



УДК 577.352.339:543.51

**ИЗУЧЕНИЕ ЛИПИД-ЛИПИДНЫХ И ЛИПИД-БЕЛКОВЫХ  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В МЕМБРАНАХ С ПРИМЕНЕНИЕМ  
ФОСФОЛИПИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФОТОРЕАКТИВНЫЕ  
ГРУППИРОВКИ****4\*. ИЗУЧЕНИЕ ИЗОМЕРНОГО СОСТАВА ЛЕЦИТИН-ЛЕЦИТИНОВЫХ  
И ЛЕЦИТИН-ХОЛЕСТЕРИНОВЫХ СШИВОК В ЛИПОСОМАХ****Ушаков А. Н., Голубева Е. Е., Розынов Б. В.,  
Циренина М. Л.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва*

Изучен изомерный состав продуктов бимолекулярной сшивки азидоформилсодержащих лецитинов при их облучении УФ-светом в липосомах. Места образования ковалентных связей в пришиваемой молекуле определяли с помощью масс-спектрометрии. Наблюдаемый разброс мест введения нитрена в углеводородную цепь молекулы-акцептора позволяет тем не менее выбрать тот изомер, строение которого дает представление о наиболее вероятном взаимном расположении обеих исходных молекул в мембране. Результаты эксперимента по облучению смешанных лецитин-холестериновых липосом дают возможность судить о глубине погружения молекулы холестерина в липидный бислой.

Аналитическая часть исследования строения мембран с применением фотореактивных фосфолипидов сводится к определению местоположения ковалентных связей, образующихся при фотоиндуцированной сшивке фотомеченого фосфолипида, встроенного в мембрану, с молекулами ближайшего окружения. При изучении липид-липидных взаимодействий в мембране структурный анализ продуктов межмолекулярной сшивки удобнее всего осуществлять методом масс-спектрометрии. Однако информативность этого метода в большой мере зависит от природы используемой фотореактивной группировки. Оказалось, например, что при использовании карбеновых предшественников (трифтордiazопропионилокси-, диазиринофеноксигруппы) получить интерпретируемые масс-спектры практически невозможно [2, 3]. Чтобы все-таки составить представление о распределении мест сшивки по длине акцепторной ацильной цепи, используя масс-спектрометрический анализ, авторы этих работ были вынуждены синтезировать набор фосфатидилхолинов с жирнокислотным остатком, меченным дейтерием, последовательно изменяя положение дейтерия по длине цепи [2, 3]. Таким образом, фосфолипиды с фотореактивными группировками, генерирующими при фотолизе карбены, нельзя рекомендовать для изучения липид-липидных взаимодействий в мембране по схеме, предусматривающей последующее применение масс-спектрометрии.

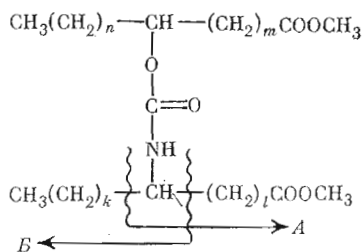
В настоящем сообщении рассмотрены возможности масс-спектрометрического анализа продуктов липид-липидной сшивки при использовании фосфатидилхолинов, несущих в качестве фотометки предшественник нитрена — азидоформильную группировку.

Липосомы, приготовленные из 1-ацил-2-(12-азидоформилостеароил)-sn-глицеро-3-фосфохолина или 1-ацил-2-(7-азидоформилостеароил)-sn-глицеро-3-фосфохолина \*\*, облучали УФ-светом. Фракцию липид-липидной сшивки выделяли из продуктов фотолиза гель-фильтрацией на сефадексе и подвергали щелочному метанолизу. Освобождающиеся при этом

\* Сообщение 3 см. [1].

\*\* Эти фосфатидилхолины синтезированы из яичного лизофосфатидилхолина и поэтому содержат в положении sn-1 в основном остатки пальмитиновой и стеариновой кислот.

