



УДК 541.64:547.953.2:577.352.2

НОВЫЕ ТИПЫ ПОЛИМЕРИЗУЕМЫХ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ,
СИНТЕЗ И СВОЙСТВА

Молотковский Ю. Г., Дергоусов А. А., Бергельсон Л. Д.

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

Описан синтез двух полимеризуемых действием УФ-облучения фосфатидилхолинов, содержащих остатки 11-метакрилоиламиноундекановой и 12-кето-10-октадеценовой кислот. Показано, что второй из указанных фосфолипидов способен образовывать липосомы, которые после полимеризации приобретают повышенную устойчивость к действию органических растворителей, детергентов и плазмы крови.

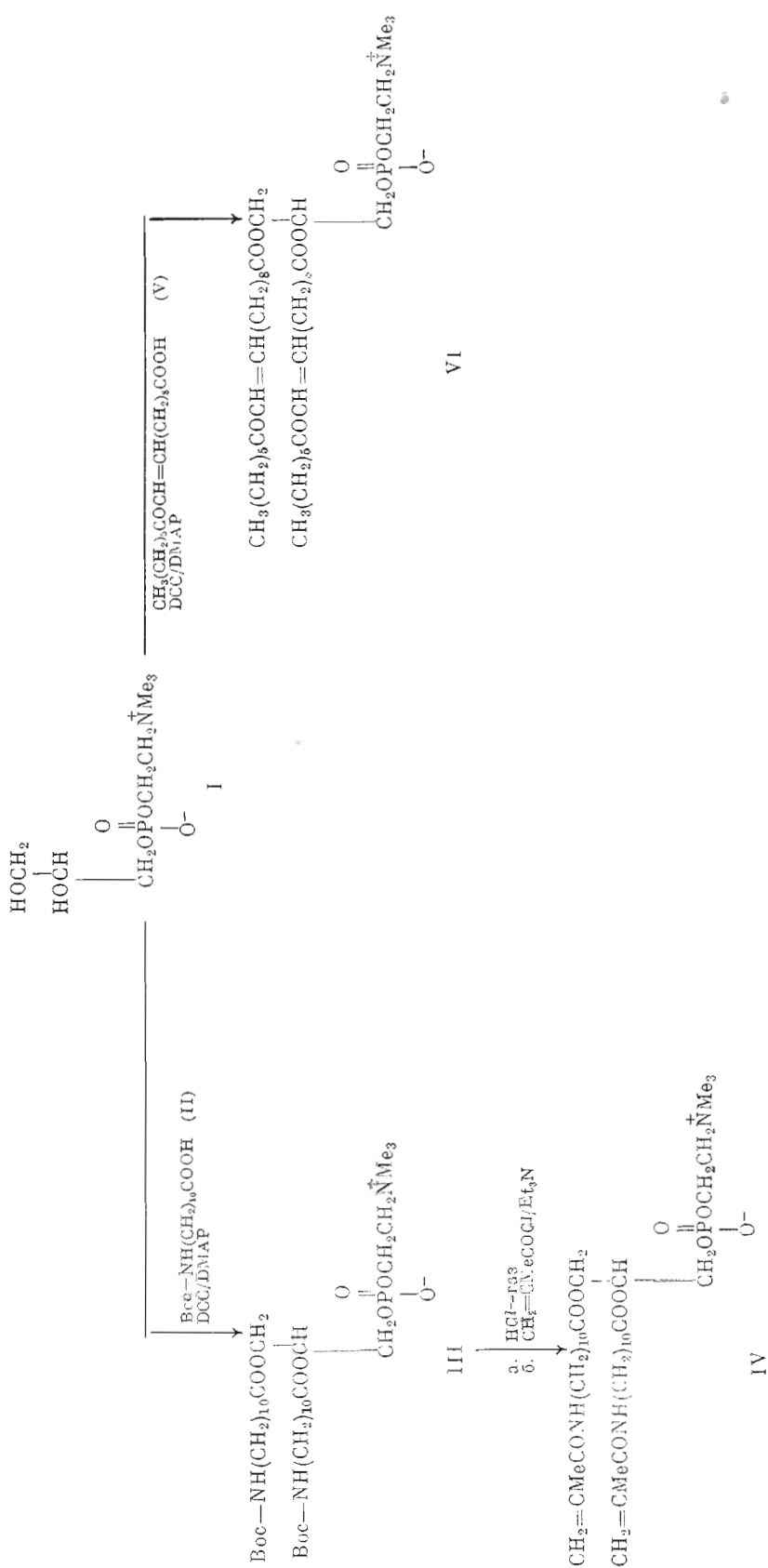
Полимеризуемые липиды — новая разновидность липидных веществ, которые, как ожидается, в ближайшем будущем получат широкое применение в мембранологии и экспериментальной медицине. Это липиды, содержащие группировки (диеновые, изоцианатные, тиольные и др.), способные под действием внешних факторов (УФ-облучение, изменение рН, восстановители) соединяться в олиго- и полимеры, образующие устойчивые пленки. Сформированные из таких липидов бислои и замкнутые частицы (липосомы, везикулы) после полимеризации приобретают повышенную устойчивость к воздействию растворителей, детергентов, ферментов и т. п. Полимерные липидные везикулы могут быть использованы как микрокапсулы для лекарственных веществ, а также в качестве носителей ферментов, антигенов и других белков (см. обзор [1] и сборник обзоров [2]).

