



УДК 547.96:541.6

**ПОЛИМОРФНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ НЕОЗВУЧЕННЫХ
ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛАМИНОВ С ПРОСТОЙ
И СЛОЖНОЙ ЭФИРНОЙ СВЯЗЬЮ**

*Чупин В. В., Бовин А. Н., Васильченко И. А.,
Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П.*

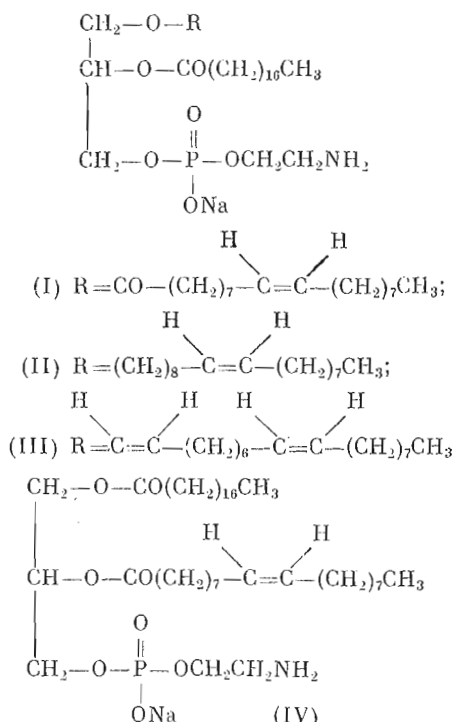
Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Исследованы полиморфные превращения водных дисперсий ряда синтетических фосфатидилэтанолamines ацильного, алкильного и альдегидогенного типов с помощью ^{31}P -ЯМР. Показано, что при повышении температуры наблюдается переход ламеллярной фазы в гексагональную, определены температурные интервалы фазового перехода бислои — гексагональная фаза и изучено влияние рН на данный фазовый переход. Полученные результаты обсуждаются с позиций изменения динамического объема фосфолипидных молекул.

Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные не вызывают сомнения в том, что полиморфизм фосфолипидов играет важную роль в функционировании биологических мембран. Наиболее подробно полиморфные превращения гидратированных липидных систем изучены в ряду синтетических и природных фосфатидилэтанолamines ацильного типа [1—4]. Интерес к данному классу липидов не случаен. Фосфатидилэтанолamines при физиологических значениях температуры и рН обычно образуют не ламеллярную фазу, основой которой является бимолекулярный липидный слой, а инвертированную гексагональную фазу. Последняя представляет собой цилиндрические структуры, ядром которых являются водные каналы, окруженные полярными группами молекул фосфолипида. Таким образом, фосфатидилэтанолamines могут оказывать дестабилизирующее действие на бислои, вызывая образование в мембране локальных участков гексагональной фазы. Присутствие в биологических мембранах подобных участков оказывает значительное влияние на такие важные процессы, как трансбислоиный переход фосфолипидов [1], эндоцитоз [5], слияние мембран [6].

Несмотря на то что фазовый переход бислои — гексагональная фаза в случае фосфатидилэтанолamines со сложноэфирной связью достаточно хорошо изучен, поведение водных дисперсий фосфатидилэтанолamines алкильного и альдегидогенного типов до сих пор не исследовалось. Поэтому целью данной работы является сравнительное изучение свойств незвученных водных дисперсий, содержащих фосфатидилэтанолamines ацильного, алкильного и альдегидогенного типов. Среди объектов исследования представлены фосфатидилэтанолamines (I—III), содержащие при $\text{C}_{(1)}$ глицерина остатки ненасыщенных жирных кислоты (I); спирта (II), эпола (III), а также фосфатидилэтаноламин (IV), содержащий остаток олеиновой кислоты при $\text{C}_{(2)}$ глицерина и являющийся изомером положения

фосфатидилэтаноламина (I):



По нашим [7] и литературным данным [8], конфигурация хиральных центров молекул фосфолипидов на фазовые переходы модельных фосфолипидных мембран практически не влияет. В связи с этим для проведения модельных исследований по полиморфизму фосфатидилэтаноламинов представлялось целесообразным использовать не оптически активные, а более доступные рацемические фосфолипиды (I) — (IV).

