



УДК 547.814 : 577.161

© 1993 г. В. В. Чудинова, Е. И. Захарова,
С. М. Алексеев, В. В. Чупин, Р. П. Евстигнеева

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ α -ТОКОФЕРОЛА
С ФОСФОЛИПИДАМИ, ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ
И ИХ ОКСИГЕНИРОВАННЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ
МЕТОДОМ ^{31}P -ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Методом ^{31}P -ЯМР-спектроскопии на моделях искусственных мембран, содержащих яичный фосфатидилхолин и лизофосфатидилхолин, исследовано взаимодействие α -токоферола с фосфолипидами, олеиновой, рицинолевой кислотами и гидропероксидом линолевой кислоты. Показано, что α -токоферол поддерживает бислойную организацию водных дисперсий лизофосфолипидов, а при включении в систему лецитин — вода способствует образованию гексагональной фазы. Свободные жирные кислоты проявляли синергизм α -токоферолу, причем в наибольшей степени эффект образования гексагональной фазы усиливали оксигенированные кислоты — рицинолевая и гидропероксид линолевой кислоты. На основании экспериментальных данных сделаны выводы о структурообразующем и модифицирующем действии α -токоферола. Обсуждена природа модулирующего эффекта α -токоферола на структуру мембраны и возможная роль образующейся под его действием гексагональной фазы в процессе перекисного окисления липидов.

α -Токоферол (витамин Е) — жирорастворимый антиоксидант, локализованный непосредственно в гидрофобной части биологических мембран [1]. Известно, что основной функцией витамина Е является защита полиненасыщенных ацильных остатков фосфолипидов от перекисного окисления [2]. Кроме того, α -токоферол обладает мембраноструктурирующим действием, модифицируя физические свойства липидного бислоя [3—5]. Считается, что он участвует в специфическом гидрофобном взаимодействии с ацильными цепями компонентов мембран, а также со свободными жирными кислотами, нивелируя их хаотропное действие и предотвращая отрицательное воздействие фосфолипазы A_2 [6—8]. В связи с этим особое значение приобретают исследования влияния α -токоферола на структурную организацию липидов в мембране.

Целью нашей работы явилось исследование взаимодействия α -токоферола с фосфолипидами, жирными кислотами и продуктами их первичного окисления на моделях искусственных мембран, содержащих яичный лецитин и лизолецитин. В качестве метода была выбрана ^{31}P -ЯМР-спектроскопия, позволяющая определить структуру агрегатов в дисперсии липидов [9].

Известно, что лизофосфолипиды — продукты ферментативного гидролиза компонентов мембраны — обладают дестабилизирующим действием на бислойные структуры и оказывают отрицательное влияние на функционирование биологических мембран [10].

В связи с этим нами были изучены модельные мембранные структуры, образующиеся из лизолецитина в присутствии 20 и 100% * воды, методом ^{31}P -ЯМР-спектроскопии с широкополосной развязкой от протонов.

* Здесь и далее, где не указано особо, приведены проценты по массе.

