



УДК 547.953

ЛИПИДНЫЕ ЗОНДЫ БИРАДИКАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ ДЛЯ
ИССЛЕДОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ СИСТЕМ*Суханов В. А., Жданов Р. И.**Институт по биологическим испытаниям химических соединений,
Купавна, Московская область**Швец В. И.**Институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова, Москва*

Осуществлен синтез бирадикальных производных фосфатидилэтанолamina, содержащих нитроксильные фрагменты при 6-м и 10-м атомах углерода ацильных цепей (пальмитиновой и стеариновой кислот соответственно), ацилированием гас-глицеро-3-фосфо(N-фталонил)этанолamina ангидридами в присутствии калиевых солей или имидазолидами указанных спин-меченых жирных кислот. Защитную фталонильную группу удаляли мягким гидразинолизом с последующим доокислением образовавшихся гидроксиламинных производных до псходных нитроксильных радикалов двуокисью свинца в присутствии кислорода. Показано, что форма спектров ЭПР бирадикалов, примененных в качестве зондов для исследования различных биологических мембран при физиологических и низких температурах, чувствительна к различиям в молекулярной организации мембран.

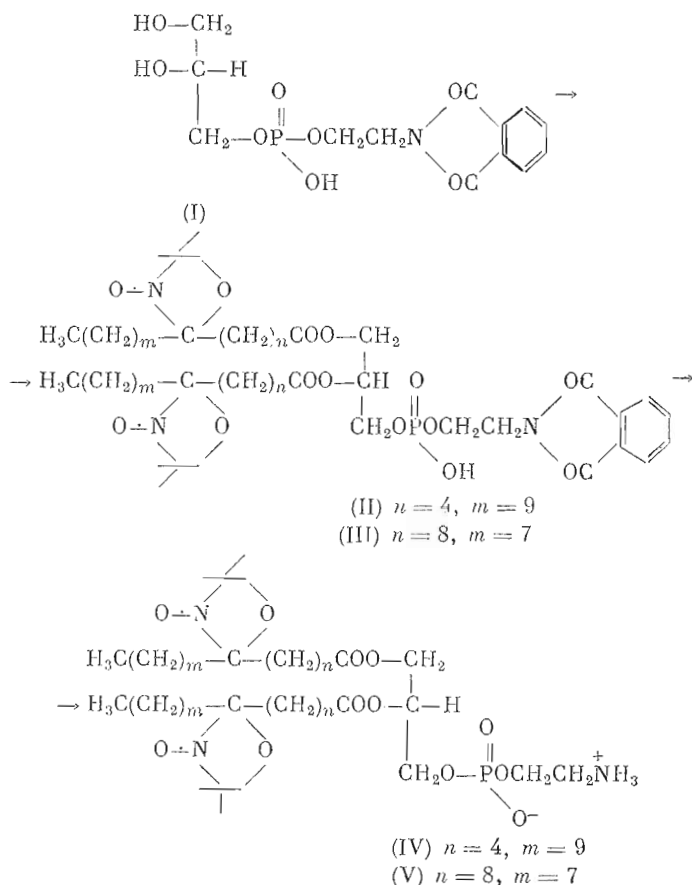
Спин-меченые фосфолипиды широко применяются для изучения свойств модельных и биологических мембран [1]. Однако производные фосфолипидов, содержащие спиновые метки в обеих жирнокислотных цепях, до сих пор изучались недостаточно. Сообщалось лишь о синтезе и ограниченном использовании подобных бирадикальных производных фосфатидилхолина [2], фосфатидовой кислоты [3] и фосфатидилинозита [4].

В то же время возрастает интерес к применению бирадикалов для изучения различных биологических систем, в том числе модельных и биологических мембран. Так, бирадикал на основе холестерина использовали при изучении модельных мембран [5], а бирадикалы с гибкой цепью между пиперидиновыми циклами оказались чувствительны к конформационным изменениям в мембранном препарате Na^+ , K^+ -АТФ-азы [6]. Наглядным подтверждением этого интереса явилась работа по обнаружению кластеризации гидрофобных бирадикальных моделей липидов в липосомах [7].