В качестве метода исследования была выбрана спектроскопия ³¹P-ЯМР [1—4, 6]. Данный метод позволяет проследить за структурными превращениями фосфолипидных агрегатов в воде, не оказывая при этом возмущающих воздействий на объекты исследования.

Характер температурных изменений спектров ³¹P-ЯМР при р²H 7,2 оказался одинаковым для фосфолипидов (I) — (III) и показан на примере фосфатидилэтаноламина алкильного типа (II) (рис. 1). При 33° С фосфолипид (II) образует ламеллярную фазу, о чем свидетельствуют данные ³¹P-ЯМР (рис. 1а): плечо сигнала направлено в сторону слабого поля, анизотропия химического сдвига составляет величину порядка 46 м.д. Повышение температуры приводит к росту интенсивности узкого симметричного сигнала, отвечающего липидным молекулам, способным к быстрому (во временной шкале ³¹P-ЯМР) изотропному движению (рис. 1б). Наконец, при 43° С наблюдается спектр ³¹P-ЯМР (рис. 1в), параметры которого хорошо соответствуют параметрам теоретического и экспериментального спектров гексагональной фазы [1—4, 6]: плечо сигнала направлено в сторону сильного поля, анизотропия химического сдвига равна 20 м.д. Таким образом, можно говорить о том, что термотропный фазовый переход бислой — гексагональная фаза для данного фосфолипида (II) происходит в температурном интервале 33—43° С. Аналогичный переход практически при тех же температурах наблюдается и в случае фосфатидилэтаноламинов (I), (III). Отсюда следует, что замена ацильного остатка в молекуле фосфатидилэтаноламина на остаток спирта или альдегида той же длины цепи и степени ненасыщенности существенно не влияет на

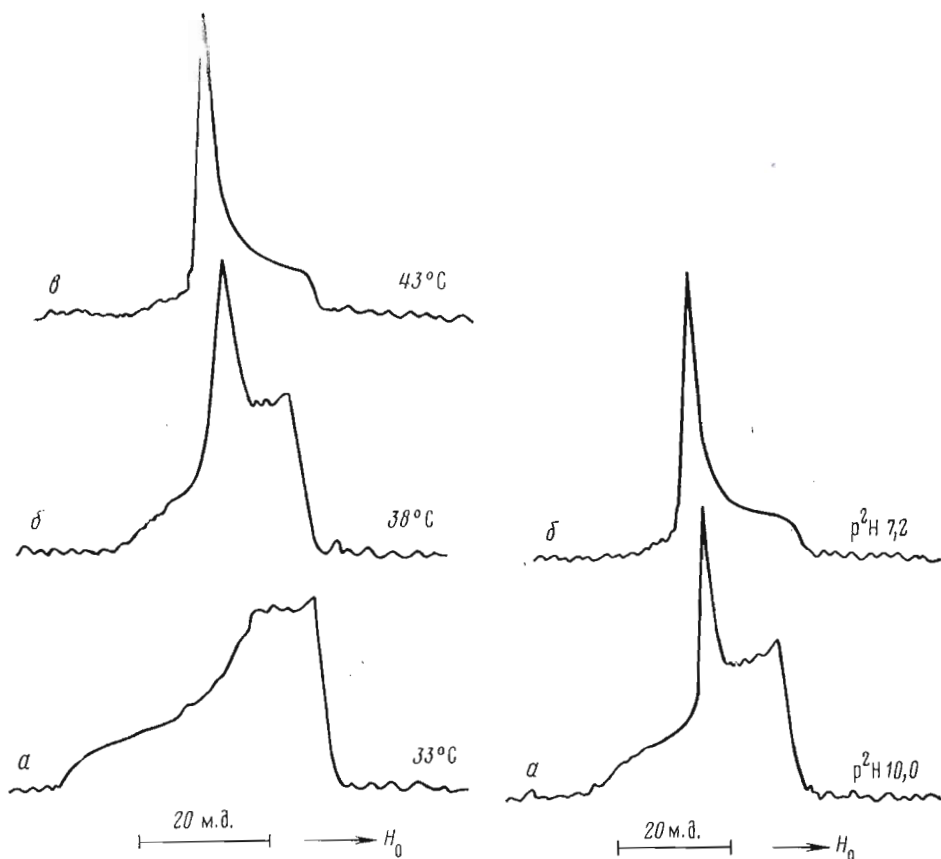


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР неозвученной водной дисперсии *цис*-1-О-(9-октадецил)-2-стеароил-*гис*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (II) при различных температурах ($p^2\text{H}$ 7,2)