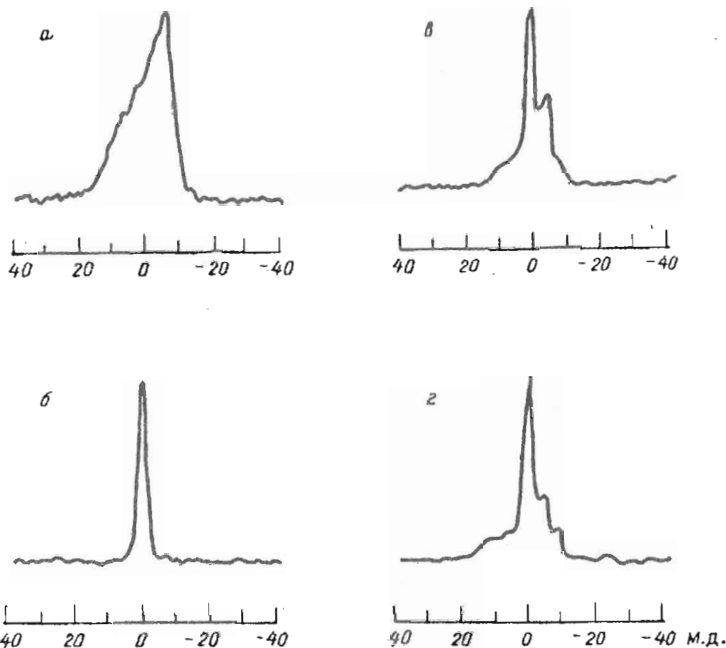


Рис. 1. ^{31}P -ЯМР-спектры лизофосфатидилхолина в 20 (а) и 100% водной суспензии (б), а также эквимольной смеси лизофосфатидилхолина и α -токоферола в 20 (в) и 100% водной суспензии (г)

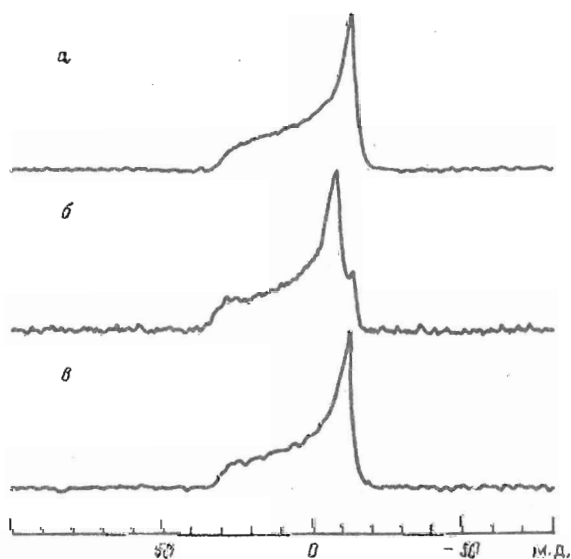
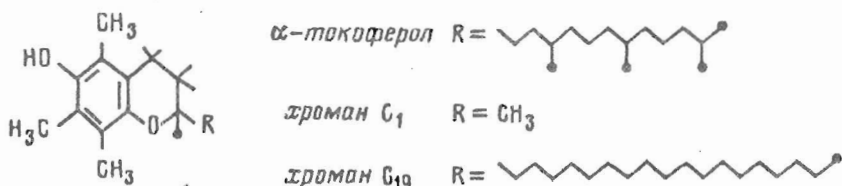


Рис. 2. ^{31}P -ЯМР-спектры яичного фосфатидилхолина (а), смеси фосфатидилхолина с α -токоферолом (10 мол. %) в 100% водной суспензии (б) и при избытке воды (в)

Из представленных на рис. 1 спектров видно, что исходный сигнал лизолецитина (рис. 1а) в 20% водной суспензии имеет отчетливо выраженную анизотропию, аналогичную спектру лецитина (рис. 2а), что характерно для сформировавшегося бислоя. Однако при добавлении воды до 100% сформированная лизолецитином бислойная структура полностью разрушалась, превращаясь в мицеллярную с характерным изотропным сигналом (рис. 1б).

При исследовании образцов лизолецитина, содержащих эквимольное количество α -токоферола, в спектре наблюдалось по крайней мере два отчетливо выраженных анизотропных сигнала, соответствующих различным бислойным структурам, которые сохранялись и при добавлении воды (рис. 1в, з).

В аналогичных опытах с хроманами C₁₉ и C₁ было показано, что бислойные структуры практически не образуются. В случае хромана C₁₉ наблюдалась лишь небольшая асимметрия сигнала без характерного изменения формы, а в присутствии хромана C₁ происходило только уширение сигнала.



Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что α -токоферол в отличие от своих структурных аналогов с модифицированной боковой цепью — хромана C₁ (отсутствует боковая цепь) и хромана C₁₉ (неразветвленная боковая цепь), встраиваясь между молекулами лизофосфатидилхолина, способствует их упаковке в бислою, т. е. обладает ярко выраженной мембраноструктурирующей активностью. Это можно объяснить комплементарностью молекул α -токоферола и лизолецитина. Способность липидов образовывать различные фазы зависит от их динамической структуры. Известно, что для лизолецитина объем, занимаемый полярной областью, больше, чем гидрофобной, что обуславливает его форму усеченного конуса, в основании которого расположена гидрофильная часть молекулы [11]. Структурообразующие свойства α -токоферола, в частности способность стабилизировать бислою структуру лизофосфолипидов, можно, по-видимому, объяснить тем, что для молекулы α -токоферола характерны обратное соотношение объемов полярной и гидрофобной частей и форма усеченного конуса, вершиной которого служит гидроксильная группа хроманового ядра.