фрагменты шшивок, представляющие собой две жирнокислотные цепи, соединенные группировкой  $-\text{OCONH}-$ , выделяли из продуктов метанолиза с помощью ТСХ и анализировали на хроматомасс-спектрометре. Как показано ранее [4], сравнение масс-спектров указанных фрагментов, освобождающихся при метанолизе или дейтерометанолизе облученных лецитинов, позволило выявить два ряда ионов: ряд *A*, ионы которого содержат две метоксикарбонильные группировки, и ряд *B* с одним метоксикарбониллом:



$$m=5, n=10 \text{ или } m=10, n=5; k+l=13 *$$

Вывод о том, что оба ряда ионов своим происхождением обязаны расщеплению пришитой ацильной цепи, сделан на основании анализа масс-спектра метилового эфира 12-*O*-(*N*-*n*-гексилкарбамоил)олеиновой кислоты. В масс-спектре этого соединения, близкого по строению изучаемым фрагментам липид-липидной шшивки, отсутствовали пики ионов, образованных выбросом из молекулярного иона метиленовых звеньев, принадлежащих остатку оксикислоты [4]. Наличие в анализируемом фрагменте амидного азота однозначно предопределяет пути распада молекулярного иона с равновероятным  $\alpha$ - или  $\alpha'$ -разрывом  $\text{C}-\text{C}$ -связи по отношению к углеродному атому акцепторной ацильной цепи, связанному с атомом азота. Присутствие в спектре упомянутых выше рядов гомологичных ионов свидетельствует о том, что анализируемый образец представляет собой смесь изомерных продуктов, различающихся порядковым номером углеродного атома пришитой ацильной цепи, связанного с атомом азота. Таким образом, соотношение интенсивностей ионов в пределах рядов *A* и *B* должно коррелировать с соотношением изомеров в смеси. Исключение, по-видимому, составляет первый ион ряда *B* с  $m/z$  384 (табл. 1), имеющий максимальную среди ионов этой серии интенсивность независимо от положения фотометки в цепи оксистеариновой кислоты исходного лецитина. Нельзя исключить, что этот ион, формально характеризующий количество шшивок по 15-му углеродному атому остатка пальмитиновой кислоты, является составным и отчасти образуется при фрагментации изомеров с экстремальными значениями *k* и *l* за счет двойного  $\alpha$ - и  $\alpha'$ -разрыва по отношению к углеродному атому пришитого ацильного остатка, связанному с атомом азота. Оценить вклад истинной шшивки в интенсивность этого иона или опровергнуть наше предположение о его происхождении без дополнительных исследований не представлялось возможным, поэтому ион с  $m/z$  384 был исключен из дальнейшего обсуждения.

Поскольку образование ионов рядов *A* и *B* носит конкурентный характер, правильное представление о количественном соотношении изомеров в исследуемом образце должно дать сравнение суммарных интенсивностей каждой пары ионов *A*-*B*, характеризующих индивидуальный изомер. Такие диаграммы изомерного состава липид-липидных шшивок представлены на рис. 1а, б. При фотоллизе фосфатидилхолина с фотометкой при  $\text{C}_{(12)}$  ацильной цепи *sn*-2 максимальное количество шшивок приходится на 10-12-й атомы углерода остатка пальмитиновой кислоты в положении

\* Рассматриваются масс-спектры фрагментов межмолекулярных шшивок, содержащих остаток пальмитиновой кислоты — основной кислоты положения *sn*-1 обоих фотореактивных лецитинов.

Таблица 1

Основные пики в масс-спектрах ковалентно связанных остатков оксистеариновой и пальмитиновой кислот, освобождающихся при метанолизе 1-ацил-2-(12-азидоформилоксистеариол)фосфатидилхолина (а) и 1-ацил-2-(7-азидоформилоксистеариол)фосфатидилхолина (б) после облучения УФ-светом в липосомах

$m/z$	$I_{\text{отн}}, \%$		Тип иона	$m/z$ в масс-спектре $d_3$ -аналогa
	а	б		
297	100,0	100,0	$[\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOCH}_3]^+$	300
384	25,0	40,0	В	387
398	18,5	18,0	В	401
412	20,7	20,0	В	415
426	22,0	19,3	В	429
440	19,3	20,0	В	443
454	21,3	32,0	В	457
456	—	10,6	А	462
468	17,4	22,0	В	471
470	5,3	10,6	А	476
482	12,7	36,7	В	485
484	8,0	18,0	А	490
496	11,3	19,3	В	499
498	9,4	18,6	А	504
510	7,3	15,3	В	513
512	12,0	16,7	А	518
524	4,7	16,7	В	527
526	14,0	37,9	А	532
538	—	6,0	В	541
540	14,7	23,3	А	546
552	—	8,0	В	555
554	17,3	20,6	А	560
566	—	6,0	В	569
568	14,0	13,3	А	574
582	13,3	11,3	А	588
596	10,7	10,6	А	602
610	2,0	2,0	А	616
624	2,0	2,0	$[M-1]^+$	630

$sn-1$  пришитой молекулы лецитина. Иначе распределяются изомерные продукты сшивки молекул фосфатидилхолина с фотометкой при  $\text{C}_{(7)}$  в той же цепи: здесь наиболее частым является внедрение в акцепторную цепь при 8–10-м атомах углерода.

