



УДК 577.352.2/3:543.422.25:547.953.057

**СИНТЕЗ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТИОФОСФАТИДИЛХОЛИНА  
В ИССЛЕДОВАНИИ МЕМБРАН МЕТОДОМ  $^{31}\text{P}$ -ЯМР***Чупин В. В., Малина Е. В., Ревенко И. В.,  
Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Синтезирован аналог фосфатидилхолина, у которого фосфоэфирная группа заменена на тиофосфоэфирную. Методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР изучены свойства водных дисперсий, содержащих тиофосфатидилхолин и дифосфатидилглицерин. Химические сдвиги фосфолипидов природной структуры и их тиоаналогов различаются на 19 м.д. Это позволяет с помощью методики селективного насыщения («DANTE») дифференцировать тиофосфолипиды даже в составе липосомных мембран, где ширина сигналов достигает 50 м.д. Сделан вывод о возможности использования тиоаналогов фосфолипидов в качестве зондов для изучения мембран методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР.

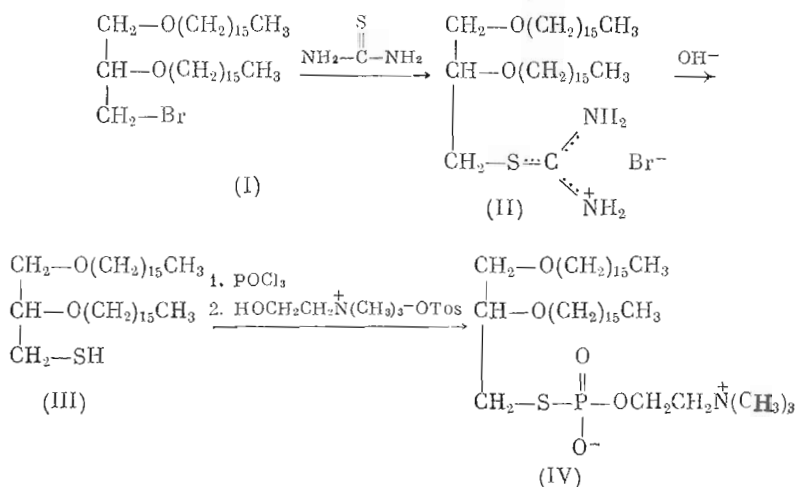
Спектроскопия ЯМР нашла широкое применение в исследовании структурной организации биологических и модельных мембран. Этот метод использовался при изучении таких явлений, как мембранная асимметрия [1], латеральная [2] и трансбислойная [1] диффузия липидов, липид-белковое взаимодействие [3], сегментная подвижность липидных молекул в мембране [4], полиморфизм липидов [5]. К достоинствам ЯМР следует отнести большую информативность и отсутствие возмущающих воздействий на мембрану.

В настоящее время возможности ЯМР в исследовании мембран значительно расширились. Это объясняется главным образом двумя причинами: 1) новые импульсные ЯМР-спектрометры отличаются повышенной чувствительностью и позволяют получить большую информацию о структурных и динамических свойствах мембран; 2) достижения в химии липидов позволяют без значительных затрат времени и труда синтезировать модифицированные липиды с изотопными метками. Использование липидов, меченных изотопами  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ , дает возможность следить за поведением отдельных липидных молекул в мембранах методами  $^{13}\text{C}$ - и  $^2\text{H}$ -ЯМР [6, 7].