Для приготовления полимеризуемых везикул наиболее подходящими липидами являются соответствующим образом модифицированные фосфолипиды, образующие устойчивые бислои. К настоящему времени описан ряд синтезов полимеризуемых фосфолипидов и близких к ним веществ, в частности четвертичных аммониевых оснований, способных образовывать мембранные структуры [1, 2], однако с практической точки зрения эти синтезы, равно как и свойства синтезированных липидов и полученных из них мембран, весьма несовершенны. Одним из существенных недостатков большинства описанных в литературе полимеризуемых липидов является сложность их синтеза.

Разрабатывая новый вариант синтеза такого рода веществ, мы имели в виду, что требуемый липид: а) должен быть фосфатидилхолином, поскольку это самый распространенный мембранный фосфатид животных клеток (к тому же из фосфатидилхолина легко можно получить ряд других фосфолипидов трансфосфатидилированием с фосфолипазой D); б) полимеризуемая группировка должна располагаться в ацильных цепях на некотором удалении от полярной головки, чтобы образовавшийся при полимеризации бислой сохранил достаточную подвижность в полярной области; в) синтез должен иметь небольшое число стадий, а исходные вещества — быть доступными.

Учитывая эти требования, мы синтезировали два полимеризуемых фосфатидилхолина — с остатками 11-метакрилоиламиноундекановой (фосфолипид IV) и 12-кето-10-транс-октадеценовой (фосфолипид VI) кислот (см. схему). Исходным соединением в обоих случаях служил *sn*-глицеро-3-фосфохолин (I), коммерческий продукт, который легко можно получить (в виде пептироскопического кадмиевого комплекса) путем омыления природного фосфатидилхолина.

Сокращения: Вос — трет-бутилглюкоксикарбонил; DMAP — 4-диметиламинопиридин; DCC — дициклогексилкарбодимид, SDS — додецилсульфат натрия.



11-Метакрилоиламиноундекановая кислота для построения фосфолипида (IV) была выбрана ввиду того, что синтез на ее основе фосфолипидов значительно проще синтеза других метакрилоильных производных (например, липидов с остатками ω -метакрилоилоксижирных кислот [4, 3]). Тем не менее, по нашим данным, до сих пор известен лишь один пример получения поверхностно-активного вещества с остатками 11-метакрилоиламиноундекановой кислоты — бис(11-метакрилоиламиноундеканойл)оксиптил-диметиламмонийбромид [4].

