



УДК 547.96:544.6

ИССЛЕДОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ^{31}P -ЯМР ПОЛИМОРФНЫХ
ПРЕВРАЩЕНИЙ НЕОЗВУЧЕННЫХ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ
ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ С ПРОСТОЙ И СЛОЖНОЙ
ЭФИРНОЙ СВЯЗЬЮ

*Чупин В. В., Василенко И. А., Серебренникова Г. А.,
Евстигнеева Р. П.*

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

Исследованы полиморфные превращения незвученных водных дисперсий фосфатидилхолинов диацильного, алкил-ацильного и альдегидоенового типов с помощью ^{31}P -ЯМР. Показано, что фосфатидилхолины могут образовывать при диспергировании в воде как ламеллярную, так и гексагональную фазы.

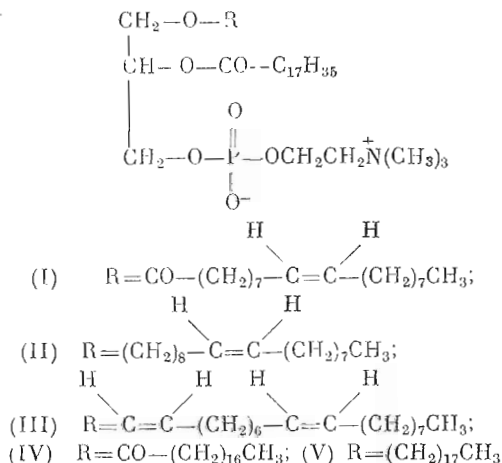
Одним из отправных пунктов теории мозаичного строения биологических мембран является положение о том, что фосфолипиды мембраны образуют бислои (см., например, обзор [1]). Это положение было подтверждено многочисленными данными, полученными при исследовании как биологических мембран, так и их моделей. Однако при изучении модельных мембран было обнаружено, что некоторые фосфолипиды при диспергировании в воде образуют агрегаты не ламеллярной (бислоистой) структуры, а цилиндрической (гексагональной). Например, кардиолипин в присутствии Ca^{2+} [2] и фосфатидилэтанолламина [3, 4] образуют в воде агрегаты гексагональной структуры, причем эти фосфолипиды нельзя отнести к минорным компонентам биологических мембран. Так, фосфатидилэтанолламин обнаружен в высоких концентрациях в грамположительных бактериях (в *E. coli* фосфатидилэтанолламин составляет более 85% фосфолипидов мембраны) [5], а также является одним из основных компонентов клеточных мембран млекопитающих. Кроме того, некоторые факторы (ионы Ca^{2+} , изменение pH, повышение температуры) могут способствовать образованию в мембране локальных участков гексагональной структуры.

Присутствие в мембране фосфолипидов, которые не способны образовывать агрегаты бислоистой структуры при физиологических условиях, а также факторы, вызывающие дестабилизацию бислоя, могут оказывать значительное влияние на структурные и функциональные свойства биологических мембран. Исследование структуры фосфолипидных агрегатов в воде и влияния различных факторов на структуру этих агрегатов является актуальной задачей современной мембранологии.

В связи с этим нами были исследованы структуры агрегатов незвученных водных дисперсий ряда синтетических фосфатидилхолинов и влияние температуры на структуру этих агрегатов.

Сокращение: $\Delta\sigma_{\text{эфф}}$ — «эффективная анизотропия химического сдвига».

В составе биологических мембран наряду с липидами ацильного типа присутствуют фосфолипиды с простой эфирной связью (алкильные и альдегидогенные) [6]. В настоящее время широко проводятся исследования по установлению связи между структурой фосфолипидов ацильного типа и свойствами биологических и модельных мембран. Поведение же фосфолипидов с простой эфирной связью в мембранах и их моделях до сих пор практически не изучалось. Поэтому среди выбранных нами объектов исследования представлены фосфатидилхолины диацильного (I, IV), алкил-ацильного (II, V) и альдегидогенного (III) типов:



Выбор объектов исследования (I–V) позволяет выявить влияние на свойства модельных мембран таких структурных изменений в молекулах фосфолипидов, как замена ацильных остатков на алкильно- и алкенильно-эфирные, введение двойной связи в углеводородную цепь.