Разный характер распределения мест сшивок в  $sn-1$  ацильной цепи относительно атома углерода цепи  $sn-2$ , связанного с азидоформильной группировкой, обусловлен, по-видимому, разным пространственным расположением фотореактивной группировки при четных и нечетных (12 и

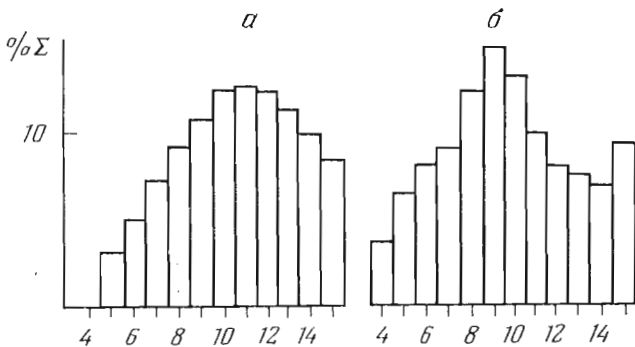


Рис. 1. Изомерный состав межмолекулярных сшивок, полученных при фотоллизе 1-ацил-2-(12-азидоформилоксистеариол)лецитина (а) и 1-ацил-2-(7-азидоформилоксистеариол)лецитина (б). По оси абсцисс отложены порядковые номера углеродных атомов остатка пальмитиновой кислоты, участвующих в образовании фотоиндуцированной ковалентной связи, по оси ординат — суммарные интенсивности ионов (А+В), характеризующих индивидуальный изомер

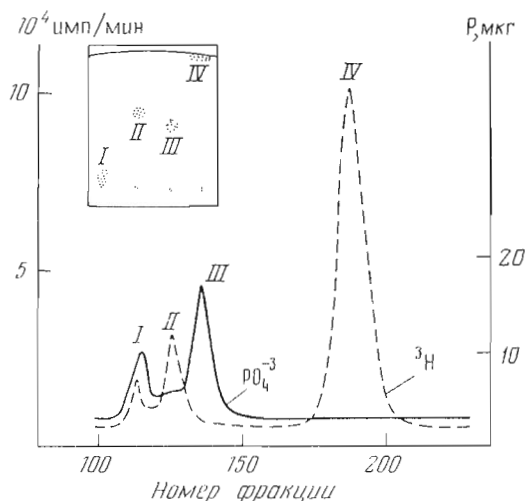


Рис. 2. Разделение продуктов фотоллиза 1-(12-азидоформилфосфолипид)-2-пальмитойллецитина в липосомах с  $[^3\text{H}]$ холестерином на колонке с сефадексом LH-20 (см. «Экспериментальную часть»). Сплошная линия — содержание фосфора в элюате, пунктирная линия — радиоактивность. Вставка — ТСХ фракций на силуфол в системе  $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH} - \text{вода}$ , 65 : 25 : 4, обнаружение обугливанием с  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

7) атомах углерода несущей ацильной цепи. Более выраженный максимум на графике на рис. 1б, по всей вероятности, является следствием меньшей подвижности участка ацильной цепи, расположенного ближе к полярной головке фосфолипида. Напротив, большая подвижность алкильного конца цепи в мембранной системе может служить объяснением более пологой формы графика на рис. 1а. В обоих рассмотренных случаях интервал акцентной ацильной цепи, подвергавшийся атаке нитреновым радикалом, составлял 10 атомов углерода.

Интересно, что этот интервал практически не зависит от размещения фотометки в ацильной цепи фотореактивного лецитина: в экспериментах по фотолизу фосфатидилхолинов, содержащих фотометку в  $\omega$ -положении ацильной цепи *sn*-2, он был такой же [2]. Имеющийся разброс мест сшивок позволяет тем не менее сделать выбор того изомера, строение которого дает возможность судить о наиболее вероятном взаимном расположении обеих исходных молекул в липидном бислое.