Особенно широко в исследовании мембран применяется метод  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. Высокое естественное содержание и большое гироманнитное отношение ядра  $^{31}\text{P}$  обуславливает значительно большую чувствительность данного метода по сравнению с  $^{13}\text{C}$ - и  $^2\text{H}$ -ЯМР. Кроме того, анализ формы линий в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР позволяет судить об упаковке липидных молекул в мембране [5]. К сожалению, в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР мембран фосфолипиды различных классов дают один неразрешенный сигнал (исключение составляют лишь озвученные везикулы). Поэтому получить информацию о поведении отдельных классов фосфолипидов в мембранах методами  $^{31}\text{P}$ -ЯМР невозможно. Для решения данной проблемы нами были ранее успешно использованы тиофосфолипиды [8–10]. Тиофосфолипиды являются аналогами фосфолипидов природной структуры, у которых группа  $\text{P}=\text{O}$  заменена на  $\text{P}=\text{S}$ , а химический сдвиг отличается от химического сдвига природных фосфолипидов на 57 м.д. Представлялось целесообразным продолжить исследования по созданию новых модифицированных фосфолипидов, пригодных для изучения мембран методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. В настоящей работе представлены результаты по синтезу и использованию в мембранологии другого фосфолипидного аналога — тиофосфатидилхолина.

В основу схемы синтеза тиофосфатидилхолина (IV) был положен обычный для химии липидов метод, основанный на фосфорилировании ди-

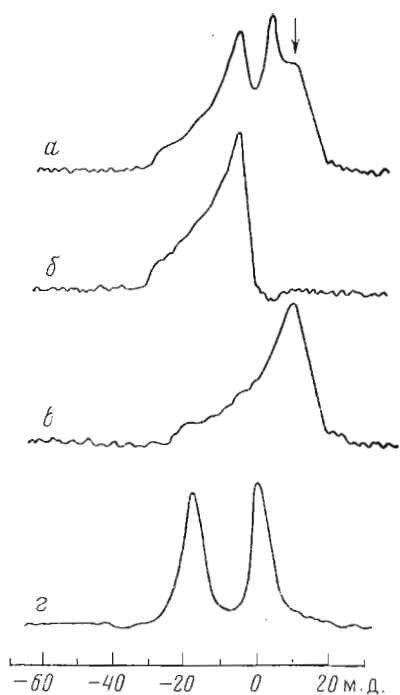
глицеридов. Введение меркаптогруппы в молекулу диглицерида осуществлялось взаимодействием соединения (I) с тиомочевинной в среде изопропилового спирта по методу [11]. Образующуюся алкилтиурониевую соль (II) щелочным омылением переводили в меркаптодиглицерид (III). Соединение III легко окисляется с образованием дисульфидов. Для устранения данного побочного процесса необходимо работать в атмосфере инертного газа и удалять кислород из растворителей. ТФХ (IV) был получен фосфорилированием глицерида (III) по Брокерхоффу [12].



Тиофосфолипиды являются близкими структурными аналогами природных фосфолипидов, поэтому можно ожидать, что они не будут оказывать заметных возмущающих воздействий на мембрану. Это предположение подтверждается тем фактом, что тиофосфолипиды диацильного типа уже с успехом использовались ранее при изучении кинетики гидролиза фосфолипидов фосфолипазой С [13].

Синтезированный тиофосфатидилхолин (IV) был использован при изучении упаковки липидных молекул в водных дисперсиях смеси дифосфатидилглицерина и тиофосфатидилхолина. Такой выбор объекта исследования был обусловлен главным образом тем, что данная модельная система детально изучена. Методами электронной микроскопии и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР показано [5], что в мембранах, содержащих дифосфатидилглицерин и фосфатидилхолин, ионы  $\text{Ca}^{2+}$  вызывают образование в липидном бислое внутримембранных частиц. Образование таких внутримембранных частиц сопровождается появлением в спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР узкого симметричного сигнала. Кроме того, при использовании тионного аналога фосфатидилхолина показано [9], что в состав внутримембранных частиц входят как молекулы дифосфатидилглицерина, так и фосфатидилхолина. Наличие обширного экспериментального материала по данной модельной системе позволяет сопоставить эти результаты с результатами, полученными при использовании соединения (IV).