В качестве метода исследования была использована ^{31}P -ЯМР-спектроскопия. ^{31}P -ЯМР-спектроскопия дает информацию о структуре фосфолипидных агрегатов в неозвученных водных дисперсиях, не оказывая при этом возмущающих воздействий на объекты исследования [4, 7–9], и результаты, полученные с помощью ^{31}P -ЯМР, паходятся в хорошем соответствии с данными электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа [10].

Теоретические вопросы использования ^{31}P -ЯМР для анализа фосфолипидных структур подробно рассмотрены Селигом [11]. При удалении ^{31}P -H диполярного взаимодействия из спектров ^{31}P -ЯМР можно извлечь информацию об анизотропии химического сдвига ядер ^{31}P . Так называемая эффективная анизотропия химического сдвига, $\Delta\sigma_{\text{эфф}}$ [7] (химический сдвиг между пиком и плечом, направленным в сторону слабого поля), для бислоя равна –40 м.д. Для гексагональной фазы $\Delta\sigma_{\text{эфф}}$ составляет 20 м.д. Изменения в анизотропии химического сдвига при переходе от бислоидной фазы к гексагональной обусловлены тем, что в случае гексагональной фазы реализуется возможность движения молекул фосфолипида вокруг водных каналов гексагональной фазы. Это движение фактически является быстрым (во временной шкале ^{31}P -ЯМР) вращением молекул вокруг оси водных каналов. В случае бислоидной фазы возможно лишь вращение молекул фосфолипидов вокруг оси, перпендикулярной бислою. Это находит свое выражение в величине $\Delta\sigma_{\text{эфф}}$ и форме сигналов в ^{31}P -ЯМР-спектрах, соответствующих бислоидной и гексагональной фазам.

Идентификация структуры фосфолипидных агрегатов по параметрам спектров ^{31}P -ЯМР возможна при большой скорости латеральной диффузии, когда коэффициент диффузии составляет величину не менее 10^{-8} см²/с. Это условие соблюдается, если фосфолипиды мембраны находятся в жидко-кристаллическом состоянии, т. е. при температуре не ниже

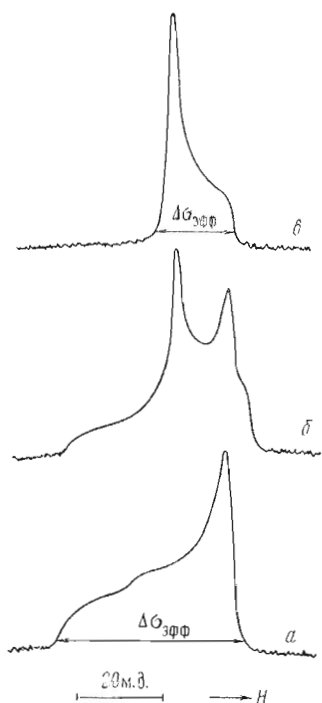


Рис. 1

Рис. 1. ^{31}P -ЯМР-спектры неозвученной водной дисперсии 1-олеоил-2-стеароил-*rac*-глицерофосфохолина (I) при различных температурах: *a* — 40, *b* — 60, *c* — 85° С

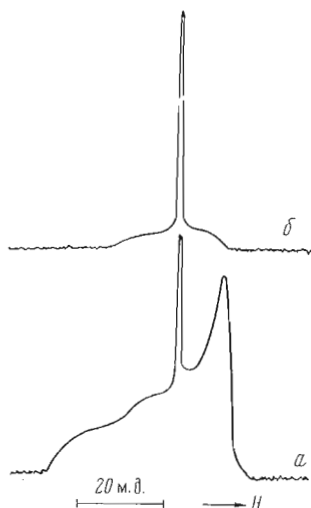


Рис. 2

Рис. 2. ^{31}P -ЯМР-спектры неозвученной водной дисперсии *cis*-1-(9-октадецил)-2-стеароил-*rac*-глицерофосфохолина (II) при 22° С: *a* — в отсутствие лизофосфатидилхолина, *b* — в присутствии 40% (мольных) лизофосфатидилхолина

температуры фазового перехода углеводородных цепей фосфолипидов в мембране [12]. Учитывая это, все спектры ^{31}P -ЯМР неозвученных водных дисперсий фосфатидилхолинов (I–V) получали при температурах выше температуры фазового перехода. Температура фазового перехода 1-олеоил-2-стеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина равна 22° С [13], 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина — 55° С [14]. Как было показано нами ранее [15], замена ацильного остатка в молекулах фосфатидилхолинов на алкильный или алкенильноэфирный незначительно понижает температуру фазового перехода, а конфигурация хирального центра фосфатидилхолинов на температуру фазового перехода практически не влияет, поэтому спектры ^{31}P -ЯМР в случае ненасыщенных фосфатидилхолинов (I–III) были получены при температурах выше 22° С, а в случае насыщенных (IV, V) — выше 55° С.

