



УДК 547.953:541.6

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ С ПРОСТОЙ  
И СЛОЖНОЙ ЭФИРНОЙ СВЯЗЬЮ В МОДЕЛЬНЫХ  
ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

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

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

Изучены свойства озвученных водных дисперсий фосфатидилхолинов ацильного, алкильного и альдегидогенного типов. Размер везикул определен с помощью электронной микроскопии и ПМР-спектроскопии со сдвиговыми реагентами. Из анализа температурной зависимости ширины сигналов в спектрах ПМР озвученных водных ( $D_2O$ ) дисперсий фосфолипидов были определены температуры фазового перехода фосфатидилхолинов с различными гидрофобными заместителями.

В состав биологических мембран наряду с липидами ацильного типа входят также алкильные и альдегидогенные липиды [1]. Если исследования по установлению связи между свойствами мембран и структурой входящих в них ацильных фосфолипидов представлены достаточно широко, то поведение фосфолипидов с простой эфирной связью в этих системах практически не изучалось. Достижения в синтезе последних [2–5] позволяют приступить к изучению их поведения в модельных фосфолипидных мембранах.

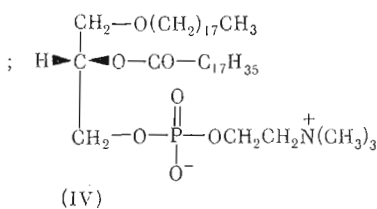
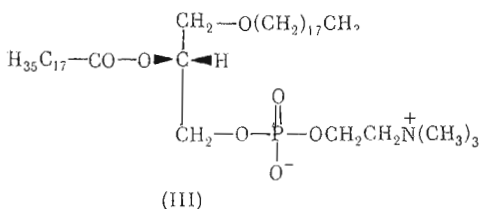
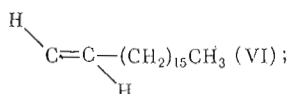
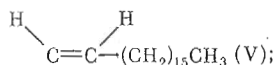
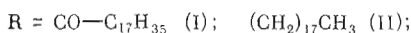
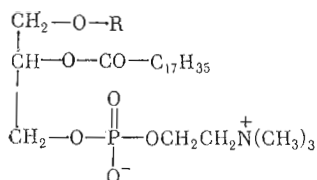
В настоящей работе проведено сравнение свойств озвученных водных дисперсий (везикул) фосфатидилхолинов ацильного, алкильного и альдегидогенного типов (I–VI)

Такой выбор объектов исследования позволяет выявить влияние замены в молекуле фосфатидилхолина жирнокислотного остатка на остатки спирта или альдегида той же длины цепи, а также конфигурации хирального центра и геометрии двойной связи плазмалогенов на размеры везикул и Т.ф.п. фосфолипидов в этих мембранах. С этой целью нами изучены алкильный фосфатидилхолин природной конфигурации (III), его энантиомер (IV) и рацемат (II), а также *цис*- и *транс*-изомеры альдегидогенных фосфолипидов (V, VI).

Для определения размера везикул использовали два независимых метода: электронную микроскопию и спектроскопию ПМР со сдвиговыми реагентами. Последний метод, как известно, позволяет дифференцировать

---

В статье приняты следующие сокращения: Т.ф.п. – температура фазового перехода углеводородных цепей фосфолипидов в мембране;  $I_{\text{нар}}$  и  $I_{\text{вн}}$  – интегральные интенсивности в спектре ПМР сигналов метильных протонов холиновой группы фосфолипидов, расположенных на наружной и внутренней поверхностях везикулярной мембраны соответственно.