Следует отметить, что существующие теории анализа спектров бирадикалов [1] в принципе позволяют применять бирадикальные фосфолипидные зонды, например, для сравнительной оценки средних расстояний между нитроксильными группами в биологических системах. Липидные бирадикальные зонды могут оказаться полезными при изучении плотности упаковки разрыхленных мембранных структур с ослабленными гидрофобными взаимодействиями между липидами, например в лизофосфати-

дилхолиновых мицеллах или в мицеллах с участием детергентов. В связи со сказанным мы синтезировали спин-меченые производные фосфатидилэтанолamina, содержащие нитроксильные радикалы при 6-м и 10-м углеродных атомах пальмитиновой и стеариновой кислот соответственно, и изучили их спектры ЭПР в некоторых биологических системах.

Защищенные фосфатидилэтанолamины бирадикального типа (II, III) синтезировали ацилированием глицерофосфата (I) ангидридами в присутствии калиевых солей или имидазолидами гексадекан-6-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилноксазолидин)овой и октадекан-10-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилноксазолидин)овой кислот. Исчерпывающее ацилирование глицерофосфата (I) ангидридом стеариновой кислоты со спиновой меткой при C₁₀ в присутствии ее калиевой соли давало худшие результаты, чем подобная реакция при синтезе спин-меченых фосфоинозитидов [4]: выход целевого защищенного фосфатидилэтанолamina (III) не превышал 25%. Ацилирование проводилось в расплаве при 60–70°С при оптимальном соотношении реагентов глицерофосфат — соль кислоты — ангидрид кислоты (1 : 2 : 4). При применении меньших количеств ангидрида кислоты наблюдалось образование не полностью ацилированных производных (лизофосфатидилэтанолaminов).



Более удобным оказалось использовать в качестве ацилирующих агентов имидазолиды спин-меченых жирных кислот. В случае имидазолида пальмитиновой кислоты со спиновой меткой при C₆ исчерпывающее ацилирование глицерофосфата (I) проводилось в расплаве при 45–50°С на 20–30 мм рт. ст. при соотношении реагентов имидазолид спин-меченой кислоты — глицерофосфат 2 : 1, выход целевого соединения (II) приближался к 40%.

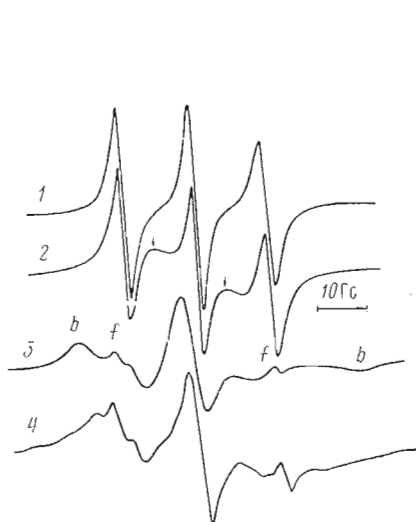


Рис. 1

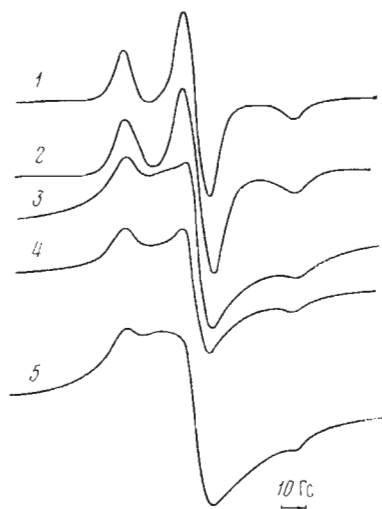


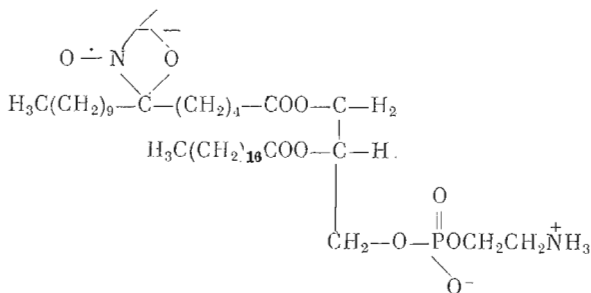
Рис. 2

Рис. 1. Спектры ЭПР при 25° С: 1 – бирадикала (V) в метаноле; 2 – бирадикала (IV) в метаноле; 3 – монорадикала (VI) в мембранах микросом печени; 4 – бирадикала (IV) в мембранах микросом печени. Условия регистрации: амплитуда модуляции (H_M) 1,25 Гс; мощность, поступающая в резонатор (P), 5 МВт