Описанный в настоящей работе синтез фосфолипида (IV) включает всего 3 стадии: ацилирование глицерофосфохолина (I) 11-Вос-аминоундекановой кислотой (II), удаление защитных групп с фосфатидилхолина (III) и ацилирование образовавшегося диаминопроизводного (без его очистки) метакрилоилхлоридом. При этом нестойкая метакрилоильная группа вводится лишь на последней стадии синтеза.

Другой синтезированный нами полимеризуемый фосфолипид (VI) включает еноновый фрагмент. Соединения, содержащие в алифатической цепи такую группировку, для получения полимеризуемых липидов до сих пор еще не применялись, однако вещества подобного рода были использованы в качестве фотореактивных зондов, поскольку сопряженная система $-\text{COCH}=\text{CH}-$ при УФ-облучении образует активированное переходное состояние, способное ковалентно пришиваться по двойным и активированным C—H-связям, функциональным группам и т. д. (см., например, [5]). Наиболее логичным было применить для синтеза фосфолипида (VI) доступную 12-кето-10-транс-октадеценую кислоту (V); ацилирование ею глицерофосфохолина (I) приводит к фосфатидилхолину (VI).

Попытки сформировать бислоиные частицы (мультиламеллярные липосомы или моноламеллярные везикулы) из метакрилоильного фосфатидилхолина (IV) оказались безуспешными: при длительном встряхивании его взвеси, при ультразвуковой ее обработке или удалении диализом детергента из смешанных мицелл октилглюкозид/липид (IV) неизменно получались неустойчивые суспензии, оседающие хлопьями в течение нескольких часов. Не удалось добиться образования устойчивых суспензий и путем добавления к этому фосфолипиду других липидов, например равного по весу количества смеси яичный фосфатидилхолин/фосфатидовая кислота, 19 : 1, и нагревом смеси при диспергировании до 60° С, т. е. существенно выше температуры фазового перехода ацильных остатков (измерение поляризации флуоресценции 1,6-дифенилгексатриена, включенного в суспензию фосфатидилхолина (IV) показало резкий фазовый переход при 36—43° С).

Очевидно, что метакрилоильный фосфатидилхолин (IV) не способен образовывать устойчивые бислои в указанных выше условиях. Надо полагать, такое поведение связано со значительной полярностью метакрилоиламидной группы, из-за чего последняя имеет тенденцию переходить в водную фазу. Такой переход требует резкого изгиба ацильной цепи и тем дестабилизирует бислой. Этим метакрилоиламидная группировка, видимо, отличается от *О*-метакрилоильной, поскольку фосфатидилхолин с остатками 12-метакрилоилоксидодекановой кислоты образует вполне устойчивые бислои [6]. О мембранообразующих свойствах сурфактанта с остатками 11-метакрилоиламиноундекановой кислоты [4] в литературе сведений нет.

Напротив, еноновый фосфатидилхолин (VI) (с добавкой 5% обычной фосфатидовой кислоты для предупреждения агрегации) легко образует при механическом встряхивании мультиламеллярные липосомы, обладающие обычной для фосфатидилхолиновых липосом устойчивостью, т. е. не коагулирующие в нейтральной водной среде в течение нескольких суток. Фазовый переход в липосомах, определенный на основе температурной зависимости поляризации флуоресценции 1,6-дифенилгексатриена, растянут и происходит в интервале 30—40° С.

Оба фосфолипида (IV, VI) способны полимеризоваться при действии УФ-облучения (контролем служила ТСХ: при завершении реакции исчезает пятно исходного мономера, на старте же присутствует интенсивное

