



УДК 546.11.027.3+547.915.5

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ТЕРМИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ТРИТИЯ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ РАДИОАКТИВНОЙ МЕТКИ В ФОСФОЛИПИДЫ СИНТЕЗ МЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ 1-ПАЛЬМИТОИЛ-2-(12-АЗИДОСТЕАРОИЛ)- *sn*-ГЛИЦЕРО-3-ФОСФОХОЛИНА

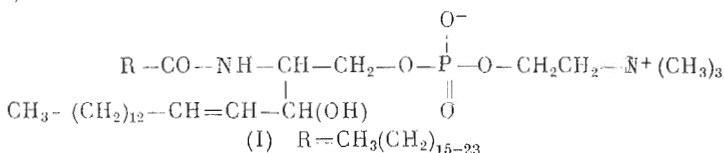
Смоляков В. С., Циренина М. Л., Ушаков А. Н.,
Нейман Л. А.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Метод термической активации газообразного трития применен для введения радиоактивной метки в фосфолипиды. Этим методом получены неопределенно меченные тритием сфингомиелин, 11-аминоундекановая кислота и метиловый эфир 12-оксистеариновой кислоты, который использован для синтеза меченого 1-пальмитил-2-(12-азидостеароил)-*sn*-глицеро-3-фосфохолина.

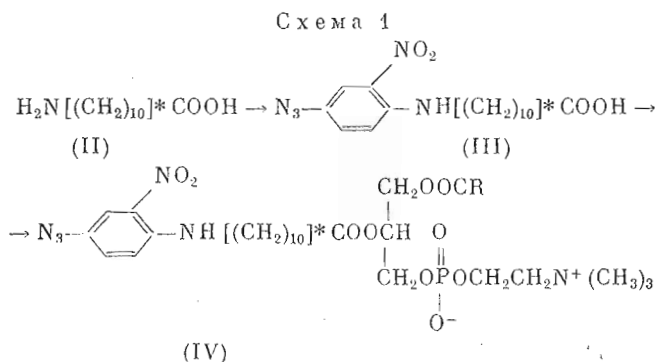
Применение меченых липидов является одним из наиболее плодотворных экспериментальных подходов к проблемам липид-липидного и липид-белкового взаимодействия в биологических мембранах, причем особенно перспективным представляется использование соединений, молекулы которых содержат одновременно и радиоактивную метку, и фотореактивные группировки (см., например, [1]). Синтез таких соединений связан, однако, с рядом трудностей. Мы полагаем, что для решения этой задачи должен оказаться полезным метод термической активности трития [2], который в принципе позволяет вводить радиоактивную метку в «готовые» сложные молекулы. В настоящей работе приведены два варианта получения тритийсодержащих липидов с использованием данного метода.

Первый из них состоит в непосредственной бомбардировке фосфолипидов атомами трития, активированными на раскаленной вольфрамовой проволоке. Таким способом мы ввели тритиевую метку в сфингомиелин (I) для изучения процесса его переноса от липосом к мембранам митохондрий с помощью липидпереносящего белка. Был получен неопределенно меченный тритием сфингомиелин с удельной радиоактивностью порядка 0,2 Ки/ммоль*:



* Эта величина не является предельной и при необходимости может быть значительно увеличена. Однако должны быть определены оптимальные условия хранения меченого препарата, так как при хранении (раствор в смеси хлороформ – метанол, 1 : 1, при 0–5° С) он подвергается быстрому авторадииолузу.

Однако этот способ не является общим, и наши попытки ввести с его помощью тритий в яичный лецитин и синтетический димиристоиллецитин оказались неудачными: оба соединения в условиях бомбардировки активированными атомами трития полностью разрушились. Непосредственное введение трития в молекулы липидов, содержащие фотореактивные группировки, также представляется невозможным из-за их чувствительности к световым и термическим воздействиям, которые сопровождают процесс введения метки. Поэтому для получения таких липидов мы применили другой подход: бомбардировку активированными атомами трития оксидов или аминокислот жирного ряда, введение фотореактивных группировок в получившиеся радиоактивные кислоты и их последующее использование для синтеза липидов. Этот подход оказался успешным [3] в случае фосфатидилхолина (IV), содержащего фотореактивную *m*-нитрофенилазидную группировку (схема 1).