Рис. 2. Спектры ^{31}P -ЯМР неозвученной водной дисперсии *цис*-1-О-(9-октадецил)-2-стеароил-*гис*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (II) при различных значениях $p^2\text{H}$ (55°C)

термотропный фазовый переход бислой — гексагональная фаза. Необходимо отметить также, что переход бислоя в гексагональную фазу фосфолипидов (I) — (III) обладает ярко выраженным гистерезисом, величина которого составляет $\sim 10^\circ\text{C}$.

Термотропный фазовый переход бислой — гексагональная фаза фосфатидилэтаноламинов (I) — (III) был изучен также при различных значениях $p^2\text{H}$: 1,0 (за исключением кислотолабильного фосфатидальтаноламина (III)) и 10,0. Существенных различий в полиморфном поведении фосфолипидов (I), (II) при $p^2\text{H}$ 1,0 и $p^2\text{H}$ 7,2 обнаружено не было. В щелочных же условиях происходит стабилизация ламеллярной фазы. В спектрах ^{31}P -ЯМР неозвученных водных дисперсий фосфатидилэтаноламинов (I) — (III), полученных при $p^2\text{H}$ 10,0 в широком интервале температур (до 55°C ; при более высоких температурах образуются значительные количества лизофосфатидилэтаноламинов), наблюдаются сигналы, свидетельствующие о бислойной организации липидов (рис. 2б). Таким образом, концентрация ионов водорода в водной фазе оказывает значительное влияние на полиморфное поведение гидратированных липидных систем, содержащих фосфатидилэтаноламины.

Способность фосфолипидов образовывать ламеллярную или гексагональную фазы в настоящее время объясняется с позиций изменения ди-

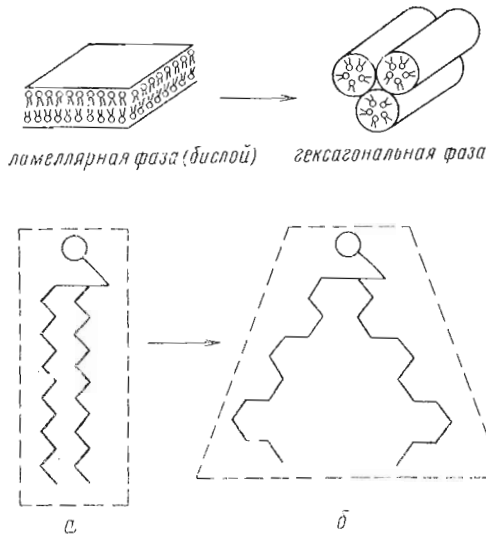


Рис. 3. Взаимосвязь между изменениями динамического объема молекул фосфолипидов и структурой фосфолипидных агрегатов в воде

динамического объема липидных молекул [5]. При температурах ниже температуры фазового перехода гель — жидкий кристалл углеводородная область мембраны имеет относительно упорядоченное строение: углеводородные цепи параллельны друг другу и упакованы в плотную квази-гексагональную решетку (рис. 3а). Молекула фосфолипида в этом случае имеет форму цилиндра. При повышении температуры плотная упаковка углеводородных цепей разрушается, подвижность их возрастает и в результате вращения вокруг связей С—С возникают *gauche*-ротамеры. При этом молекула фосфолипида приобретает форму усеченного конуса с полярной головной группой у вершины конуса (рис. 3б). Это способствует образованию липидными молекулами, имеющими конусообразную форму, инвертированной гексагональной фазы. Молекулы же, имеющие форму цилиндра, образуют бислои.