Свойство молекул  $\text{ROCONHR}'$  давать под электронным ударом характеристические для определения мест сшивки ионы делает азидоформилсодержащие фосфолипиды удобным инструментом для изучения гидрофобных липид-липидных взаимодействий в мембране. В плане этих исследований большой интерес представляет изучение фосфолипид-холестериновых взаимодействий. За последнее время на эту тему опубликовано много работ (выполненных в основном с применением методов ЯМР-спектроскопии), однако четкое представление о размещении молекулы холестерина в фосфолипидном бислое до сих пор отсутствует [5].

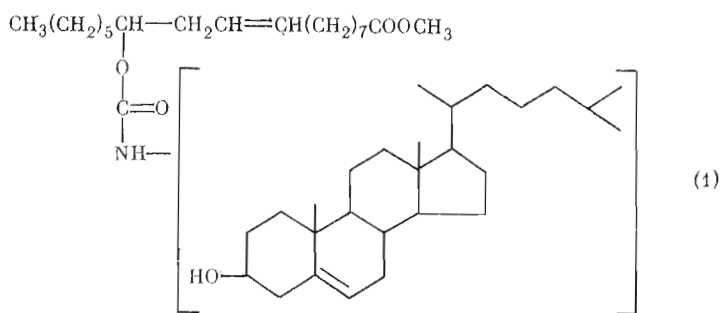
Первый опыт использования фотореактивных фосфолипидов для определения ориентации холестерина в бислое был успешным лишь отчасти [6]. Авторы, хотя и показали наличие бимолекулярного продукта лецитин-холестерин в продуктах облучения УФ-светом смешанных липосом, не смогли сделать выводов о местах образования ковалентных связей в молекуле холестерина и, следовательно, о ее ориентации в бислое. В этой работе в качестве фотореактивных фосфолипидов были использованы лецитины с карбеновыми предшественниками — диазиринофеноксими трифтордиазпропионилсигруппами [6].

Мы попытались решить эту задачу, используя азидоформилсодержащий фосфатидилхолин.

Продукты фотоллиза липосом, приготовленных из 1-(12-азидоформил-оксидолеил)-2-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина и [ $^3\text{H}$ ]холестерина в молярном соотношении 2:1, фракционировали на колонке с сефадексом LH-20 (рис. 2), полученные фракции анализировали с помощью ТСХ. Фракция IV содержала интактный холестерин, фракция II — предполагаемый продукт сшивки холестерина с лецитином, фракция III — оставшийся мономерным лецитин, фракция I — по-видимому, в основном продукты сшивки лецитин—лецитин и лецитин—лецитин—холестерин.

Предполагаемый продукт сшивки лецитина с холестерином (фракцию II) подвергали щелочному метанолизу (дейтерометанолизу). Липофильные продукты метанолиза анализировали методом масс-спектрометрии.

При метанолизе продукта сшивки холестерина с азидоформилсодержащим фосфатидилхолином должно освобождаться характерное соединение (1) с молекулярным весом 739:



Действительно, в масс-спектре продуктов метанолиза фракции II в области молекулярного иона имеется достаточно интенсивный пик иона с  $m/z$  740 [ $M+1$ ] $^+$  и ион с  $m/z$  722 [ $M+1-18$ ] $^+$ , образующийся при потере воды холестериновой частью молекулы (рис. 3а). В масс-спектре имеются также интенсивные пики ионов, характеризующих как холестеринную часть молекулы ( $m/z$  384, 367, 273, 255, 213) [7], так и ее ацильную часть (RCO с  $m/z$  263 и RCOOCH<sub>3</sub> с  $m/z$  294, R=C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>). Природа вещества фракции II была дополнительно подтверждена результатами масс-спектрометрического анализа продуктов ее дейтерометанолиза