Неопределенно меченная 11-аминоундекановая кислота (II) * с удельной радиоактивностью ~0,3 Ки/ммоль была получена из перадиоактивной 11-аминоундекановой кислоты и превращена в 2-нитро-4-азидофенильное производное (III), примененное затем для ацилирования лизолецитина. Конечный продукт имел удельную радиоактивность ~0,1 Ки/ммоль из-за разбавления меченой кислоты немеченым препаратом в процессе синтеза. Возможно, что введение трития в 11-аминоундекановую кислоту сопровождается изомеризацией углеродного скелета, однако в рассматриваемом случае [3] присутствие небольших количеств меченых изомеров 11-аминоундекановой кислоты не имело значения для принципиального решения поставленной задачи.

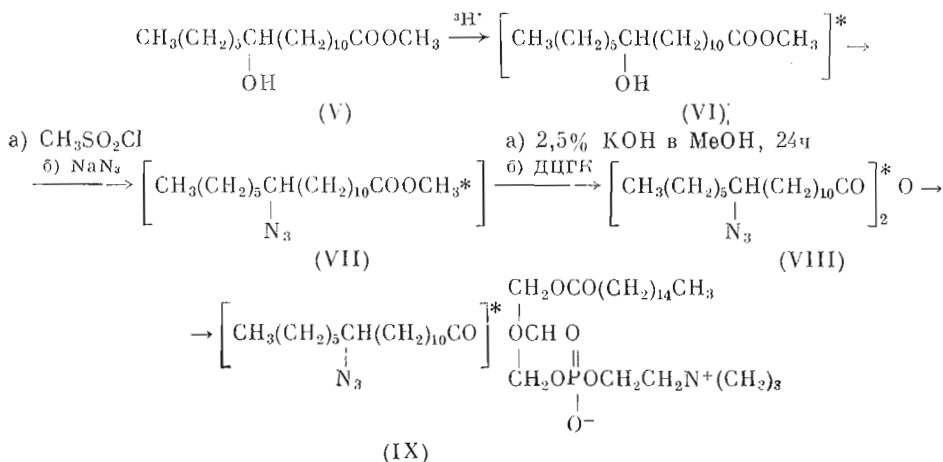
Аналогичный подход мы применили и для описанного в настоящей статье получения меченого тритием 1-пальмитоил-2-(12-азидостеароил)-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (IX). Однако в этом случае 12-оксистеариновая кислота оказалась непригодной в качестве исходного вещества, так как она практически полностью распадается при бомбардировке активированными атомами трития. Причина такой разницы в характере 11-аминоундекановой и 12-оксистеариновой кислот заключается, возможно, в том, что оксикислота в отличие от аминокислоты, представляющей собой внутреннюю соль, содержит свободную карбоксильную группу. Отрыв водорода от этой группы (процесс, легко протекающий при бомбардировке атомами трития) должен приводить к ацилоксильным радикалам типа RCOO^\cdot , способным быстро распадаться на CO_2 и алкильные радикалы. Распад в аналогичных условиях наблюдался и для других карбоновых кислот [4].

Однако включение активированных на вольфрамовой нити атомов трития в молекулу метилового эфира 12-оксистеариновой кислоты (V)

* В настоящей статье в формулах все неопределенно меченные тритием участки молекул заключены в квадратные скобки со звездочкой по образцу формулы аминокислоты (II).

протекает без каких-либо затруднений. Полученный радиоактивный препарат, имевший удельную радиоактивность ~ 15 мКи/ммоль, и был использован нами для синтеза меченого фосфолипида (IX) (схема 2). Для этого меченый эфир (VI) через соответствующий мезилат переводили действием азидата натрия [5] в меченый метиловый эфир 12-азидостеариновой кислоты (VII) и далее в свободную кислоту, из которой в присутствии дидецилгексилкарбодимиды получали ангидрид (VIII). Ацилирование последним кадмиевого комплекса 1-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина в присутствии 4-(диметиламино)-пиридина [6] привело к хроматографически однородному меченому фосфолипиду (IX), строение которого подтверждено эквимольным соотношением метиловых эфиров пальмитиновой и азидостеариновой кислот (по данным ГЖХ), освобождающихся при мягком щелочном дезацилировании.