Такая форма молекулы α -токоферола должна при введении его в фосфатидилхолиновые слои способствовать образованию гексагональной фазы, что было подтверждено в ряде работ [12, 13]. Такая небислойная организация фосфолипидов играет важную роль в функционировании мембраны, в частности в процессах транспорта полярных соединений (флип-флоп) может служить переходным состоянием при слиянии везикул [12]. Кроме того, наличие гексагональной фазы коррелирует с активностью некоторых ферментов, например протеинкиназы C [14].

В связи с этим нами было изучено взаимодействие яичного лецитина с α -токоферолом в 100% водной суспензии и липосомальной системе при избытке воды. Анализ ³¹P-ЯМР-спектров изученных образцов при избытке воды (рис. 3) показал, что включение возрастающих количеств α -токоферола (от 10 до 50 мол. %) в бислою лецитина приводит к изменению его организации и появлению новых липидных структур.

Введение в 100% водную суспензию лецитина 10 мол. % α -токоферола уже вызывало изменение вида спектра, которое можно интерпретировать как наличие в липидной системе двух различных бислойных фаз (рис. 2б). Новая бислойная фаза характеризовалась наличием асимметричного сигнала с плечом, направленным в сторону слабого поля, но значительно меньшей анизотропией химического сдвига по сравнению с обычными фосфатидилхолиновыми бислоями. Образование новой бислойной фазы еще более ярко было выражено в присутствии 20 мол. % α -токоферола. Однако при добавлении избытка воды спектры проанализированных смесей приобретали вид, идентичный спектру системы лецитин — вода (см. рис. 2в). Можно предположить, что образование модифицированной бислойной структуры связано с количеством структурированной воды, влияющей на динамику мембранной системы.

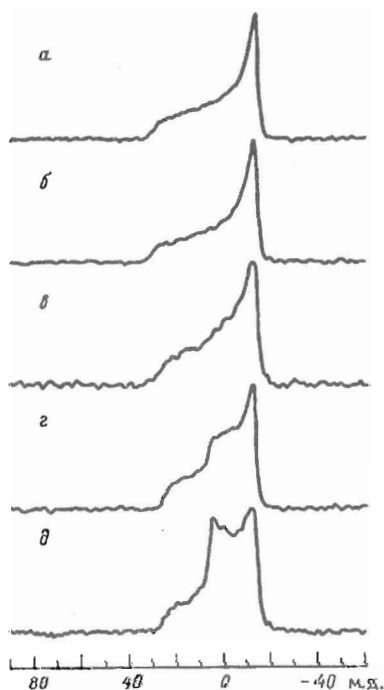


Рис. 3

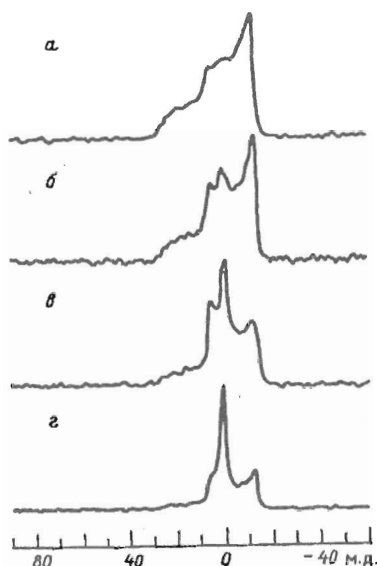


Рис. 4

Рис. 3. ^{31}P -ЯМР-спектры смеси яичного фосфатидилхолина с α -токоферолом при избытке воды. Количество α -токоферола (мол. %): 0 (а), 10 (б), 20 (в), 40 (г), 50 (д)