При исследовании структуры водных агрегатов фосфолипидов (I–V) было обнаружено, что фосфатидилхолины могут образовывать в воде как бислойную, так и гексагональную фазы. При повышении температуры бислойная фаза переходит в гексагональную, и этот процесс обратим. Общие закономерности полиморфных превращений фосфолипидных агрегатов одинаковы для всех исследованных фосфатидилхолинов (I–V) и представлены на примере 1-олеоил-2-стеароил-*rac*-глицеро-3-фосфохолина (I) (рис. 1).

Форма сигнала в ^{31}P -ЯМР-спектре неозвученной водной дисперсии фосфатидилхолина (I) (рис. 1*a*) соответствует сигналам, наблюдавшимся ранее для агрегатов бислойной структуры фосфатидилхолинов [4, 16] и

фосфатидилэтаноламинов [4, 7], а также теоретически рассчитанному спектру для фосфолипидов, находящихся в бислойной фазе [11]. Эффективная анизотропия химического сдвига ($\Delta\sigma_{эфф}$) составляет -46 м.д., что также находится в хорошем соответствии с ранее полученными результатами для ламеллярных фосфолипидных агрегатов [4, 7, 11]. В случае ненасыщенных фосфатидилхолинов (I—III) сигнал, аналогичный изображенному на рис. 1а, наблюдался в интервале температур $22-55^\circ\text{C}$, в случае насыщенных фосфолипидов (IV, V) — $55-65^\circ\text{C}$.

При повышении температуры было обнаружено, что часть молекул фосфатидилхолина (I) переходит из бислойной в гексагональную фазу (рис. 1б). Для ненасыщенных фосфатидилхолинов (I—III) эквимольная смесь бислойной и гексагональной фаз образуется при температуре около 60°C , для насыщенных фосфатидилхолинов (IV, V) — при 75°C .

При 85°C все исследованные фосфатидилхолины (I—V) образовывали гексагональную фазу. Как видно из рис. 1в, в спектре ^{31}P -ЯМР неозвученной водной дисперсии фосфолипида (I) при 85°C имеется плечо, направленное в сторону сильного поля, тогда как в случае бислоя плечо направлено в сторону слабого поля (рис. 1а). Эффективная анизотропия химического сдвига сигнала ^{31}P для фосфолипидной дисперсии при 85°C в 2 раза меньше, чем для бислойной фазы, и имеет другой знак $\Delta\sigma_{эфф}=19$ м.д. Все это согласуется с параметрами ^{31}P -ЯМР-спектров фосфолипидов, находящихся в гексагональной фазе, и свидетельствует о том, что при 85°C фосфатидилхолин (I) образует в воде агрегаты гексагональной структуры.

Как уже отмечалось выше, общие закономерности поведения водных дисперсий фосфолипидов (I—V) одинаковы. Однако в случае ненасыщенного фосфатидилхолина алкильного типа (II) наблюдались некоторые особенности. Этот фосфолипид образует ламеллярную структуру в интервале температуры $22-55^\circ\text{C}$. Но при этом в спектре ^{31}P -ЯМР (рис. 2а) имеется узкий симметричный сигнал. Это говорит о том [7], что часть молекул фосфатидилхолина (II) (менее 10%) образует фазу, способную к быстрому изотропному усреднению анизотропии химического сдвига. Такими фазами могут быть мицеллярная, везикулярная, кубическая или ромбическая [7]. Если индуцировать образование мицеллярной фазы добавлением к неозвученной водной дисперсии фосфолипида (II) лизофосфатидилхолина, то наблюдается рост интенсивности сигнала, отвечающего фазе, способной к изотропному усреднению анизотропии химического сдвига (рис. 2б). Но, так как параметры ^{31}P -ЯМР-спектра мицеллярной фазы совпадают с параметрами везикулярной, кубической и ромбической фаз, однозначный вывод о структуре фазы, присутствующей в неозвученной водной дисперсии ненасыщенного фосфатидилхолина алкильного типа (II), сделать нельзя.