Схема 2



Фосфолипид (IX) особенно удобен для изучения липид-белковых взаимодействий, так как он одновременно содержит радиоактивную метку и фотореактивную группировку в одной и той же углеводородной цепи липидной молекулы. Результаты применения этого фосфолипида в исследовании липид-белковых взаимодействий будут описаны отдельно.

Данные, приведенные в настоящей и предыдущей [3] статьях, позволяют сделать вывод, что метод термической активации трития весьма полезен для введения радиоактивной метки в липиды, в том числе и в липиды, содержащие фотореактивные группировки. В ряде случаев он может с успехом конкурировать с другими методами получения меченных тритием липидов, в частности с методом гетерогенного каталитического изотопного обмена [7, 8]. Хотя по сравнению с [^3H]арахидоновой кислотой, полученной методом каталитического изотопного обмена [8], меченые жирные кислоты, полученные нами с помощью бомбардировки активированными атомами трития, примерно на порядок уступают по удельной радиоактивности, имеется простой путь ее увеличения. Как показано нами для других соединений жирного ряда, поднять удельную радиоактивность в результате простого повторения бомбардировки образца не удастся. Однако, если брать на одну операцию не более 0,01 мкмоль вещества (минимальным является количество, способное образовать монослой на поверхности реакционного сосуда), это дает возможность достичь удельной радиоактивности порядка нескольких Ки/ммоль без значительного разрушения образца (при данной конструкции реакционного сосуда — см. «Экспериментальную часть»).

Существенное преимущество метода термической активации трития заключается в том, что он позволяет использовать в одном опыте не более

100 мКи трития, так как не требует создания атмосферы трития (давление $5 \cdot 10^{-3}$ мм рт. ст.) и, таким образом, в отличие от каталитического метода может применяться в изотопных лабораториях III класса. Важно, однако, отметить, что для меченых соединений, получаемых с помощью термической активации трития, необходимо иметь в распоряжении надежные методы их очистки и идентификации.

Экспериментальная часть

Метиловый эфир 12-оксистеариновой кислоты выделен из продуктов метанолиза гидрированного касторового масла хроматографией на силикагеле [9]. Димиристоиллецитин получен ацилированием кадмиевого комплекса глицерофосфохолина ангидридом миристиновой кислоты [6]. 1-Пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин получен обработкой 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина фосфолипазой A_2 [5]. 1,2-Дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин синтезирован в группе технологического синтеза института.

Анализ метиловых эфиров жирных кислот осуществлен на хроматографе серии 104 модели 64 (Pye Unicam, Англия) на колонке (1000×4 мм) с 3% SE-30 при программировании температуры от 160°C со скоростью 6 град/мин. Для препаративной ТСХ применяли пластинки (9×12 см) с силикагелем КСК (150–200 меш). Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике «Mark II». Радиохимическую чистоту препаратов определяли с помощью радиохроматографии на пластинках «Silufol» (ЧССР).

Общая методика введения тритиевой метки. Образцы вещества наносили порциями по 1–2 мг в виде пленки путем испарения 0,1% раствора в хлороформе на внутреннюю поверхность цилиндрического реакционного сосуда диаметром 75 мм и длиной 100 мм, по оси которого размещена вольфрамовая нить. Аналогично методике [2] систему вакуумировали, заполняли тритием до давления $5 \cdot 10^{-3}$ мм рт. ст., реакционный сосуд охлаждали жидким азотом и нагревали вольфрамовую нить при 2000 К в течение 30 с. Облученные образцы, отмытые от лабильного трития многократным растворением в метаноле, дополнительно очищали с помощью препаративной ТСХ.