Рис. 2. Спектры ЭПР при -150° С: 1 – монорадикала (VI) в метаноле; 2 – монорадикала (VI) в мембранах микросом печени; 3 – бирадикала (IV) в метаноле; 4 – бирадикала (IV) в мембранах микросом печени; 5 – бирадикала (IV) в денатурированных мембранах микросом печени. Условия регистрации: $H_M=2,5$ (1, 2); 1,0 (3–5) Гс; P 2 МВт

Бирадикалы (II, III) для удаления защитной фталоильной группы подвергали мягкому гидразинолизу в метаноле. После доокисления образующихся при этом гидроксиламинных производных двуокисью свинца в присутствии кислорода получали фосфатидилэтаноламины (IV, V), содержащие нитроксильные радикалы в составе их жирнокислотных остатков. Соединения (II–V) выделяли в индивидуальном состоянии хроматографически; установление их структуры, радикальной чистоты осуществляли с помощью ИК- и ЭПР-спектроскопии – методов, широко использованных в наших предыдущих работах по синтезу спин-меченых фосфолипидов [4, 8, 9], причем полученная при этом информация о чистоте, структуре и свойствах соединений (II–V) была практически идентична изложенным в указанных статьях.

Спектр ЭПР бирадикала (V) в метаноле при 25° С (рис. 1, 1) представляет собой триплет, мало отличающийся от соответствующих спектров нитроксильных монорадикалов в разбавленных растворах [1, 10]. В спектре бирадикала (IV, рис. 1, 2) имеются две дополнительные линии, свидетельствующие о достаточно сильном обменном взаимодействии несвязанных электронов нитроксильных фрагментов [1, 10].



(VI)

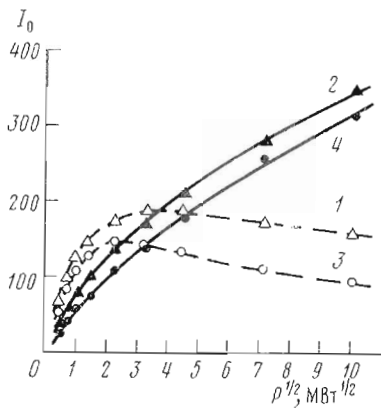


Рис. 3. Кривые насыщения центрального компонента I_0 (условные единицы) сигналов ЭПР монорадикала (VI) в метаноле (1) и мембранах микросом печени (3) и бирадикала (IV) в метаноле (2) и мембранах микросом печени (4) при -150°C . Условия регистрации те же, что и в рис. 2

ретикулума мышц кролика характеризуется $S=0,66$, а после введения в мембраны ДМСО (10% объемных) значение возрастает до 0,68. Следовательно, спектры бирадикала (IV) чувствительны к особенностям структуры (и молекулярных движений) в липидных слоях.

На рис. 2 показаны спектры ЭПР монорадикала (VI) и соответствующего ему бирадикала (IV) при -150°C в метаноле, а также спектры этих же моно- и бирадикалов в мембранах микросом печени и в таких же мембранах, денатурированных 20-минутным прогреванием при 65°C . Спектры ЭПР монорадикала (VI) в метаноле и мембранах микросом печени практически не различаются (рис. 2, 1, 2). Спектры ЭПР бирадикала (IV) в метаноле, мембранах микросом печени и денатурированных мембранах микросом печени отличаются от спектров монорадикала (VI) и друг от друга, в частности, глубиной «полочки» между низкочастотным и центральным максимумами спектра, соотношением этих максимумов по интенсивности и различным расстоянием между ними (рис. 2, 3–5). Таким образом, спиновый зонд бирадикальной природы (IV) в данном случае более чувствителен к изменению микроокружения, чем монорадикал (IV). Сравнивая спектры моно-(VI) и бирадикала (IV, рис. 2), можно заметить, что бирадикал (IV) образует систему с более сильным обменным взаимодействием (глубина «полочки» между низкочастотным и центральным максимумами спектра меньше, чем для монорадикала (VI)).