Рис. 4. ^{31}P -ЯМР-спектры смеси яичного фосфатидилхолина с α -токоферолом и жирными кислотами при избытке воды: а — фосфатидилхолин — α -токоферол — олеиновая кислота; б — фосфатидилхолин — α -токоферол — рицинолевая кислота; в — фосфатидилхолин — α -токоферол — гидропероксид линолевой кислоты. Содержание α -токоферола — 40 мол. %, жирных кислот — 10 мол. %

При увеличении количества α -токоферола до 40 мол. % в ^{31}P -ЯМР-спектре лецитина появлялся сигнал с пиком 7 м. д., с обращенной асимметрией и меньшей шириной, характерный для образования гексагональной фазы (рис. 3г), а также изотропный сигнал, который, по-видимому, соответствует инвертированной мицеллярной и фрагментам укороченных гексагональных структур [11]. Интенсивность этих сигналов возрастала с увеличением количества α -токоферола, и при содержании последнего в исследуемой смеси 50 мол. % соотношение основной бислойной и небислойной фаз составляло приблизительно 1:1 (рис. 3д), что хорошо согласуется с литературными данными [12]. Таким образом, полученные нами экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что α -токоферол в высоких концентрациях модифицирует мембранную структуру, способствуя переходу ламеллярной фазы через переходную бислойную в гексагональную.

Эти данные могут иметь важное значение для понимания механизма функционирования биологических мембран, поскольку молекулы α -токоферола, тяготея к наименее вязким доменам липидных структур, способны образовывать кластеры [15, 16] с высокой локальной концентрацией.

С другой стороны, витамин Е — наиболее эффективный природный антиоксидант, ингибирующий развитие цепной реакции перекисного окисления липидов, продукты которого обладают дестабилизирующим действием на мембранные структуры [17]. Ранее нами было показано, что α -токоферол способен образовывать комплексы с высокоэнергетическими продуктами такого окисления [18] в гомо-

генных растворах, причем образование таких возбужденных ассоциатов может быть ключевым моментом его антиоксидантного действия. Известно также, что α -токоферол предотвращает хаотропное воздействие свободных жирных кислот на мембрану [6—9]. Поэтому мы исследовали взаимодействие α -токоферола со свободными жирными кислотами и их оксигенированными производными в составе липидных суспензий — 100% и при избытке воды — методом ^{31}P -ЯМР-спектроскопии. В качестве моделей нами были выбраны олеиновая кислота, ее гидроксилоксилирующее производное — рицинолевая кислота — и гидропероксид линолевой кислоты — представитель первичных продуктов перекисного окисления липидов.

При введении 10 мол. % жирной кислоты в систему, состоящую из лецитина и 40 мол. % α -токоферола, наблюдалось заметное изменение ^{31}P -ЯМР-спектра лецитина (рис. 4), свидетельствующие о значительном усилении эффекта дестабилизации липидного бислоя α -токоферолом. Включение олеиновой кислоты приводило к усилению сигнала гексагональной фазы (рис. 4б). При замене олеиновой кислоты на кислородсодержащие жирные кислоты описанный эффект усиливался (рис. 4в, г). Количество образующейся гексагональной и изотропной фаз превышало количество оставшейся бислоевой структуры липидов. Таким образом, жирные кислоты и продукты их окисления усиливают модифицирующее воздействие α -токоферола на мембрану, причем оксигенированные соединения проявляют значительно больший синергизм витамину Е. Мы полагаем, что модификация липидной структуры может объясняться тем, что при нарастании концентрации α -токоферола происходит его ассоциация и, вследствие его структурообразующих свойств, образование гексагональной фазы. Этот эффект значительно усиливается жирными кислотами, особенно оксигенированными, которые, по-видимому, способствуют ассоциации α -токоферола и возникновению в плоскости бислоя его высоких локальных концентраций.