Разница в химических сдвигах тиофосфолипидов и фосфолипидов природной структуры составляет 19 м.д. Этого недостаточно для того, чтобы получить полностью разрешенные сигналы в спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР липосомных мембран, где ширина сигналов достигает 50 м.д. Действительно, в спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР липосомной мембраны, содержащей тиофосфатидилхолин и дифосфатидилглицерин, наблюдаются два широких перекрывающихся сигнала (рисунок, а). Современные методы ЯМР позволяют выделить из данного спектра сигналы, отвечающие обоим компонентам. Для разделения спектра «а» на два отдельных сигнала нами использовался метод, ранее уже применявшийся в исследовании мембран [14] и основанный на использовании импульсной последовательности «DANTE» [15]. Сущность этого метода заключается в том, что с помощью определенной импульсной последовательности (см. «экспериментальную часть») селективно насыщают сигнал на заданной частоте (на рисунке данная частота



Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР водных дисперсий смеси тиофосфатидилхолин — дифосфатидилглицерина, 2:1 (моль/моль): *a* — исходный спектр; *б* — спектр, полученный в условиях насыщения сигнала дифосфатидилглицерина; *в* — дифференциальный спектр между спектрами «*a*» и «*б*»; *г* — спектр, полученный в присутствии эквивалентных по отношению к дифосфатидилглицерину количеств  $\text{CaCl}_2$ . Стрелкой отмечена частота селективного насыщения

отмечена стрелкой). Если молекулы, которым принадлежит этот сигнал, способны достаточно быстро обмениваться с другими состояниями, то наблюдается перенос насыщения. В случае липосом насыщение переносится за счет латеральной диффузии молекул фосфолипидов и распространяется на весь широкий анизотропный сигнал в спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. Таким образом, выбрав соответствующим способом частоту селективного насыщения, можно элиминировать из спектра «*a*» сигнал, обусловленный молекулами дифосфатидилглицерина, и получить сигнал, отвечающий только тиофосфатидилхолину (рисунок, *б*). Вычитание из спектра «*a*» спектра «*б*» дает спектр, в котором имеется лишь сигнал дифосфатидилглицерина (рисунок, *в*). Параметры спектров «*б*» и «*в*» указывают на бислойную организацию липидных молекул: анизотропия химических сдвигов составляет 35 и 45 м.д. соответственно; плечо каждого сигнала направлено в сторону слабого поля. Разница в анизотропии химического сдвига тиофосфатидилхолина и дифосфатидилглицерина может быть объяснена различными значениями составляющих тензора анизотропии химического сдвига. Определенные из спектра поликристаллического образца тиофосфатидилхолина составляющие тензора анизотропии химического сдвига оказались равными:  $\sigma_{11} = -138$  м.д.,  $\sigma_{22} = -32$  м.д.,  $\sigma_{33} = 108$  м.д. В случае же фосфолипидов природной структуры  $\sigma_{11} = -81$  м.д.,  $\sigma_{22} = -21$  м.д.,  $\sigma_{33} = 108$  м.д. [16].

Следует отметить также, что в спектре «*a*» имеется узкий симметричный пик, отвечающий незначительной доле молекул дифосфатидилглицерина, способных к быстрому (во временной шкале ЯМР) изотропному движению. Тот факт, что в дифференциальном спектре «*в*» данный изотропный пик не наблюдается, указывает на отсутствие переноса насыщения. По-видимому, продукты перекисного окисления, присутствующие в дифосфатидилглицерине, индуцируют образование небольших по размеру везикул. Скорость же трансмембранного обмена между везикулами и липосомами слишком мала, чтобы обеспечить перенос насыщения. Такой вывод находится в хорошем соответствии и с литературными данными [17].

При добавлении ионов  $\text{Ca}^{2+}$  к липосомным мембранам, построенным из тиофосфатидилхолина и дифосфатидилглицерина, в спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (рисунок, *г*) появляются узкие симметричные сигналы, указывающие на образование внутримембранных частиц. По данным  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, в состав внутримембранных частиц входят как те, так и другие. Аналогичный результат

был получен нами и ранее [9] при изучении данной модельной системы с использованием тионных аналогов фосфолипидов.