липиды, находящиеся на внутренней и наружной поверхностях везикулы [6]. При добавлении во внешний объем везикулярного раствора сдвигового реагента (0,01 М  $\text{Eu}^{3+}$ ) в спектре ПМР наблюдаются два сигнала метильных протонов холиновой группы. Отношение интегральных интенсивностей «наружного» ( $I_{\text{нар}}$ ) и «внутреннего» ( $I_{\text{вн}}$ ) сигналов пропорционально отношению площадей наружной и внутренней поверхностей везикулы. Зная отношение  $I_{\text{нар}}/I_{\text{вн}}$  и толщину бислоя, можно вычислить диаметр везикулы. В случае 1,2-ди-О-стеароил-*rac*-глицерофосфохолина (I) толщина бислоя равна 42 Å [7], а  $I_{\text{нар}}/I_{\text{вн}}=2,0$ . Отсюда следует, что диаметр везикул равен 290 Å. Для озвученных водных дисперсий алкильных фосфатидилхолинов (II–IV)  $I_{\text{нар}}/I_{\text{вн}}=1,7$ . Если предположить, что в случае ацильных и алкильных фосфолипидов, гидрофобные заместители которых имеют одинаковую длину, толщина бислоя одинакова, то диаметр везикул, полученных из алкильных фосфатидилхолинов (II–IV), равен 360 Å.

Необходимо отметить, что спектроскопия ПМР со сдвиговыми реагентами дает лишь усредненные значения размеров везикул, причем присутствие в везикулярном растворе многослойных липосом вызывает значительные изменения в отношении интегральных интенсивностей  $I_{\text{нар}}/I_{\text{вн}}$ . Для удаления многослойных липосом обычно используют гель-фильтрацию [8] или центрифугирование [7]. Однако при длительном озвучивании фосфолипидных дисперсий до постоянного светопоглощения образуются достаточно гомогенные по размеру везикулы, среди которых многослойные липосомы практически отсутствуют [9]. Поэтому при таком подходе применение спектроскопии ПМР со сдвиговыми реагентами является правомерным.

Диаметры везикул, вычисленные из отношения интегральных интенсивностей  $I_{\text{нар}}/I_{\text{вн}}$ , хорошо согласуются с данными электронной микроскопии (таблица). Если фосфолипиды алкильного типа (II–IV) образуют сферические частицы, аналогичные везикулам, полученным из ацильного фосфатидилхолина (I), то альдегидогенные фосфолипиды (V, VI) образуют более сложные агрегаты, состоящие из нескольких частиц. В связи с этим применение спектроскопии ПМР для определения размера частиц исключается.

Для сравнения поведения фосфатидилхолинов ацильного, алкильного и альдегидогенного типов в мембране нами были определены Т.ф.п. фосфолипидов (I–VI) (таблица). Данный параметр при физиологических

## Температуры фазового перехода и внешние диаметры везикул фосфолипидов (I–VI)

Фосфолипид	Т.ф.п., °С	Диаметр везикул, Å	
		А *	В **
1,2-ди-О-Стеароил- <i>гас</i> -глицерофосфохолин (I)	55–56	280–300	290
1-О-Октадецил-2-О-стеароил- <i>гас</i> -глицерофосфохолин (II)	54–55	350–400	360
1-О-Октадсцил-2-О-стеароил- <i>sn</i> -глицерофосфохолин (III)	54–55	350–400	360
3-О-Октадецил-2-О-стеароил- <i>sn</i> -глицерофосфохолин (IV)	54–55	350–400	360
<i>цис</i> -1-О-(1'-Октадецил)-2-О-стеароил- <i>гас</i> -глицерофосфохолин (V)	50–51	—	—
<i>транс</i> -1-О-(1'-Октадецил)-2-О-стеароил- <i>гас</i> -глицерофосфохолин (VI)	50–51	—	—

\* А — диаметр везикул, определенный из данных электронной микроскопии. \*\* В — диаметр везикул, вычисленный из данных спектроскопии ПМР.

условиях определяет фазовое состояние мембраны, которое в свою очередь оказывает значительное влияние на многие биохимические процессы, протекающие в клетке [10].