На основании данных, полученных нами ранее [18] и в настоящей работе, можно предложить общий механизм функционирования витамина Е в биологических мембранах. Как известно, молекулы α -токоферола располагаются в наименее вязких, т. е. с большим количеством ненасыщенных липидов, участках мембраны, которые максимально подвержены перекисному окислению. При возникновении активного радикального центра α -токоферол за счет перераспределения энергии образует с ним комплекс, в котором создаются предпосылки для образования относительно устойчивых продуктов окисления [18]. В то же время известно, что восстановление структуры мембраны после воздействия на нее окислителей осуществляется за счет комплекса ферментативных реакций деацилирования-реацилирования [19]. Удаление окисленного остатка жирной кислоты происходит под действием фосфолипазы A_2 , которая активируется ионами Ca^{2+} [20]. Гексагональная фаза, образующаяся вокруг окисленных липидов при повышении локальной концентрации α -токоферола, создает ионные каналы, способствующие проникновению в мембрану активаторов фосфолипазы A_2 — ионов Ca^{2+} . Лизофосфолипиды, продукты ферментативного гидролиза фосфолипидов, так же как α -токоферол, дестабилизируют структуру липидного бислоя. Однако механизмы дестабилизирующего действия на мембрану α -токоферола и лизофосфолипидов противоположны и в результате такой взаимной компенсации отрицательных эффектов дестабилизация может стать незначительной. За счет своих мембранотропных эффектов α -токоферол, по-видимому, способен поддерживать упорядоченную структуру лизофосфолипидов в течение достаточно длительного времени, за которое происходит реацилирование.

Таким образом, можно предположить, что α -токоферол является универсальным стабилизатором биологических мембран, сочетающим антиоксидантную и структурирующую функции.

Экспериментальная часть

³¹P-ЯМР-спектры были записаны на приборе Bruker MSL-200 с широкополосной развязкой от протонов на рабочей частоте 81 МГц при температуре 303К. ТСХ осуществляли на пластинках Silufol (ЧСФР) в системе хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4.

Препаративную ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Клауег (ФРГ), снабженном рефрактометрическим детектором и нормально-фазной колонкой Силасорб 300 (10×250 мм, 5 мкм).

В работе использовали олеиновую кислоту (Sigma) и рицинолевую кислоту (Sigma) с содержанием основного вещества 97—98% (по данным ГЖХ), а также яичный фосфатидилхолин (Харьковское производственное объединение по выпуску бакпрепаратов), очищенный колоночной хроматографией на силикагеле L 40/100 мкм (ЧСФР), в системе хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4.

Суммарные гидропероксиды линолевой кислоты выделяли из продуктов автоокисления линолевой кислоты методом нормально-фазовой ВЭЖХ, элюируя системой гексан — этилацетат — уксусная кислота, 75 : 25 : 0,3, со скоростью 5 мл/мин.

α -Токоферол, хроман С₁ (2, 2, 5, 7, 8-пентаметилбензопиран-6-ол) и хроман С₁₉ (2, 5, 7, 8-тетраметил-2-нонадецилбензопиран-6-ол) были синтезированы по методу [21].

Лизофосфатидилхолин получали из яичного фосфатидилхолина как описано [22].

Для приготовления образцов водной дисперсии лизолецитина для ³¹P-ЯМР-спектроскопии помещали раствор 50 мг лизофосфатидилхолина или эквимольных смесей лизолецитина с α -токоферолом, хроманом С₁ и С₁₉ в 1 мл сухого хлороформа в кювету для ЯМР-спектроскопии. Растворитель упаривали током инертного газа и сушили в эксикаторе в вакууме (0,1 мм рт. ст.) 1 сут. К высушенным образцам добавляли 10 или 50 мг дистиллированной воды и оставляли в атмосфере инертного газа при 18—20° С на 3 сут для установления термодинамического равновесия.