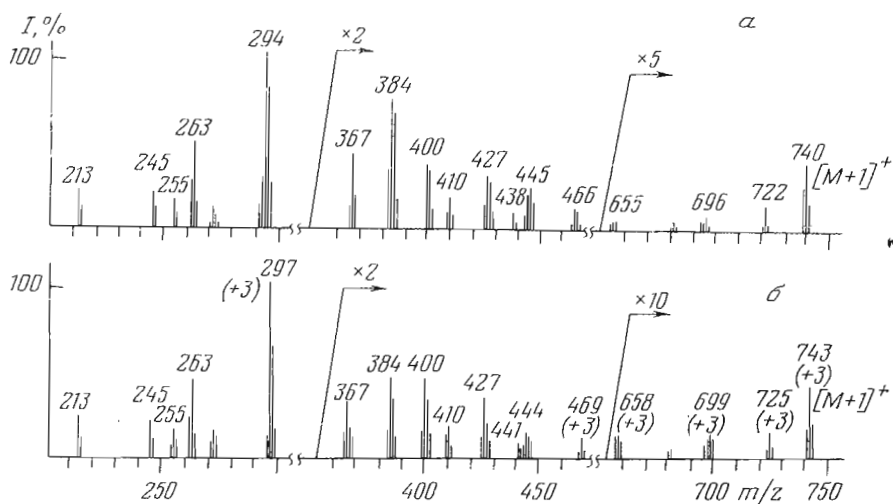
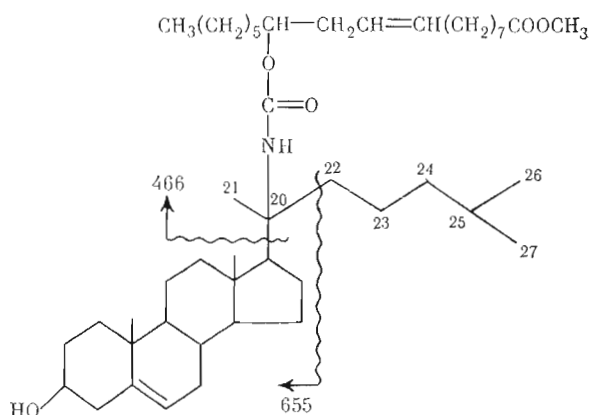


Рис. 3. Масс-спектры продуктов сшивки холестерин — фотомеченый фосфатидилхолин, освобождающихся при: а — метанолизе продукта сшивки холестерин — фосфатидилхолин; б — дейтерометанолизе того же продукта. Цифры в скобках в спектре (б) означают величины сдвига в массовых числах ионов по сравнению с аналогичными ионами в масс-спектре (а)

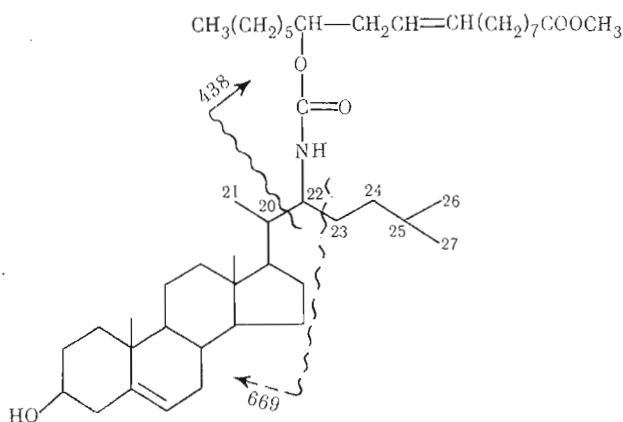
(рис. 3б): массовые числа ионов, содержащих остаток жирной кислоты, увеличились на 3 единицы.

Интересно, что в масс-спектре продукта (1) полностью отсутствует характерный для фрагментации молекулы свободного холестерина ион  $[M-113]^+$ , образующийся при потере молекулярным ионом алкильной цепи  $C_{(20)}-C_{(27)}$  [7]. Это обстоятельство позволяет предположить, что сшивка произошла главным образом с алкильной цепью молекулы холестерина. В пользу такого предположения убедительно свидетельствует наличие в масс-спектре на рис. 3а достаточно интенсивных пиков ионов с  $m/z$  438, 466 и 655. Исходя из рассмотренной выше закономерности распада веществ типа  $ROCONHR'$ , позволяющей охарактеризовать каждый изомерный продукт фотолиза парой ионов, можно утверждать, что ион с  $m/z$  466 (для  $d_3$ -аналога  $m/z$  469 — рис. 3б) принадлежит продукту сшивки ацильной цепи с 20-м атомом углерода холестерина. Этому же изомеру принадлежит ион с  $m/z$  655 (658), образовавшийся при потере молекулярным ионом фрагмента  $C_6H_{13}(C_{(22)}-C_{(27)})$ :



Как и следовало ожидать, интенсивность иона с  $m/z$  655 (658 для  $d_3$ -аналога — рис. 3б) во много раз меньше интенсивности парного ему иона с  $m/z$  466 (469), образованного выбросом массивного холестеринового ядра при разрыве связи  $C_{(17)}-C_{(20)}$ .