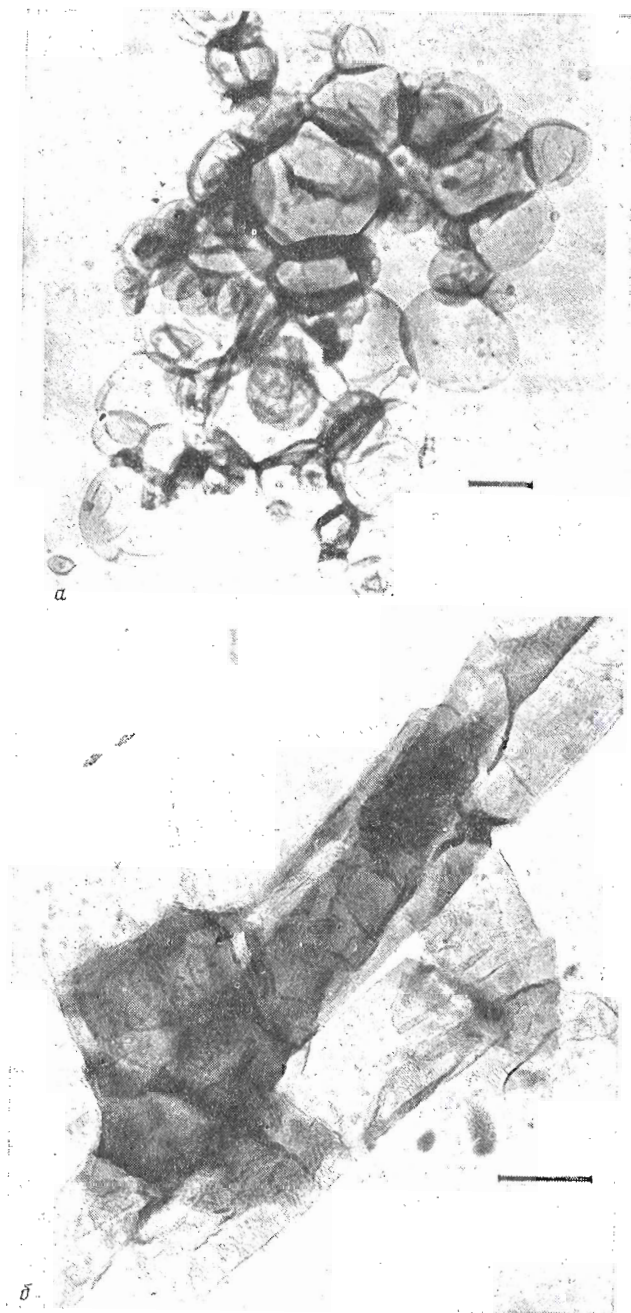


Рис. 1. Электронограмма липосом из фосфатидилхолина (VI) до (а) и после (б) полимеризации. Контрастирование уранилацетатом. Масштабный отрезок — 1 мкм

пято полимера — ср. [7]). При этом из водной суспензии мономерного фосфолипида (IV) образуется хлопьевидный полимер; напротив, липосомы енонового фосфатидилхолина (VI) после УФ-облучения дают суспензию, электронограмма которой (рис. 1) показывает, что полимерные частицы (б) близки по размерам исходным липосомам (а), но строение имеют не шарообразное, а скорее трубчатое. Во всяком случае, частицы эти замкнутые, о чем говорит удержание в их внутреннем объеме $[^3\text{H}]$ сахарозы, не высвобождаемой даже под действием детергента (см. ниже).

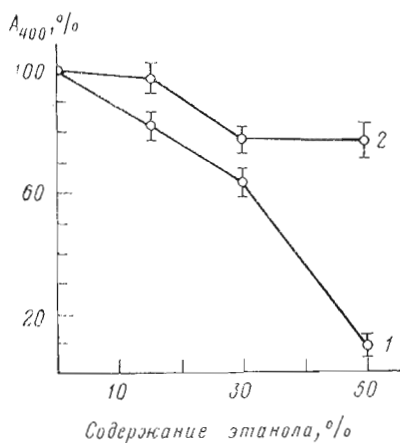


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость поглощения при 400 нм суспензии липосом из фосфолипида (VI) до (1) и после их полимеризации (2) от концентрации этанола. За 100% принято поглощение водной суспензии до облучения. Температура 20° С, остальные условия см. в «Экспер. части»