В свете такой модели термотропного фазового перехода бислои — гексагональная фаза легко интерпретируется полиморфное поведение фосфатидилэтаноламина (IV), содержащего остаток ненасыщенной жирной кислоты во втором положении глицеринового скелета. По данным спектроскопии ^{31}P -ЯМР, данный фосфолипид в отличие от фосфатидилэтаноламинов (I) — (III) не образует бислои в широком интервале температур, вплоть до температуры кристаллизации воды (0°C). В случае фосфатидилхолинов известно [9], что остаток олеиновой кислоты во втором положении глицеринового скелета оказывает более сильное дестабилизирующее действие на углеводородную область бислоя, чем остаток той же кислоты в первом положении глицерина. По нашим данным, аналогичная зависимость сохраняется и в ряду фосфатидилэтаноламинов, о чем свидетельствует поведение фосфолипидов (I), (IV).

При рассмотрении полиморфных превращений гидратированных липидных систем с позиций изменения динамического объема молекул необходимо учитывать объемы, занимаемые полярными группами молекул липидов, а также возможность образования связей между полярными группами. В случае фосфатидилэтаноламинов возможно образование межмолекулярных водородных связей [10], что приводит к уменьшению подвижности и, как следствие этого, уменьшению динамического объема, занимаемого полярной группой фосфатидилэтаноламина в бислое. Важная роль межмолекулярных водородных связей в полиморфном поведении

фосфатидилэтаноламинов подтверждается тем фактом, что в щелочных условиях (p^2H 10,0) происходит стабилизация ламеллярной фазы, образованной фосфолипидами (I) — (III). С другой стороны, при тех же значениях pH наблюдается значительное ослабление водородных связей между молекулами фосфатидилэтаноламинов в бислое [10]. Нарушение межмолекулярных водородных связей приводит к увеличению динамического объема полярного участка молекул фосфатидилэтаноламинов и стабилизации ламеллярной фазы.

Ранее нами было показано [11], что фосфатидилхолины, имеющие такое же строение гидрофобных заместителей, как и фосфатидилэтаноламины (I) — (III), образуют гексагональную фазу лишь при $85^\circ C$. Такое резкое различие в полиморфном поведении фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов можно объяснить двумя причинами: 1) объем полярной группы фосфатидилхолинов значительно больше по сравнению с фосфатидилэтаноламинами, 2) в случае фосфатидилэтаноламинов возможно образование межмолекулярных водородных связей. В результате молекулы фосфатидилхолинов приобретают форму конуса при температурах, значительно больших, чем соответствующие фосфатидилэтаноламины. Интересно также, что в отличие от фосфатидилэтаноламинов [1—4] строение гидрофобных заместителей не оказывает существенного влияния на полиморфное поведение фосфатидилхолинов [11].

Сопоставление свойств фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов позволяет сделать некоторые предположения с позиций полиморфизма о функциональном назначении данных липидов в биологических мембранах. Фосфатидилхолины независимо от строения гидрофобных заместителей при физиологических условиях образуют бислои [11], поэтому их роль, по-видимому, заключается в стабилизации бислоевой организации мембран. Фосфатидилэтаноламины же в некоторых случаях могут способствовать образованию в мембранах локальных участков гексагональной фазы [1—4] (внутримембранные частицы липидной природы), которые во многом определяют свойства биологических мембран [5].

Экспериментальная часть

Натриевые соли фосфатидилэтаноламинов (I) — (IV): 1-олеоил-2-стеариол-*rac*-глицеро-3-фосфоэтанолamina (I), *cis*-1-О-(9-октадеценил)-2-стеариол-*rac*-глицеро-3-фосфоэтанолamina (II), *cis*, *cis*-1-О-(1,9-октадекаденил)-2-стеариол-*rac*-глицеро-3-фосфоэтанолamina (III) и 1-стеариол-2-олеоил-*rac*-глицеро-3-фосфоэтанолamina (IV) были синтезированы по ранее описанным методам [12, 13].