Ион с  $m/z$  438 (441), скорее всего, образуется при разрыве связи  $C_{(22)}-C_{(20)}$  и принадлежит продукту сшивки с  $C_{(22)}$  холестерина. Второй вариант фрагментации этого продукта, т. е. разрыв связи  $C_{(22)}-C_{(23)}$ , по-видимому, энергетически невыгоден: ион с  $m/z$  669 (672) практически отсутствует.



Ион с  $m/z$  410 (рис. 3а) по аналогии с упомянутыми выше ионами с  $m/z$  466 и 438 (рис. 3а) можно было бы считать принадлежащим продукту

Основные пики в масс-спектрах ковалентно связанных остатков 12-оксиполеиновой и пальмитиновой кислот, освобождающихся при метанолизе продуктов фотолиза липосом, приготовленных из смеси 1-(12-азидоформилоксиолеонил)-2-пальмитонилфосфатидилхолина и холестерина

$m/z$	$I_{\text{отн.}} \%$	Тип иона	$m/z$ в масс-спектре $d_3$ -аналога
294	100,0	$C_{17}H_{31}COOCH_3$	297
295	51,0	$C_{17}H_{32}COOCH_3$	298
382	27,2	<i>B</i>	385
396	18,8	<i>B</i>	399
410	26,1	<i>B</i>	413
424	30,1	<i>B</i>	427
426	6,3	<i>A</i>	432
438	24,2	<i>B</i>	441
440	7,0	<i>A</i>	446
452	29,0	<i>B</i>	455
454	9,3	<i>A</i>	460
466	21,5	<i>B</i>	469
468	7,0	<i>A</i>	474
480	25,2	<i>B</i>	483
482	12,4	<i>A</i>	488
494	20,3	<i>B</i>	497
496	10,2	<i>A</i>	502
508	13,2	<i>B</i>	511
510	10,3	<i>A</i>	516
522	15,0	<i>B</i>	525
524	19,1	<i>A</i>	530
536	15,0	<i>B</i>	539
538	10,0	<i>A</i>	544
550	9,3	<i>B</i>	553
552	13,4	<i>A</i>	558
564	3,0	<i>B</i>	567
566	6,1	<i>A</i>	572
580	3,2	<i>A</i>	586
594	2,4	<i>A</i>	600
623	7,5	$M^+$	629

сшивки с  $C_{(24)}$  холестерина (разрыв связи  $C_{(23)}-C_{(24)}$ ). Однако ион с  $m/z$  410 в масс-спектре дейтерированного образца не меняет своего массового числа (рис. 3б), т. е. имеет другую природу и не характеризует рассматриваемый изомер.

При отсутствии разрыва связи  $C_{(23)}-C_{(24)}$  происхождение иона с  $m/z$  696 (699 для  $d_3$ -аналога — рис. 3б) нельзя объяснить разрывом  $C_{(24)}-C_{(25)}$ . Скорее всего он образован выбросом из ацильного остатка молекулы (1) пропильной группы [8], т. е. тоже не свидетельствует в пользу существования продукта сшивки с  $C_{(24)}$  холестерина.

Ионы с  $m/z$  400–401, 409–410, 427–428 и 444–445, интенсивные в обоих спектрах (рис. 3а, б), соответствуют фрагментам  $NH$ -холестерин,  $-OSNH$ -холестерин,  $-OSONH$ -холестерин и продуктам отщепления от них элементов воды и не являются характеристическими для определения мест сшивки.

Таким образом, масс-спектр соединения (1) не содержит ионов, строение которых дало бы повод утверждать, что сшивка хотя бы частично прошла в кольца молекулы холестерина. Из результатов анализа следует, что основное количество продукта сшивки представлено изомерами фосфатидилхолин- $OSONH$ -холестерин, в которых атом азота ковалентно связан с атомами  $C_{(20)}$  и  $C_{(22)}$  алкильной цепи холестерина.