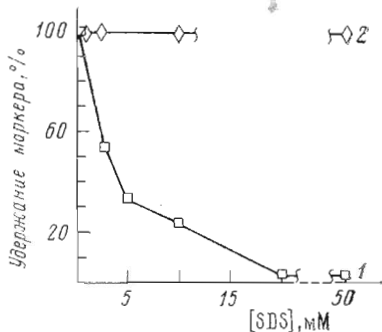


Рис. 3

Рис. 3. Удержание сахарозы, включенной в липосомы из фосфатидилхолина (VI), до (а) и после их полимеризации (б) в зависимости от концентрации SDS в среде. За 100% принято содержание сахарозы в липосомах в отсутствие SDS. Температура 20° С; остальные условия см. в «Экспер. части»

Устойчивость полимерных липосом из фосфолипида (VI) в сравнении с неполимеризованными липосомами из того же липида исследовали по отношению к действию органического растворителя (этанола), детергента (додецилсульфата натрия) и плазмы крови (ср. [1, 7]).

Этанол быстро разрушает липосомы из обычных липидов, растворяя их с образованием молекулярного и/или мицеллярного раствора. Это сопровождается резким уменьшением мутности системы, поэтому наиболее удобный способ наблюдения за процессом — измерение оптического поглощения. В случае липосом из фосфолипида (VI) обработка этанолом в концентрациях от 0 до 50% приводит к существенному снижению поглощения света неполимеризованными частицами (рис. 2, 1) и лишь к небольшому — полимеризованными (2), что свидетельствует о значительно большей устойчивости полимеризованных липосом к действию растворителя. Небольшое понижение поглощения полимеризованных липосом под действием 15–30% растворов этанола обусловлено скорее всего изменением коэффициента преломления среды, от которого зависит светорассеяние.

Устойчивость липосом к детергенту определяли измерением количества радиоактивной сахарозы, сохраняемой внутри липосом после обработки додецилсульфатом натрия в различной концентрации. Данные рис. 3 показывают, что полимеризованные липосомы, приготовленные из кетенового фосфатидилхолина (VI), целиком сохраняют маркер при концентрациях детергента, которые полностью разрушают неполимеризованные липосомы (график 1); в этих условиях липосомы из природных фосфолипидов также полностью солюбилизируются [1, 8].

Мы изучали также устойчивость липосом к действию плазмы крови человека, поскольку эта характеристика может оказаться существенной. Наши опыты показали, что добавление к суспензии липосом 10% плазмы человеческой крови и последующая инкубация в течение суток при 37° С приводят к сохранению 60–70% включенной [³H]сахарозы в случае полимеризованных липосом и примерно 20% — в случае неполимеризованных. Эти данные близки к результатам, описанным для полимеризованных и неполимеризованных липосом из хорошо изученного фосфолипида — фосфатидилхолина с остатками 12-метакрилоилоксидодекановой кислоты

[8], получение которого, однако, значительно сложнее синтеза фосфатидилхолина (VI).

Таким образом, еноновый фосфатидилхолин (VI) образует бислои, которые после полимеризации приобретают значительную устойчивость к ряду факторов, разрушающих бислои из обычных фосфолипидов. Это обстоятельство наряду с относительной простотой синтеза дает основания считать, что найден новый перспективный материал для получения полимерных липидных мембран.

Что касается метакрилоильного фосфатидилхолина (IV), то из полученных нами данных следует, что он не может быть употреблен для образования замкнутых мембранных препаратов (липосом, везикул). Однако он, вероятно, может оказаться пригодным в других случаях, например для получения пленок на подложке.

Авторы выражают благодарность В. В. Демину за съемку электронографий препаратов липосом и Л. С. Когтеву за определение температур фазовых переходов флуоресцентным методом.