О более сильном обменном взаимодействии неспаренных электронов нитроксильных фрагментов в случае бирадикала (IV) свидетельствуют также кривые насыщения сигналов ЭПР моно- (VI) и бирадикалов (IV, рис. 3). Интенсивности сигналов (центральных компонентов спектров) монорадикала (VI) при -150°C в метаноле и мембранах микросом печени достигают максимальных значений при мощности СВЧ-излучения $P \approx 4-10$ МВт (рис. 3, 1, 3). В то же время интенсивность сигнала бирадикального зонда (IV) в метаноле и мембранах микросом печени растет с увеличением СВЧ-мощности во всем изученном интервале (рис. 3, 2, 4). Такое поведение кривой насыщения характерно для агрегатов нитроксильных радикалов с сильным обменным взаимодействием (кристаллы, кластеры и т. п.) [10]. Различия в частоте спигового обме-

Спектр ЭПР монорадикала (VI) в мембранах микросом печени (рис. 1, 3) представляет собой суперпозицию двух сигналов: радикалов, связанных с мембранами (внешние экстремумы обозначены индексом b), и радикалов, находящихся в буферном растворе (экстремумы обозначены f). Упорядоченность и подвижность углеводородных цепей липидов в мембранах, содержащих спиновые зонды, можно рассчитывать и сравнивать с помощью фактора упорядоченности (S) [4]. В данном случае S составляет 0,67. Спектр бирадикального зонда (IV) в тех же мембранах характеризуется меньшим значением $S=0,55$ (рис. 1, 4). Возможно, что бирадикальный фосфоглицерид (IV) в большей степени, чем соответствующий монорадикал (VI), возмущает локальную структуру липидного слоя мембраны, в связи с чем нитроксильные фрагменты бирадикала (IV) более подвижны. Для сравнения укажем, что тот же бирадикал (IV) в мембранах саркоплазматического

на между неспаренными электронами парамагнитных фрагментов в фосфолипидных моно- и бирадикального типа могут быть использованы при изучении мембранных структур.

Экспериментальная часть

ИК-спектры снимали на спектрометре Perkin-Elmer 257 (США), спектры ЭПР — на радиоспектрометре Varian E-104 (США) с приставкой для термостатирования ($\pm 1^\circ \text{C}$).

Качественную и препаративную тонкослойную хроматографию (ТСХ) осуществляли на силикагеле Л (ЧССР) в системе хлороформ — метанол — ацетон (4 : 1 : 1). На этом же адсорбенте велась колоночная хроматография. Пятна веществ на пластинках обнаруживали их опрыскиванием конц. H_2SO_4 с последующим прокаливанием пластинок при $300\text{--}400^\circ \text{C}$ или реактивом на фосфорсодержащие соединения [8, 9]. При проведении препаративной ТСХ полосы с веществами, содержащими нитроксильные радикалы, обнаруживали по характерному желтому окрашиванию.

В работе использовали карбонилдимидазол фирмы Fluka (Швейцария). Монорадикальное производное фосфатидилэтанолamina (VI) получали по методике [9]. Все синтезированные вещества имели удовлетворительные элементные анализы.