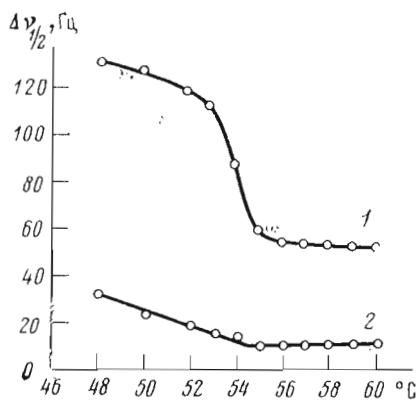
Для определения Т.ф.п. углеводородных цепей фосфолипидов в мембране используются различные методы: дифференциальная сканирующая калориметрия [11], ЭПР-[12], ЯМР-спектроскопия [13] и ряд других. Однако лишь ПМР-спектроскопия позволяет проследить за изменениями при фазовом переходе подвижности как полярных, так и неполярных участков молекул фосфолипидов. При переходе фосфолипидов из твердого состояния в жидкокристаллическое резко увеличивается подвижность углеводородных цепей, что сказывается в уменьшении ширины сигналов в спектре. На графике температурной зависимости ширины сигнала метилеповых протонов углеводородных цепей имеются две ярко выраженные точки перегиба (рисунок). Интервал температур, лежащий между этими точками, отражает «плавление» углеводородных цепей и соответствует фазовому переходу.

Температурная зависимость ширины сигнала метильных протонов холиновой группы выражена менее ярко. На графике температурной зависимости имеется излом, соответствующий Т.ф.п. (рисунок).

Ранее Т.ф.п. 1,2-ди-О-стеароил-*sn*-глицерофосфохолина (I) определялась различными методами: калориметрически — 58° С [11] и 54,9° С [14]; с помощью ЭПР — 54,0° С [12]. Т.ф.п. этого соединения, определенная нами с помощью ПМР (таблица), находится в хорошем соответствии с вышеприведенными данными.

Как видно из таблицы, замена ацильной группы на алкильную или альдегидогенную незначительно сказывается на Т.ф.п., а изменения конфигурации хирального центра алкильных фосфолипидов (II–IV) и геометрии двойной связи плазмалогенов (V, VI) практически не влияют на этот параметр.

По мнению многих исследователей [15–17], многообразие гидрофобных заместителей в молекулах фосфолипидов необходимо для создания и регуляции определенного фазового состояния мембраны, необходимого для нормального функционирования клетки. Однако, если при замене в молекуле фосфатидилхолина одних ацильных остатков на другие Т.ф.п., определяющая фазовое состояние мембраны при физиологических условиях, значительно изменяется [10], то замена насыщенных ацильных



Температурная зависимость ширины сигналов  $(\text{CH}_2)_n^-$  (I) и  $\text{N}^+(\text{CH}_2)_3$ -группы (2), измеренных на полувысоте, спектров ПМР озвученной водной дисперсии 1-О-октадецил-2-О-стеароил-*rac*-глицерофосфохолина (II)

остатков на остатки спиртов и альдегидов той же длины цепи, как было показано в данной работе, незначительно влияет на Т.ф.п. Тот факт, что среди гидрофобных заместителей фосфолипидов широко представлены спирты и альдегиды [1], вероятно, не связан с необходимостью создания определенного фазового состояния мембраны.

Авторы выражают благодарность В. А. Образцову (Институт биофизики АН СССР, Пущино) за проведение исследований озвученных фосфолипидных дисперсий с помощью электронной микроскопии.

### Экспериментальная часть

Фосфолипиды (I–VI): 1,2-ди-О-стеароил-*rac*-глицерофосфохолин (I), 1-О-октадецил-2-О-стеароил-*rac*-глицерофосфохолин (II), 1-О-октадецил-2-О-стеароил-*sn*-глицерофосфохолин (III), 3-О-октадецил-2-О-стеароил-*sn*-глицерофосфохолин (IV), *cis*-1-О-(1'-октадецил)-2-О-стеароил-*rac*-глицерофосфохолин (V), *trans*-1-О-(1'-октадецил)-2-О-стеароил-*rac*-глицерофосфохолин (VI) синтезированы по методам [2–5].