Образцы водной дисперсии лецитина готовили аналогичным образом, исходя из 60 мг фосфатидилхолина или его смесей с α -токоферолом (в количестве 10, 20, 40 и 50 мол. %), а также с α -токоферолом (40 мол. %) и олеиновой, рицинолевой кислотами или гидропероксидом линолевой кислоты (10 мол. %). Количество добавленной воды составляло 60 или 1000 мг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barton G. W., Ingold K. U.//Accounts Chem. Res. 1986. V. 19. № 2. P. 194—201.
2. Niki E.//Chem. and Phys. Lipids. 1987. V. 44. № 3. P. 227—253.
3. Fukuzawa K., Chida H., Suzuki A.//J. Nutr. Sci. and Vitaminol. 1980. V. 26. № 5. P. 427—434.
4. Bisby R. H., Birch D. J. S.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1989. V. 158. № 2. P. 386—391.
5. Wassall S. R., Thewalt J. L., Wong L., Heiner G., Cushley R. J.//Biochemistry. 1986. V. 25. № 4. P. 319—326.
6. Табидзе Л. В., Ритов В. Б., Каган В. Е.//Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1983. Т. 96. № 12. С. 1548—1553.
7. Ерин А. Н., Горбунов В. И., Брюсованик В. И.//Биохимия. 1985. Т. 50. № 6. С. 998—1004.
8. Ерин А. Н., Тюрин В. А., Горбунов В. И.//Докл. АН СССР. 1985. Т. 281. № 2. С. 447—450.
9. Davis J. H.//Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 737. № 2. P. 117—171.
10. Kagan V. E.//Ann. N. Y. Acad. Sci. 1989. V. 570. P. 1—6.
11. Cullis P. R., de Kruijff B.//Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 559. № 2. P. 399—420.
12. Micol V., Aranda F. J., Villalain J., Gomez-Fernandez J. C.//Biochim. et biophys. acta. 1990. V. 1022. № 1. P. 194—202.
13. Nakajima K., Utsuni H., Kazama M., Hamada A.//Chem. Pharm. Bull. 1990. V. 38. № 1. P. 1—4.
14. De Boeck H., Zidovotzki R.//Biochemistry. 1989. V. 28. № 11. P. 7439—7446.
15. Gomez-Fernandez J. C., Villalain J., Aranda F. J., Ortiz A., Micol V., Coutinho A.//Ann. N. Y. Acad. Sci. 1989. V. 570. P. 109—120.
16. Kagan V. E., Serbinova E. A., Bakalova R. A., Stoytchev T. S., Erin A. N., Prilipko L. L., Evstigneeva R. P.//Biochem. Pharmacol. 1990. V. 40. № 11. P. 2403—2413.
17. Vladimirov Y. A.//Free Radic. Biol. and Medic. 1990. Suppl. № 1. P. 167.

18. Чудинова В. В., Захарова Е. И., Алексеев С. М., Евстигнеева Р. П. // Докл. АН СССР. 1992. Т. 322. № 4. С. 773—775.
19. Sevanian A. // Free Radic. Biol. and Medic. 1990. Suppl. № 1. P. 117.
20. Parinandi N. K., Weis B. K., Natarajan V., Schmid H. H. O. // Arch. Biochem. and Biophys. 1990. V. 280. № 1. P. 45—52.
21. Захарова Е. И., Шуаинов К. А.-В., Чудинова В. В., Алексеев С. М., Евстигнеева Р. П. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1268—1273.
22. Devaux P., McConnell H. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1973. V. 222. P. 489—498.

Поступила в редакцию
21.VII.1992

V. V. Chudinova, E. I. Zakharova, S. M. Alekseev,
V. V. Chupin, R. P. Evstigneeva

³¹P NMR STUDY OF THE INTERACTION OF α -TOCOPHEROL WITH PHOSPHOLIPIDS, FATTY ACIDS AND THEIR OXYGENATED DERIVATIVES

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

Interaction of α -tocopherol with phospholipids, oleic, ricinoleic acids and linoleic acid hydroperoxides was investigated by means of ³¹P NMR spectroscopy on a model artificial membranes containing egg phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine. α -Tocopherol was shown to support the bilayer organization of lipophospholipids, whereas its introduction into the lecithine-water system stimulated the hexagonal phase formation. Free fatty acids exhibited a synergism to α -tocopherol, the effect of the hexagonal phase formation being at most increased by oxygenated acids — ricinoleic acid and linoleic acid hydroperoxides. In accordance with the experimental data, a conclusion about modifying and structuring action of α -tocopherol was made. Origin of the α -tocopherol's modulating effect on the membrane structure and a possible role of hexagonal phase forming upon its action in the course of peroxidation of lipids was discussed.