Экспериментальная часть

Все вещества, содержащие еноновую или метакрилоильную группировку, защищали от дневного света. Растворители очищали по стандартным методикам. Растворы упаривали в вакууме. Температуры плавления (исправлены) определяли на столке Кюфлера, ИК-спектры регистрировали на спектрофотометре Zeiss UR 11, УФ-спектры — на спектрометре Specord UV VIS (ГДР). Радиоактивность определяли на счетчике Mark II (Nuclear Chicago, США) со сцинтиллятором Unisolve (Koch-Light, Англия). Для колоночной хроматографии применяли окись алюминия 60 (Merck, ФРГ), для ТСХ — силуфол UV 254 (Kavalier, СССР, или Merck, ФРГ). Основные системы для ТСХ: хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (А) и хлороформ — метанол — 7 н. NH_4OH , 65 : 35 : 8 (Б).

Применяли 11-аминоундекановую кислоту, N,N'-дидецилгексилкарбодиаимид (Merck, ФРГ), 4-диметиламинопиридил (Fluka, Швейцария). Комплекс *sn*-глицеро-3-фосфохолина с хлористым кадмием [9], Вос-азид [10] из Вос-гидразида (BDH, Англия), 12-кето-10-*транс*-октадекановую кислоту [11] из касторового масла, хлорангидрид метакриловой кислоты [12] получали по описанным методикам.

Определение температур фазового перехода путем измерения поляризации 1,6-дифенилгексатриена проводили по методу [13].

11-трет-Бутиллоксикарбониламиноундекановая кислота (II). К суспензии 12 г 11-аминоундекановой кислоты в 60 мл воды и 23 мл триэтиламина прибавляли раствор 10 мл Вос-азид в 85 мл свежеперегнанного диоксана, перемешивали 3 ч при 20°С и 1 ч при 45°С. Прозрачный раствор подкисляли 300 мл 1 н. HCl, суспензию выдерживали 3 ч при -5°С, осадок отсасывали, промывали водой, высушивали в вакууме над CaCl_2 , затем над P_2O_5 . Получали 15,8 г (88%) бесцветных кристаллов, т. пл.: 59–60,5°С. Найдено, %: С 63,7, Н 10,3, N 4,6. $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{NO}_4$. Вычислено, %: С 63,79, Н 10,30, N 4,65.

*1,2-Ди-(11-трет-бутиллоксикарбониламиноундеканойл)-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (III)*. К суспензии 1,5 г (3,4 ммоль) кадмиевого комплекса *sn*-глицеро-3-фосфохолина (I) в 30 мл сухого диметилформамида прибавляли 2,26 г (7,5 ммоль) кислоты (II), 4,01 г DMAP и 11,6 мл 20% раствора DCC в CCl_4 (11,2 ммоль). Смесь перемешивали 24 ч, добавляли 15 мл сухого хлороформа и 2 мл раствора DCC, перемешивали еще 48 ч; контроль за ходом реакции и последующей хроматографии — ТСХ в системе А, обнаружение молибденовым синим. Отгоняли растворитель, остаток обрабатывали 80 мл хлороформа с 5% изопропанола, фильтровали, добавляли 250 мл толуола, промывали 1% HCl, содержащей 1% NaCl (2×100 мл), 1% NaCl и насыщенным раствором NaCl (по 100 мл) и упаривали. Из остатка хроматографией на колошке со 120 г окиси алюминия (активность III) в градиентной системе хлороформ — метанол, 19 : 1—4 : 1, выделяли 1,15 г (48%) фосфолипида (III) в виде аморфной бесцветной массы, $[\alpha]_{539}^{20}$ 4,7° (с 1, хлороформ). ИК (вазелиновое масло), ν , см^{-1} : 3350 с (NH), 1730 с (C=O сл. эф.), 1685 (амид I), 1520 с (амид II), 1240 с (P=O). Найдено, %: С 56,8, Н 9,7, P 3,5. $\text{C}_{40}\text{H}_{80}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{P}\cdot\text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: С 56,74, Н 9,46, P 3,66.