Неозвученные водные дисперсии фосфатидилэтаноламинов (I) — (IV) получали при механическом диспергировании 200—250 мг фосфолипида в 2 мл D_2O , содержащей 0,2 мМ EDTA, 25 мМ трис-HCl (p^2H 7,2). Кислотную или щелочную среду создавали титрованием липидной дисперсии 10% растворами соляной кислоты или едкого натра.

Спектры ^{31}P -ЯМР были получены на импульсном фурье-спектрометре «Bruker WP-60» (ФРГ) с рабочей частотой 24,28 МГц, при широкополосной развязке от протонов. Количество накопленных 10 000.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cullis P. R., de Kruijff B. Polymorphic phase behaviour of lipid mixture as detected by ^{31}P NMR. Evidence that cholesterol may destabilize bilayer structure in membrane system containing phosphatidylethanolamine.— *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 507, № 2, p. 207—218.
2. Cullis P. R., de Kruijff B. ^{31}P NMR studies of unsonicated aqueous dispersions of neutral and acidic phospholipids. Effect of phase transition, p^2H and divalent cations on the motion in the phosphate region of the polar headgroup.— *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 436, № 3, p. 523—540.
3. Cullis P. R., van Dijk P. W. M., de Kruijff B., de Gier J. Effect of cholesterol on the properties of equimolar mixtures of synthetic phosphatidylethanolamine and

- phosphatidylcholine. A ^{31}P NMR and differential scanning calorimetry study.— *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 513, № 1, p. 21–30.
4. Cullis P. R., de Kruijff B. The polymorphic phase behaviour of phosphatidylethanolamines of natural and synthetic origin. ^{31}P NMR study.— *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 513, № 1, p. 31–42.
 5. Cullis P. R., de Kruijff B. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 559, № 3, p. 399–420.
 6. Cullis P. R., Hope M. J. Effect of fusogenic agent on membrane structure of erythrocyte ghosts and mechanism of membrane fusion.— *Nature*, 1978, v. 271, № 4, p. 671–674.
 7. Чупин В. В., Василенко И. А., Меркушкин Г. П., Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Изучение свойств фосфатидилхолинов с простой и сложной эфирной связью.— *Биоорганическая химия*, 1979, т. 5, № 10, с. 1515–1519.
 8. Rainier S., Jain M. K., Ramirez F., Ioannou P. V., Muresck J. F., Wagner R. Phase transitions characteristics phosphatidylglycerol bilayers.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 558, № 2, p. 187–198.
 9. Seelig A., Seelig J. Effect of a single cis double bond on the structure of phospholipid.— *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 1, p. 45–50.
 10. Fookson J. E., Wallach D. F. H. Structural differences among phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and mixed phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine multilayers: an infrared absorption study.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1978, v. 189, № 1, p. 195–204.
 11. Чупин В. В., Василенко И. А., Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Исследование с помощью ^{31}P -ЯМР полиморфных превращений неозвученных водных дисперсий фосфатидилхолинов с простой и сложной эфирной связью.— *Биоорганическая химия*, 1979, т. 5, № 12, с. 1831–1835.
 12. Чебышев А. В., Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Синтез природных ненасыщенных фосфатидальганололаминов и фосфатидальхолинов.— *Биоорганическая химия*, 1977, т. 3, № 10, с. 1362–1370.
 13. Розин А. Э., Серебрянникова Г. А., Василенко И. А., Евстигнеева Р. П. Синтез 1-О-алкил-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфорилэтанололаминов (холинов).— *Биоорганическая химия*, 1976, т. 2, № 1, с. 78–81.

Поступила в редакцию
29.VII.1980

POLYMORPHIC TRANSFORMATIONS IN NONSONICATED AQUEOUS DISPERSIONS OF ETHER AND ESTER PHOSPHATIDYLETHANOLAMINES

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

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

Polymorphic transformations of nonsonicated aqueous dispersions of phosphatidylethanolamines belonging to the acyl, alkyl and aldehydogenic types were studied by ^{31}P NMR spectroscopy. Increase in temperature induced a transition from the lamellar into hexagonal phase. The temperature range of the bilayer-hexagonal phase transition was determined, as were the pH effects upon this transformation. The results obtained were discussed in terms of changes in a dynamic volume of phospholipid molecules.