В заключение хотелось бы коротко сравнить тиофосфолипиды и фосфолипиды с тиофосфоэфирной связью в качестве зондов для исследования мембран методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. Большая разница в химических сдвигах фосфолипидов природной структуры и тиофосфолипидов (57 м.д.) по сравнению с тиофосфолипидами (19 м.д.) позволяет получить в случае тиофосфолипидов полностью разрешенные спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР любой мембраны. Применение методики переноса насыщения дает аналогичный результат и для мембран, содержащих тиофосфолипиды. Наличие же в составе молекул тиофосфолипидов фосфорильного кислорода делает данный зонд более близким по структуре к природным фосфолипидам. Использование серосодержащих аналогов фосфолипидов может оказать существенную помощь при изучении свойств не только модельных, но и биологических мембран.

### Экспериментальная часть

В работе использовались хроматографически чистые фосфолипиды. Дифосфатидилглицерин был выделен из сердец крупного рогатого скота по методу [18]. Структура и индивидуальность синтезированного тиофосфатидилхолина (IV) доказана методами ТСХ, ИК-,  $^1\text{H}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии, а также данными элементного анализа, которые соответствовали расчетным.

Липосомные мембраны получали механическим диспергированием 50–70 мг фосфолипидов в 2 мл  $\text{D}_2\text{O}$ . Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР снимали на импульсном фурье-спектрометре WM-250 (Bruker, ФРГ) с рабочей частотой 101,25 МГц при широкополосной развязке от протонов (5 Вт). Образцы термостатировались в датчике прибора при 45° С. Для селективного насыщения использовалась импульсная последовательность «DANTE»:  $(D1 - (P1 - D2)m - P2 - \text{выборка}) NS$ , где  $D1$  — релаксационная задержка (3 с);  $P1$  — насыщающий импульс (1 мкс);  $D2$  — задержка между насыщающими импульсами (150 мкс);  $m$  — количество насыщающих импульсов (2000);  $P2$  — 45-градусный импульс (10 мкс);  $NS$  — количество накопленй (1000).

Частота, при которой происходит насыщение сигнала, определяется несущей частотой импульса  $P1$  (равна ей и отстоит от нее на величину, кратную  $1/D2$ ).

*1,2-Ди-О-гексадецил-3-меркапто-гас-глицерин (III)*. 4,95 г 1,2-ди-О-гексадецил-3-бром-гас-глицерина (I) и 0,7 г тиомочевины в 300 мл изопронилового спирта кипятили 6 ч. Растворитель удаляли в вакууме. К остатку добавляли смесь петролейный эфир — эфир, 95 : 5, осадок отфильтровывали. Фильтрат упаривали в вакууме, остаток — непрореагировавший бромид (I) — повторно вводили во взаимодействие с тиомочевинной. К объединенному осадку, представляющему собой смесь соли II и тиомочевины, добавляли 20 мл 5 н. NaOH и нагревали 2 ч в токе аргона. Реакционную массу подкисляли 2 н. HCl до нейтральной реакции, отделяли слой меркаптана, водную фазу экстрагировали хлороформом. Органический экстракт сушили, растворитель удаляли в вакууме. Выход 4,51 г (91,0%),  $R_f$  0,58 (силуфол, петролейный эфир — эфир, 19 : 1).

*1,2-Ди-О-гексадецил-гас-глицерин-3-тиофосфохолин (IV)*. К раствору 0,055 мл хлорокиси фосфора в 5 мл безводного хлороформа при перемешивании в атмосфере аргона добавляли раствор 0,29 г диглицерида (III) и 0,086 мл триэтиламина в 10 мл безводного хлороформа. Перемешивали 1 ч при 40° С. Добавляли 0,3 мл пиридина и 1,1 г тозилата холина. Перемешивали 4 ч при 20° С. Реакционную массу обрабатывали 3%  $\text{NaHCO}_3$ , вещество экстрагировали смесью хлороформ — метанол. Органический экстракт промывали 3% HCl, сушили, растворитель удаляли в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем. Продукт перекристаллизовывали из смеси хлороформ — ацетон, 1 : 6. Выход 0,12 г (32,2%), т. пл. 190–193° С.  $R_f$  0,62 (силуфол; хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4). Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (8, м.д.): 18,5.