*1,2-Ди-(11-метакрилоиламиноундеканойл)-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (IV)*. Через раствор 200 мг фосфолипида (III) в 5 мл сухого хлороформа пропускали при 0°С ток сухого HCl, контролируя ход реакции ТСХ в системе Б (обнаружение молибденовым синим и пингидрином). После превращения всего исходного фосфатидилхолина в пингидрин-положительное вещество с вдвое меньшей подвижностью (фосфатидилхолин с полностью удаленными защитными группами; по ходу реакции образуется пингидрин-положительное соединение с промежуточным значением R_f — очевидно, фосфолипид с одной удаленной Вос-группой) раствор дважды упаривали с изопропанолом (по 5 мл), добавляли 5 мл сухого хлороформа, 0,3 мл триэтиламини-

на и при перемешивании — 68 мкл метакрилоилхлорида (контроль реакции тот же). Через 6 ч смесь упаривали, из остатка хроматографией на 5 г окиси алюминия, как описано для фосфолипида (III), выделяли 155 мг (84%) фосфатидилхолина (IV) в виде аморфной слабо-желтой массы, индивидуальной хроматографически. $[\alpha]_{589}^{25}$ 5,0° (с 1,5, хлороформ). УФ (в этаноле): $\lambda_{\text{макс}}$ 203 нм (ϵ 2,5·10⁴). ИК (вазелиновое масло), ν , см⁻¹: 3300 с (NH), 3010 ср (CH₂=), 1720 с (C=C сл. эф.), 1656 (амид I), 1610 с (C=C), 1540 с (амид II), 1250 (P=O). Найдено, %: С 58,3, Н 9,1, Р 3,6. С₃₈H₇₀N₂O₁₀P·H₂O. Вычислено, %: С 58,27, Н 8,95, Р 3,96.

1,2-Ди-(12-кето-10-транс-октадецеиноил)-sn-глицеро-3-фосфохолин (VI). Из 310 мг 12-кето-10-транс-октадецеиновой кислоты (V) и 240 мг кадмиевого комплекса sn-глицеро-3-фосфохолина (I) по методике, описанной для фосфолипида (III), получили 200 мг (47%) фосфатидилхолина (VI) в виде аморфной слабо-желтой массы, индивидуальной хроматографически. УФ (в этаноле): $\lambda_{\text{макс}}$ 227 нм (ϵ 1,9·10⁴). ИК (вазелиновое масло), ν , см⁻¹: 1690 оч. с (CO кето), плечо 1720 (CO сл. эф.), 1630 с (C=C), 1240 с (P=O), 980 ср (транс-CH=CH). Найдено, %: Р 3,6. С₄₄H₈₀O₁₀NP·H₂O. Вычислено, %: Р 3,83.

Приготовление липосом. Порцию липида (2–6 мг) осаждали на стенках круглодонной 50-мл колбы выпариванием из хлороформного раствора, добавляли буфер (20 мм трис-HCl, pH 7,4, содержащий 1 mM EDTA и 0,01% NaN₃), чтобы концентрация липида была 1–2 мг/мл, и 50–100 мг стеклянных шариков диаметром 0,2 мм. Колбу заполняли аргоном и обрабатывали на вибрационном встряхивателе (частота 50 Гц) до образования однородной опалесцирующей суспензии, не содержащей липидных частиц, видимых при увеличении ×10 (около 10 мин).

Полимеризация. Суспензию липосом (1–2 мл) помещали в кварцевую пробирку диаметром 5 мм, растворенный воздух удаляли барботированием аргона (10 мин), затем суспензию облучали светом ртутных ламп низкого давления БУВ-15 (3×15 Вт; максимум испускания 254 нм) на расстоянии ~5 см, пропуская ток аргона. Ход полимеризации контролировали ТСХ в системе Б (обнаружение молибденовым синим и фосфоромолибденовой кислотой) — происходило уменьшение пятна мономера с R_f ~0,6 и увеличение пятна на старте. Для полной полимеризации липида (IV) требовалось около 1 ч, липида (VI) — 4 ч.