Результаты, полученные в данной работе, подтверждают возможности ^{31}P -ЯМР при исследовании полиморфных превращений в гидратированных фосфолипидных системах. Показано, что фосфатидилхолины ацильного, алкильного и альдегидогенного типов образуют в воде агрегаты не только бислойной структуры, но и гексагональной. Исследование условий, при которых фосфолипиды образуют в воде агрегаты той или иной структуры, а также условий, при которых возможны полиморфные превращения агрегатов, даст возможность выяснить некоторые вопросы, касающиеся функционирования биологических мембран. По одной из гипотез [7], трансмембранный перенос липидов возможен при образовании в одном из монослоев мембраны локальных участков с гексагональной упаковкой молекул фосфолипидов. Слиянию мембран также, по-видимому, предшествует образование в бислое участков гексагональной структуры [17].

Экспериментальная часть

Фосфатидилхолины 1-олеоил-2-стеароил-*гас*-глицеро-3-фосфохолин (I), *цис*-1-(9-октадеценил)-2-стеароил-*гас*-глицеро-3-фосфохолин (II), *цис*, *цис*-1-(1',9'-октадекадиенил)-2-стеароил-*гас*-глицеро-3-фосфохолин (III), 1,2-дистеароил-*гас*-глицеро-3-фосфохолин (IV), 1-октадецил-2-стеароил-*гас*-глицеро-3-фосфохолин (V) были синтезированы по ранее описанным методам [18–20].

Неозвученные водные дисперсии фосфатидилхолинов (I–V) получали механическим диспергированием 250–300 мг фосфолипида в 2 мл тяжелой воды, содержащей 25 мМ трис-HCl (pD 7,1).

Спектры ^{31}P -ЯМР снимали при различных температурах на импульсном фурье-спектрометре Bruker WP-60 (ФРГ), рабочая частота 24,28 МГц. Количество накопления 10 000, длина импульса 10 мкс (90-градусный импульс). Все спектры были получены при широкополосной развязке от протонов (7,5 В).

ЛИТЕРАТУРА

1. Synger S. G., Nicolson G. L. (1972) *Science*, **145**, 720–731.
2. Rand R. P., Sengupta S. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **255**, 484–492.
3. Rand R. P., Tinker D. O., Fast P. G. (1971) *Chem. Phys. Lipids*, **6**, 333–342.
4. Cullis P. R., de Kruijff B. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **436**, 523–540.
5. Träuble H., Overath P. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **307**, 491–512.
6. Snyder F. (1972) *Ether lipids, chemistry and biology*, Acad. Press, New York — London.
7. Cullis P. R., de Kruijff B. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **507**, 207–218.
8. Cullis P. R., van Djick P. W. M., de Kruijff B., de Gier J. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **513**, 21–30.
9. Cullis P. R., de Kruijff B. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **513**, 31–42.
10. Cullis P. R., Verkleij A. G., Ververgaet P. H. J. Th. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **513**, 11–20.
11. Seelig J. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **515**, 105–140.
12. Cullis P. R. (1976) *FEBS Lett.*, **70**, 223–228.
13. de Kruijff B., Demel R. A., van Deenen L. L. M. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **255**, 331–340.
14. Mabrey S., Sturtevant J. M. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3862–3864.
15. Чупин В. В., Василенко И. А., Меркушкин Г. И., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 1515–1519.
16. McLaughlin A. G., Cullis P. R., Berden J. A., Richards R. E. (1975) *J. Magn. Res.*, **20**, 146–166.
17. Cullis P. R., Hope M. J. (1978) *Nature*, **271**, 672–674.
18. Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 75–77.
19. Розин А. Э., Гудкова С. Ф., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1975) *Ж. орган. химии*, **11**, 2308–2311.
20. Чебышев А. В., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 1362–1370.

Поступила в редакцию
20.IV.1979

A ^{31}P NMR STUDY OF POLYMORPHIC TRANSFORMATIONS IN NONSONICATED AQUEOUS DISPERSIONS OF ETHER AND ESTER PHOSPHATIDYLCHOLINES

CHUPIN V. V., VASILENKO I. A., SEREBRENNIKOVA G. A., EVSTIGNEEVA R. P.
M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

The polymorphic transformations of nonsonicated aqueous dispersions of phosphatidylcholines belonging to the diacyl, alkylacyl, or aldehydogenic types have been studied by the ^{31}P NMR spectroscopy. It has been shown that the phosphatidylcholine aqueous dispersions may form the lamellar as well as hexagonal phases.