Чтобы оценить глубину погружения молекулы холестерина в липидный бислой, необходимо соотнести 20-й и 22-й атомы холестерина с теми углеродными атомами ацильных цепей лецитина, которые с наибольшей вероятностью подвергаются атаке нитреном при фотолизе. Как следует из масс-спектрометрического анализа продуктов метанолиза лецитин-лецитиновой сшивки (фракция I, рис. 2), такими атомами являются 9-й

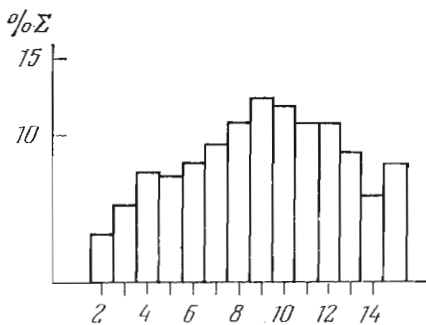


Рис. 4. Изомерный состав лецитин-лецитиновых смесей, полученных при облучении смешанных 1-(12-азидоформилоксиолеоил)-2-пальмитоиллецитин-холестериновых липосом. Остальные обозначения см. в подписи к рис. 1

и 10-й атомы углерода ацильной цепи *sn*-2 1-(12-азидоформилоксиолеоил)-2-пальмитоиллецитина (рис. 4) (см. также табл. 2).

Таким образом, можно заключить, что в условиях эксперимента  $C_{(20)}$  и  $C_{(22)}$  молекулы холестерина находятся в бислое на одной глубине с  $C_{(9)}$  и  $C_{(10)}$  цепи *sn*-2 лецитина. При условии параллельного расположения молекулы холестерина ацильными цепям фосфатидилхолина и с учетом изогнутой конформации начального участка цепи *sn*-2 [9] 3 $\beta$ -ОН-группа холестерина должна быть примерно на 3 Å ближе к поверхности раздела фаз, чем  $C_{(1)}$  цепи *sn*-2. Атом  $C_{(1)}$  цепи *sn*-1 должен быть удален от 3 $\beta$ -ОН-группы на еще большее расстояние [9]. Следовательно, можно предположить, что в смешанных холестерин-лецитиновых липосомах молекула холестерина ориентирована таким образом, что ее оксигруппа оказывается локализованной вблизи фосфатной группы молекулы фосфатидилхолина и не может образовывать водородной связи с карбонильным кислородом сложноэфирных группировок фосфатидилхолина, как это предполагается в работах [10, 11]. Более полное представление о топографии лецитин-холестериновой мембраны можно будет получить из сопоставления результатов экспериментов с использованием фотореактивных фосфатидилхолинов, различающихся положением фотометки в ацильной цепи.

### Экспериментальная часть

1-Ацил (12-азидоформилоксистеароил)-, 1-ацил-2-(7-азидоформилоксистеароил)- и 1-(12-азидоформилоксиолеоил)-2-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин были синтезированы как описано ранее [12]. 7-[ $^3\text{H}$ ]Холестерин (10 Ки/моль, «Изотоп», СССР) был разбавлен нерадиоактивным холестерином до удельной активности 0,4 Ки/моль.

**Приготовление липосом.** 7–8 мг фотореактивного фосфатидилхолина или его смеси с [ $^3\text{H}$ ]холестерином в мольном соотношении 2:1 упаривали досуха из эфирного раствора. К остатку добавляли 7 мл 0,05 М трис-НСI-буфера (рН 7,9). Смесь выдерживали 20 мин при 50°С при слабом перемешивании, обрабатывали ультразвуком (прибор УЗДН-1) при той же температуре 4 или 25 мин соответственно и подвергали облучению УФ-светом.

**Фотолиз** проводили в атмосфере аргона в кварцевой кювете, представляющей собой два коаксиальных цилиндра с зазором между стенками около 1 мм и объемом 10 мл, куда помещали облучаемую смесь. Источник УФ-света — ртутная лампа низкого давления БУВ-15 ( $\lambda_{\text{макс}}$  254 нм), размещенная внутри кюветы. Длительность фотолиза 45 мин, температура раствора 22°С.

**Обработка продуктов фотолиза.** К облученной дисперсии добавляли смесь хлороформа с метанолом до получения соотношения хлороформ — метанол — вода, 8:4:3. Слои разделяли, хлороформный слой упаривали досуха. Остаток растворяли в 1 мл смеси хлороформ — метанол, 1:1, и фракционировали на сефадексе LH-20.