[^3H]Сфингомиелин (I). Сфингомиелин (5 мг) облучали пятью порциями. Вещество смывали хлороформом. Начальная активность составляла ~ 10 мКи. Лабильный тритий отмывали, растворяя препарат в 100 мл смеси хлороформ – метанол, 1:1. После 10 промывок активность препарата составляла 2,5 мКи (удельная радиоактивность неочищенного препарата ~ 1 Ки/ммоль). Все вещество растворяли в 5 мл смеси хлороформ – метанол (1:1) и к 1 мл полученного раствора прибавляли 10 мг немеченого исходного вещества. Очистку проводили с помощью ТСХ в системе хлороформ – метанол – 10% аммиак, 60:35:8. Зону силикагеля, содержащую сфингомиелин, собирали и вещество экстрагировали смесью хлороформ – метанол – вода, 1:1:0,1. Выделено 6,13 мг вещества с удельной радиоактивностью 20 мКи/ммоль (при пересчете на перезабавленный препарат удельная радиоактивность составляла $\sim 0,2$ Ки/ммоль).

Метиловый эфир 12-окси[^3H]стеариновой кислоты (VI). 4 мг метилового эфира 12-оксистеариновой кислоты облучали двумя порциями по общей методике, смывали вещество хлороформом (25 мл на порцию) и получали меченый препарат с общей активностью ~ 20 мКи. Растворитель удаляли и лабильный тритий отмывали, растворяя остаток в 100 мл смеси хлороформ – метанол (1:1) и отгоняя растворитель. Эту процедуру повторяли два раза. Общая активность препарата при этом снижается до 8 мКи. После препаративной ТСХ в системе гексан – эфир (4:1) выделено 3 мг метилового эфира 12-окси[^3H]стеариновой кислоты с удельной активностью 15 мКи/ммоль. Радиохимическая чистота препарата 98%.

1-Пальмитоил-2-(12-азидо[^3H]стеариол)-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (IX). Из 0,12 ммоль меченого тритием метилового эфира 12-оксистеариновой кислоты с удельной радиоактивностью 15 мКи/ммоль получали метиловый эфир 12-азидо[^3H]стеариновой кислоты по методу [5]. Кадмиевый комплекс 1-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина ацилировали ангидридом 12-азидо[^3H]стеариновой кислоты [6]. Продукт (17 мг) выделяли из реакционной смеси препаративной ТСХ в системе хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4. Однородность вещества дополнительно подтверждали ТСХ в системах хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4) и хлороформ — метанол — 25% аммиак (65 : 35 : 5) при детекции пятен серной кислотой и реагентом Васьяковского [10]. Удельная радиоактивность 15 мКи/ммоль. Радиохимическая чистота препарата составляла 97–98%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moonen P., Haagsman H. P., Van Deenen L. M., Wirtz K. W. A. (1979) *Eur. J. Biochem.*, **99**, 439–445.
2. Шишков А. В., Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Унукевич М. С., Гольдманский В. И., Несмеянов Ан. Н. (1976) Докл. АН СССР, **228**, 1237–1239.
3. Молотковский Юл. Г., Лазуркина Т. Ю., Фаерман В. Н., Смоляков В. С., Бергельсон Л. Д. (1980) *Биоорг. химия*, **6**, 594–599.
4. Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Шишков А. В., Могильников В. П. (1979) *Радиохимия*, **21**, 909–912.
5. Chakrabarti P., Khorana H. G. (1975) *Biochemistry*, **14**, 5021–5033.
6. Gupta S. M., Radhakrishnan R., Khorana H. G. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 4315–4319.
7. Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Бергельсон Л. Д. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 730–734.
8. Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Безуглов В. В., Бергельсон Л. Д. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 906–911.
9. Вавер В. А., Ушаков А. Н., Циренина М. Л. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 1520–1530.
10. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. J. (1969) *Chem. Phys. Lipids*, **3**, 102–103.

Поступила в редакцию
30.V.1980

APPLICATION OF THE METHOD OF TRITIUM THERMAL ACTIVATION FOR PHOSPHOLIPID LABELING. SYNTHESIS OF TRITIUM LABELED 1-PALMITOYL-2-(12-AZIDOSTEAROYL)-*sn*-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE

SMOLYAKOV V. S., TSYRENINA M. L., USHAKOV A. N., NEIMAN L. A.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Thermal activation of tritium gas is used for the labeling of phospholipids. Sphingomyelin, 11-aminoundecanoic acid and methyl 12-hydroxystearate generally labeled with tritium are prepared by this method. Labeled 1-palmitoyl-2-(12-azidostearoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine is synthesized from tritiated methyl 12-hydroxystearate.