Выделение мембран микросом печени и определение концентрации белка проводили как в работе [11]. Мембраны саркоплазматического ретикулума мышц кролика выделяли по методике [12]. Спиновые зонды вводили в мембраны следующим образом: 1 мМ раствор радикала в смеси метанол — хлороформ упаривали в токе азота, затем добавляли суспензию мембран и встряхивали 30 мин при $18\text{--}20^\circ \text{C}$. Спин-меченые мембраны центрифугировали и измеряли сигнал ЭПР осадка в плоской кварцевой ячейке. Конечная концентрация зонда в суспензии мембран, определенная методом двойного интегрирования [1], была $10^{-4}\text{--}5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

В качестве структурно-чувствительного параметра липидного бислоя измеряли параметр упорядоченности S , значение которого при увеличении вращательной подвижности углеводородных цепей мембранных липидов уменьшается от $S=1$ (вращение зонда только вокруг его длинной оси) до $S=0$ (изотропное вращение зонда в хаотическом жидкофазном окружении). Значение S рассчитывали по формуле [1]

$$S = \frac{T'_{\parallel} - T'_{\perp}}{T_{zz} - 1/2(T_{xx} + T_{yy})} \cdot \frac{a}{a'}$$

где T'_{\parallel} и T'_{\perp} — половина расстояния соответственно между внешними и внутренними экстремумами первой производной спектра ЭПР (рис. 1, 3); T_{zz} , T_{yy} , T_{xx} — главные значения тензора сверхтонкой структуры (СТС) радикала в его монокристалле. В этой работе мы использовали главные значения тензора СТС спин-меченых жирных кислот: $T_{zz}=33,6 \text{ Гс}$; $T_{yy}=5,8 \text{ Гс}$; $T_{xx}=6,3 \text{ Гс}$ [1]. Отношение параметров $a=1/3(T_{zz}+T_{yy}+T_{xx})$ и $a'=1/3(T'_{\parallel}+2T'_{\perp})$ введено в формулу в качестве поправки на различие полярности окружения радикала в мембране и монокристалле.

1,2-Ди[гексадекан-6-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилноксазолидин)оил]-гас-глицеро-3-фосфо-(N-фталойл)этанолamina (II). В атмосфере аргона к 0,415 г гексадекан-6-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилноксазолидин)овой кислоты [13] добавляли 0,190 г карбонилдимидазола в 3 мл бензола. Раствор перемешивали 10 мин при $18\text{--}20^\circ \text{C}$ до полного выделения CO_2 . Затем к раствору добавляли 0,196 г гас-глицеро-3-фосфо-(N-фталойл)этанолamina (I) [14] и смесь упаривали досуха. Реакционную массу перемешивали 3 ч при $40\text{--}50^\circ \text{C}$, затем добавляли 2 мл воды и упаривали. Продукты реакции разделяли с помощью колоночной хроматографии. Бирадикал (II) элюировали смесью хлороформа и метанола, 195:5, и очищали

препаративной ТСХ. Получали 0,211 г (35,2%) желтого воскообразного вещества (II). R_f 0,42. ИК-спектр (см^{-1}): 1780 (C=O фталоильной группы), 1750—1720 (COOR), 1230—1180 (P=O), 1070, 1050 (P—O—C, C—O—C).

1,2-Ди[октадекан-10-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилноксазолидин)оил]-гас-глицеро-3-фосфо-(N-фталоил)этанолламин (III). К 0,200 г калиевой соли октадекан-6-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилноксазолидин)овой кислоты [13] добавляли 0,09 г глицерофосфата (I) в 2 мл метанола. Раствор упаривали досуха, приливали 2 мл бензола и снова упаривали. Смесь затем высушивали в течение 6 ч при 0,1 мм рт.ст., прибавляли 0,54 г ангидрида той же спиро-меченой кислоты [13], перемешивали 16 ч при 60° С. Продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, вымывая соединение (III) хлороформом с градиентом метанола от 2 до 15%. После удаления растворителей и высушивания вещества (2 ч, 0,1 мм рт.ст.) получали 0,07 г (24,3%) производного (III) в виде маслообразного соединения, R_f 0,45. ИК-спектр (см^{-1}): 1780 (C=O фталоильной группы), 1720 (COOR), 1240, 1180 (P=O), 1070 (P—O—C, C—O—C).