**Разделение продуктов фотолиза.** На колонку с сефадексом LH-20 (100×1,5 см) наносили раствор продуктов фотолиза. Колонку промывали



смесью хлороформа с метанолом, 1 : 1, со скоростью 12 мл/ч. Объем отбираемых фракций 0,5 мл. Содержание фосфора во фракциях определяли по методу [13]. Радиоактивность фракций измеряли на сцинтилляционном счетчике Mark II (Nuclear Chicago, США).

*Метанолиз продуктов шивки.* Продукты шивки, выделенные гель-фильтрацией на сефадексе, обрабатывали 30 мин при 40°С 1 мл 0,1 н. КОН в 98% водном метаноле или дейтерометаноле. Реакционную смесь нейтрализовали 0,1 мл этилформата и распределяли в системе хлороформ — метанол — вода, 8 : 4 : 3. Хлороформный слой упаривали. Остаток разделяли препаративной ТСХ на пластинке (9×12 см) с силикагелем КСК (более 150 меш, толщина слоя 0,5 мм) в системе гексан — эфир — уксусная кислота, 85 : 15 : 1. Хроматограмму обрабатывали парами воды. Зону с *R<sub>f</sub>* 0,25 элюировали смесью хлороформа с метанолом, 2 : 1. Выделенную фракцию анализировали методом масс-спектрометрии.

*Масс-спектрометрический анализ* липофильных фрагментов продуктов фотолиза проводили на хроматомасс-спектрометре LKB-9000 (Швеция) с использованием колонки (1000×2 мм) с 2% JXR при программировании температуры от 180 до 280°С (5 град/мин) или без нее, с прямым вводом образца в источник. Температура молекулярного сепаратора при работе с колонкой 280°С, энергия ионизирующих электронов 70 эВ. Спектры снимали также на масс-спектрометре MAT-44S (Varian, ФРГ) при ионизирующем напряжении 70 эВ, температуре источника 200°С и температуре испарителя 270°С.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Циренина М. Л., Ушаков А. Н. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 8, с. 1248–1253.
2. Gupta C. M., Costello C. E., Khorana H. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 7, p. 3139–3143.
3. Radhakrishnan R., Costello C. E., Khorana H. G. J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 14, p. 3990–3997.
4. Вавер В. А., Ушаков А. Н., Циренина М. Л. Биорган. химия, 1979, т. 5, № 10, с. 1520–1530.
5. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. М.: Наука, 1981, с. 180–181.
6. Gerber G. E., Radhakrishnan R., Gupta Ch. M., Khorana H. G. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 640, p. 646–654.
7. Morisaki N., Ikekawa N. Org. Chem. Jap., 1973, v. 31, № 7, p. 573–583.
8. Будзикович Г., Джерасси К., Уильямс Д. Интерпретация масс-спектров органических соединений. М.: Мир, 1966, с. 30.
9. Hauser H., Pascher I., Pearson R. H., Sundell S. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 650, p. 21–51.
10. Brockerhoff H. Lipids, 1974, v. 9, № 9, p. 645–650.
11. Huang C. H. Lipids, 1977, v. 12, № 4, p. 348–356.
12. Циренина М. Л., Симонова Т. Н., Голубева Е. Е., Колтовая Н. А., Ушаков А. Н. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 8, с. 1238–1247.
13. Gerlach E., Deuticke B. Biochem. Z., 1963, B. 337, № 4, S. 477–479.

Поступила в редакцию

12.X.1982

После доработки

3.XII.1982

#### STUDIES ON LIPID-LIPID AND LIPID-PROTEIN INTERACTIONS IN MEMBRANES USING PHOSPHOLIPIDS CONTAINING PHOTOACTIVABLE GROUPS.

##### 4. DETERMINATION OF ISOMERIC COMPOSITION OF LECITHIN-LECITHIN AND LECITHIN-CHOLESTEROL CROSSLINKED PRODUCTS IN LIPOSOMES

USHAKOV A. N., GOLUBEVA E. E., ROZYNOV B. V., TSYRENINA M. L.

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

Isomeric composition of products of bimolecular crosslinking formed by UV-irradiation of azidoformyllecithin in liposomes has been studied. The sites of crosslinking were determined with the aid of mass spectrometry. The variations in the site of nitrene insertion into the acceptor hydrocarbon chain allow to distinguish that isomer whose structure is indicative of mutual disposition of the two initial molecules in the membrane. Irradiation of the lecithin — cholesterol mixed vesicles provided information on the cholesterol orientation in the lipid bilayer.