в лизофосфатидилхолине — 5% и в нерасщепившемся фосфатидилхолине — 15%.

3) В пробирке объемом 15 мл выпаривали 0,5 мл 0,1% бензолного раствора антрилмеченого фосфатидилэтанолamina (IV) и 45 мкл 10% спиртового раствора яичного фосфатидилхолина. Дальнейшие операции проводили так же, как в пункте 1. Жирные кислоты содержали 75% метки, лизофосфатидилэтанолamin — 10% и нерасщепившийся фосфатидилэтанолamin — ~15%.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980, 320 с.
2. *Waggoner A., Stryer L.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 67, № 2, p. 579–589.
3. *Naqvi K., Behr J.-P., Chapman D.* Chem. Phys. Lett., 1974, v. 26, № 3, p. 440–444.
4. *Monti J., Christian S., Shaw W. J.* Lipid Res., 1978, v. 19, № 2, p. 222–228.
5. *Chang B., Huang L.* Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 556, № 1, p. 52–60.
6. *Owen C. J.* Membrane Biol., 1980, v. 54, № 1, p. 13–20.
7. *Harris W.* Chem. Phys. Lipids, 1977, v. 19, № 3, p. 243–254.
8. *Stoffel W., Michaelis G. Z.* Physiol. Chem., 1976, B. 357, H. 1, S. 7–19.
9. *Каплун А. П., Башарули В. А., Швеуц В. И.* Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1567–1568.
10. *Молотковский Ю. Г., Дмитриев П. И., Никулина Л. Ф., Бергельсон Л. Д.* Биооргани. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 588–594.
11. *Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д.* Биооргани. химия, 1982, т. 8, № 9, с. 1256–1262.
12. *Somerharju P., Wirtz K.* Chem. Phys. Lipids, 1982, v. 30, № 1, p. 81–91.
13. *Богомолов О. В., Каплун А. П., Швеуц В. И.* Биооргани. химия, 1984, т. 10, № 7, с. 975–978.
14. А. с. 1068441 (СССР). Способ получения флуоресцентного фосфатидилхолина / Богомолов О. В., Каплун А. П., Швеуц В. И. Опубл. в Б. И., 1984, № 3.
15. *Бергельсон Л. Д., Дятлосицкая Э. В., Молотковский Ю. Г. и др.* Препаративная биохимия липидов. М.: Наука, 1981, 256 с.

Поступила в редакцию
23.IV.1984

MEMBRANE FLUORESCENT PROBES. I. INCORPORATION OF ANTHRIL FLUOROPHORE INTO THE HYDROPHOBIC MOIETY OF NATURAL PHOSPHATIDYLCHOLINE AND PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE

BOGOMOLOV O. V., KAPLUN A. P., SHVETS V. I.

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

The method for preparation of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine fluorescent analogues involving the interaction of egg phospholipids and anthracene under Friedel–Crafts reaction conditions is described. This gives rise to formation of 22% anthrylphosphatidylcholine and 11% anthrylphosphatidylethanolamine. The anthryl group is mainly incorporated into the acyl moiety in the second position of the glycerol backbone of the phospholipid molecule (95 and 90% for phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine, respectively).