1,2-Ди[гексадекан-6-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилноксазолидин)оил]-гас-глицеро-3-фосфоэтанолламин (IV). К раствору 0,195 г соединения (II) в 5 мл метанола прибавляли 0,01 мл гидразин-гидрата. Температуру реакционной массы поднимали в течение 1 ч до 60° С и поддерживали ее 30 мин. Затем смесь охлаждали, нейтрализовали 50% водной уксусной кислотой, упаривали досуха и экстрагировали хлороформом (3×5 мл). К хлороформному экстракту добавляли 2 мл метанола, 0,5 г двуокиси свинца и смесь перемешивали 12 ч. Осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток разделяли препаративной ТСХ. Получили 0,068 г (40%) бледно-желтого маслообразного бирадикала (IV). R_f 0,15. ИК-спектр (см^{-1}): 3300—3200 (+NH₃), 1740 (COOR), 1220 (P=O), 1070 (P—O—C, C—O—C).

1,2-Ди[октадекан - 10-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилноксазолидин)-оил]-гас-глицеро-3-фосфоэтанолламин (V). Фосфатидилэтанолламин (V) получали гидразинолизом 0,06 г фталоильного производного (III) по методике, описанной для соединения (IV). Выход вещества (V) в виде вязкого желтоватого масла составил 0,022 г (42%). R_f 0,15. ИК-спектр (см^{-1}): 3300—3200 (+NH₃), 1740 (COOR), 1220 (P=O), 1070 (P—O—C, C—O—C).

ЛИТЕРАТУРА

1. Spin-Labeling: Theory and Applications (1976) Berliner L., ed., Acad. Press, N. Y.
2. Hubbell W. L., McConnell H. M. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 314—326.
3. Stanacev N., Stuhne-Secalec L., Schreier-Muccillo S., Smith I. C. P. (1974) Can. J. Biochem., 52, 884—893.
4. Shvets V. I., Sukhanov V. A., Okhanov V. V., Zhdanov R. I. (1979) Chem. Phys. Lipids, 23, 163—172.
5. Keana J. F. W., Dinerstein R. J. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 2808—2810.
6. Райхман Л. М., Бужинский Э. П., Мошковский Ю. Ш. (1973) Докл. АН СССР, 212, 246—250.
7. Rey P., McConnell H. M. (1977) J. Amer. Chem. Soc., 99, 1637—1644.
8. Суханов В. А., Жданов Р. И., Швец В. И., Евстигнеева Р. П. (1978) Биоорганической химии, 4, 785—790.
9. Sukhanov V. A., Zhdanov R. I., Shvets V. I. (1979) Chem. Phys. Lipids, 23, 155—162.
10. Пармон В. Н., Когорин А. И., Жидомиров Г. М. (1977) Ж. структурн. химии, 18, 132—177.
11. Куликов А. В., Лихтенштейн Г. И. (1976) Молекулярн. биология, 10, 132—139.
12. Апаев Б. П., Кольтов В. К., Райхман Л. М., Мамедиязов О. Н., Розандцев Э. Г. (1972) Биофизика, 17, 224—232.
13. Суханов В. А., Швец В. И. (1979) Химия и технология органических производств, 9, вып. 2, 58—62.
14. Суханов В. А., Сергеевская Н. Л., Швец В. И., Евстигнеева Р. П. (1977) Ж. общ. химии, 47, 2130—2136.

Поступила в редакцию
8.V.1979

BIRADICAL LIPID PROBES FOR MEMBRANE STUDIES

SUKHANOV V. A., ZHDANOV R. I., SHVETS V. I.

*Institute for Biological Testing of Chemical Compounds,
Kupavna, Moscow Region; M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical
Technology, Moscow*

The phosphatidylethanolamine biradical derivatives comprising nitroxyl fragments at the C-6 and C-10 atoms of alkyl chains (palmitic and stearic acids, respectively) have been prepared by acylating *rac*-glycero-3-phospho-(N-phthaloyl)-ethanolamine, either with anhydrides in the presence of potassium salts, or with the imidazolides of the spin-labeled fatty acids. The protecting phthaloyl group was removed by mild hydrazinolysis followed by the PbO_2/O_2 oxidation of the derivatives thus formed into the starting nitroxyl radicals. The pattern of the EPR spectra of biradicals used as probes with various biological membranes at physiological and low temperatures was shown to be sensitive to the alterations in the molecular organization of membranes.