Определение устойчивости липосом. а. К этанолю. К аликватам суспензии липосом (0,2 мл, 2 мг липида/мл) из смеси фосфатидилхолин (VI)/фосфатидовая кислота, 19:1, подвергнутых и не подвергнутых полимеризации, прибавляли по 0,2 мл буфера, смеси буфер — этанол или этанола, чтобы концентрация этанола в суспензии составляла 0, 15, 30 или 50%. Через 15 мин измеряли оптическое поглощение при 400 нм. Средние значения четырех измерений приведены на рис. 2.

б. К detergentу. Суспензию липосом того же состава (4 мл) готовили с добавлением 10 мкКи [³H]сахарозы, половину подвергали полимеризации, в обоих вариантах маркер, не включившийся в липосомы, удаляли диализом (3 смены буфера по 200 мл каждые 1,5 ч при 20°С; в липосомах остается около 0,3% исходной радиоактивности). К аликватам (0,2 мл) добавляли равный объем буфера или раствора SDS в буфере, через 1 ч липосомы осаждали центрифугированием (12 000g, 15 мин) и промывали 0,2 мл буфера с таким же центрифугированием. Осадок и надосадочную жидкость по отдельности разбавляли сцинтиллятором и определяли радиоактивность. На рис. 3 представлены данные о сохранении маркера в липосомах (радиоактивность надосадочной жидкости служила контролем отсутствия потерь).

в. К плазме крови. Суспензию подвергнутых и не подвергнутых полимеризации липосом с [³H]сахарозой после диализа (см. вариант б) смешивали с равным объемом смеси буфер — человеческая плазма, 4:1, инкубировали 1 сут при 37°С и измеряли сохранившуюся в липосомах радиоактивность (см. вариант б).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bader H., Dorn K., Hapfer B., Ringsdorf H. // *Advances in Polymer Sci.* 1985. V. 67. P. 1–62.
2. *Annals N. Y.: Acad. Sci.* 1985. V. 446. P. 267–318.
3. Regen S. L., Singh A., Oehme G., Singh M. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1982. V. 104. N 3. P. 791–795.
4. Akimoto A., Dorn K., Gros L., Ringsdorf H., Schupp K. // *Angew. Chemie, Int. Ed.* 1981. V. 20. № 1. P. 90–91.
5. Chakrabarti P., Khorana H. G. // *Biochemistry.* 1975. V. 14. № 23. P. 5021–5033.
6. Regen S. L., Singh M., Samuel N. K. P. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1984. V. 119. № 2. P. 646–651.
7. Regen S. L. // *Annals N. Y. Acad. Sci.* 1985. V. 446. P. 296–306.
8. Juliano R. L., Hsu M. J., Regen S. L., Singh M. // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. V. 770. № 2. P. 109–114.
9. *Препаративная биохимия липидов*/Ред. Бергельсон Л. Д., Дятловская Э. В. М.: Наука, 1981. С. 236–238.
10. Carpino L. A., Giza A. C., Carpino B. A. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1959. V. 81. № 4. P. 955–957.
11. Nichols J., Schipper E. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1958. V. 80. № 21. P. 5705–5710.

12. *Rehberg C. E., Dixon M. B., Fisher C. H.* // J. Amer. Chem. Soc. 1945. V. 67. № 2. P. 208-210.
13. *Lakowicz J. R.* Principles of fluorescence spectroscopy. N. Y.: Plenum Press, 1983. P. 139-142.

Поступила в редакцию
29.IV.1988

NEW TYPES OF POLYMERIZABLE PHOSPHATIDYLCHOLINES:
SYNTHESIS AND PROPERTIES

MOLOTKOVSKY Jul. G., DERGOUSOV A. A., BERGELSON L. D.

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

Phosphatidylcholines bearing 11-methacryloylaminoundecanoyl or 12-keto-10-octadecanoyl residues were synthesized. Both phosphatidylcholines are easily polymerized under UV irradiation. The second phospholipid produces liposomes which, after polymerization, acquire an increased stability to deteriorating factors (organic solvents, detergents and human plasma).