1. Barsukov L. I., Victorov A. V., Vasilenko I. A., Evstigneeva R. P., Bergelson L. D. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 598, № 1, p. 153-168.
2. Lee A. G., Birdsall N. J. M., Metcalfe J. C. *Biochemistry*, 1973, v. 12, № 8, p. 1650-1659.
3. Чупин В. В., Ушакова И. П., Бондаренко С. В., Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П., Кольцова Г. Н., Розенберг Г. Я. *Биоорг. химия*, 1982, т. 8, № 9, с. 1275-1280.
4. Lee A. G., Birdsall N. J. M., Metcalfe J. C. *Chem. Brit.*, 1973, v. 9, № 3, p. 116-123.
5. De Kruijff B., Cullis P. R. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 602, № 4, p. 477-490.
6. De Kruijff B., van den Besselaar A. M. H. P., van Deenen L. L. M. *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 465, № 3, p. 443-453.
7. Seelig J. *Quart. Rev. Biophys.*, 1977, v. 10, № 3, p. 353-418.
8. Чупин В. В., Василенко И. А., Предводителев Д. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. *Докл. АН СССР*, 1979, т. 248, № 1, с. 235-237.
9. Чупин В. В., Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 5, с. 768-772.
10. Vasilenko I. A., de Kruijff B., Verkleij A. J. *Biochim. et biophys. acta*, 1982, v. 685, № 2, p. 144-152.
11. *Speziale A. J. Org. synth.*, 1950, v. 30, № 1, p. 35-42.
12. Brokerhoff H., Auegar N. K. N. *Lipids*, 1979, v. 14, № 1, p. 88-89.
13. Cox J. W., Snyder W. R., Horrocks L. A. *Chem. phys. lipids*, 1979, v. 25, № 3, p. 369-380.
14. De Kruijff B., Morris G. A., Cullis P. R. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 598, № 2, p. 206-211.
15. Morris G. A., Freeman R. J. *Magn. Resonance*, 1978, v. 29, № 4, p. 433-462.
16. Seelig J. *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 515, № 1, p. 105-140.
17. Василенко И. А., Викторов А. В., Евстигнеева Р. П., Тараховский Ю. С., Образцов В. А., Боровягин В. Л. *Биоорг. химия*, 1982, т. 8, № 9, с. 1281-1288.
18. Rose H. D. *Biochim. et biophys. acta*, 1964, v. 84, № 1, p. 109-115.

Поступила в редакцию  
14.X.1983

#### SYNTHESIS AND APPLICATION OF THIOPHOSPHOLIPIDS IN $^{31}\text{P}$ NMR STUDIES OF MEMBRANES

CHUPIN V. V., MALINA E. V., REVENKO I. V., VASILENKO I. A.,  
SEREBRENNIKOVA G. A., EVSTIGNEEVA R. P.

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

Thiophosphatidylcholines, i. e. phosphatidylcholine analogues in which one of phosphate oxygens is replaced by a sulfur atom, have been synthesized. The properties of aqueous dispersions of thiophosphatidylcholine and its equimolar mixture with diphosphatidylglycerol (cardiolipin) have been studied by  $^{31}\text{P}$  NMR. The  $^{31}\text{P}$  resonance of thiophospholipids dissolved in deuteriochloroform was found to be shifted 19 ppm downfield from the signals of natural phospholipids. This feature allowed a complete separation of signals of thiophospholipids and natural phospholipids in the  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of model membranes by using «DANTE» pulse sequence. The possibility of employing thiophospholipids in  $^{31}\text{P}$  NMR studies of lipid polymorphism in model membranes was demonstrated.