Везикулы получали озвучиванием 1% (вес.) дисперсий фосфатидилхолинов (I–VI) в  $\text{D}_2\text{O}$  на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1М (15 мин, 60° С, до постоянной оптической плотности при 450 нм) с последующим центрифугированием озвученных дисперсий в течение 30 мин при 10 000g.

Спектры ПМР снимали на импульсном фурье-спектрометре Bruker WP-60 (ФРГ). Стабилизация поля – по сигналу ядер дейтерия  $\text{D}_2\text{O}$ . Число сканирований – 100.

Спектры везикул с добавленным во внешний объем сдвиговым реагентом 0,01 М  $\text{Eu}^{3+}$  снимали при 60° С. Для определения Т.ф.п. фосфолипидов в мембране снимали спектры при различных температурах. Точность измерения температуры  $\pm 0,3^\circ \text{C}$ , время термостатирования 30 мин.

Образцы для электронной микроскопии готовили контрастированием 1% (вес.) молибденовокислым аммонием, рН 7,2. Съемку проводили на электронном микроскопе JEM-7A (Япония).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Snyder F. (1969) Progress in the chemistry of fats and other lipids, vol. 10, pt 3, pp. 289–335, Acad. Press, New York — London.
2. Васильев И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1975) Биоорг. химия, 1, 1307–1310.
3. Васильев И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1976) Биоорг. химия, 2, 75–77.
4. Розин А. Э., Гудкова С. Ф., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1975) Ж. орган. химии, 11, 2308–2311.
5. Чебышев А. В., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1977) Биоорг. химия, 3, 1362–1370.

6. Bystrov V. F., Shapiro Yu. E., Viktorov A. V., Barsukov L. I., Bergelson L. D. (1972) FEBS Lett., **25**, 337-338.
7. de Kruijff B., Cullis P. R., Radda G. K. (1975) Biochim. et biophys. acta, **406**, 6-20.
8. Huang C. (1969) Biochemistry, **8**, 344-350.
9. Brown I. R., Wutrich K. (1977) Biochim. et biophys. acta, **468**, 389-410.
10. Lee A. G. (1977) Biochim. et biophys. acta, **472**, 237-281.
11. Ladbroke B. D., Chapman D. (1969) Chem. Phys. Lipids, **3**, 304-356.
12. Shimshick E. J., McConnell H. M. (1973) Biochemistry, **12**, 2351-2358.
13. McLaughlin A., Podo F., Blasic J. K. (1973) Biochim. et biophys. acta, **330**, 109-121.
14. Mabrey S., Sturtevant J. M. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 3862-3866.
15. Lee A. G., Birdsall N. J. M., Metcalfe J. C., Toon P. A., Warren G. B. (1974) Biochemistry, **13**, 3699-3705.
16. Davis D. G., Inest C., Gulik-Krzywicki T. (1976) Biochemistry, **15**, 152-156.
17. Blok M. C., van der Neut-Kok E. C. M., van Deenen L. L. M., de Gier J. (1975) Biochim. et biophys. acta, **406**, 187-196.

Поступила в редакцию  
2.I.1978

После переработки  
6.III.1979

## STUDIES ON ETHER- AND ESTER PHOSPHATIDYLCHOLINES IN MODEL PHOSPHOLIPID MEMBRANES

CHUPIN V. V., VASILENKO I. A., MERKUSHKIN G. I.,  
SEREBRENNIKOVA G. A., EVSTIGNEEVA R. P.

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

The properties of sonicated aqueous dispersion of phosphatidylcholines of acyl, alkyl and aldehydogenic types were studied. The vesicle size was determined by electron microscopy and  $^1\text{H}$  NMR using shift reagents. The phase transition temperatures for phosphatidylcholines having various hydrophobic substituents were found from the temperature dependence of signal line-width in the  $^1\text{H}$  NMR spectra of phospholipid sonicated aqueous ( $\text{D}_2\text{O}$ ) dispersion.