



УДК 547.292.94:547.781.3:577.334

ЗАРЯЖЕННЫЕ ЛИПИДНЫЕ СПИНОВЫЕ ЗОНДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ИМИДАЗОЛИНОВЫЙ НИТРОКСИЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

Борин М. Л., Бедик С. А., Володарский Л. Б.,
Швец В. И.***

*Научно-исследовательский институт по биологическим испытаниям
химических соединений, Кунава Московской обл.;*

** Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР;*

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

Описан синтез серии положительно и отрицательно заряженных липидных спиновых зондов с имидазолин-N-оксильным (имоксильным) фрагментом в гидрофобной или полярной части. Показана чувствительность полученных соединений к изменениям потенциала поверхности мембраны.

Липидные спиновые зонды широко используются при решении различных задач в мембранологии [1, 2]. В последнее время наряду с нейтральными спиновыми зондами (спин-меченые жирные кислоты, стероиды и т. п.) все большее применение получают амфифильные липидные спиновые зонды, несущие на полярном конце положительный или отрицательный заряд [3–9]. Такие зонды чувствительны к изменению поверхностного заряда мембраны и могут быть полезны при изучении с помощью метода ЭПР липид-белковых взаимодействий [4, 5], воздействия на мембрану неорганических ионов и заряженных лекарственных средств [6, 7], при определении потенциала поверхности мембраны и плотности зарядов на ней [3, 8, 9]. Преимущества метода ЭПР — большая чувствительность, позволяющая использовать лишь несколько молекул зонда на везикулу; возможность проведения измерений в тех случаях, когда оптические методы неприменимы, например при большой мутности объектов или в случае фоточувствительных систем; быстрое реагирование зондов, что позволяет изучать изменение распределения зарядов во времени.

В присутствии заряженной поверхности мембраны распределение спин-меченых ионов между мембраной и водной фазой будет зависеть от локального электростатического потенциала мембраны. Вычисляя по данным спектров ЭПР коэффициент распределения, можно рассчитать мембранный потенциал [3]. Показано, что значения поверхностных потенциалов мембран, определенные при различных условиях методом ЭПР, хорошо совпадают с рассчитанными по теории Гуи — Чэпмена [3, 8, 9].

Для изучения липид-белковых взаимодействий полезным оказался набор липидных спиновых зондов, у которых различается лишь заряд полярной части молекулы (положительный, нейтральный, отрицательный), в то время как гидрофобная часть остается неизменной [4, 5]. Использование такого набора зондов позволяет избежать трудностей, связанных с возмущающим действием, оказываемым на мембрану спиновыми зондами, отличными друг от друга.

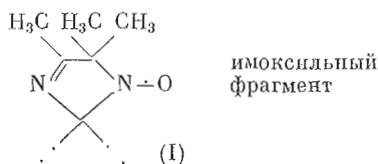
При определении локализации изменений, происходящих в мембране под действием различных агентов, в ряде случаев целесообразно использовать набор зондов с нитроксильным фрагментом, находящимся как в гидрофобной части мембраны, так и на ее поверхности [6].

В качестве положительно заряженных зондов для изучения потенциалов поверхности мембран используются молекулы с четвертичным атомом азота; их полярная группа располагается на поверхности мембраны,

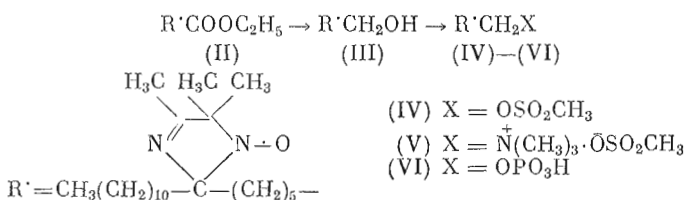
не проникая внутрь [3–9]. В качестве отрицательно заряженных зондов применялись фосфат-, сульфат- и карбоксилат-анионы [3], однако, как показано в работах [8, 10], использование последних нежелательно, так как карбоксильная группа не полностью ионизирована в мембране и в результате зонд дает два типа сигналов.

Для проведения работ по изучению потенциалов модельных и природных мембран, а также липопротеидных комплексов нами осуществлен синтез ряда заряженных липидных спиновых зондов с нитроксильным фрагментом, находящимся как в их гидрофобной, так и в полярной части вещества. Синтез планировали на основе наших предыдущих работ по получению производных жирных кислот и фосфолипидов с имидазолиновым нитроксильным фрагментом [11, 12]. Наличие в этом фрагменте иминного атома азота дает возможность осуществлять его дальнейшую модификацию. Ранее нами было показано [11, 13], что обработка имидазолин-1-оксидов диметилсульфатом приводит к соответствующим парамагнитным имидазолиниевым солям. Поэтому положительно заряженные зонды с меткой в полярной части молекулы мы получали в виде имидазолиниевых солей (XII), (XIII), а в качестве зондов с меткой в гидрофобной части молекулы синтезировали четвертичную соль (V) и фосфат (VI).

Для упрощения терминологии мы предлагаем для обозначения 4,5,5-триметил- Δ^3 -имидазолин-1-оксильного фрагмента (I) использовать термин «имоксил»*:



В качестве исходного соединения в синтезе зондов (V), (VI) был использован ранее полученный этиловый эфир 7-имоксилстеариновой кислоты (II) [11]:

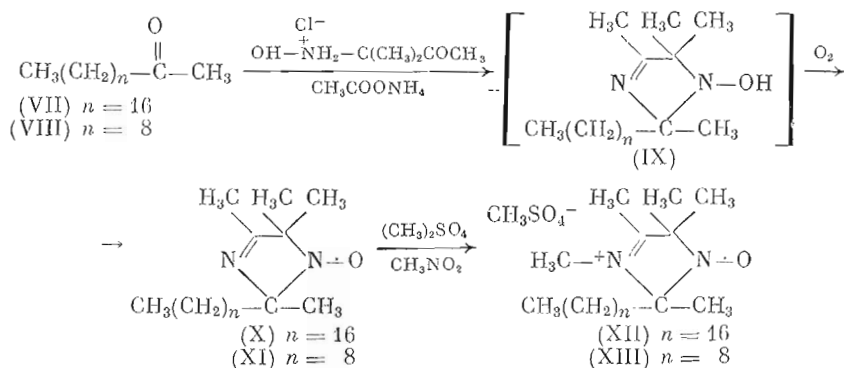


Спин-меченый спирт (III) получали алюмогидридным восстановлением сложного эфира (II); высокий выход спирта (III) свидетельствует об устойчивости имоксильного фрагмента к действию LiAlH₄. Полученный из спирта (III) мезилат (IV) при нагревании с избытком триметиламина образовал триметиламмониевую соль (V).

В работе [5] была описана попытка фосфорилирования хлорокисью фосфора спин-меченого спирта с 1,3-оксазолидиновым (доксильным) нитроксильным фрагментом. Из-за кислотоллабильности доксильного фрагмента полученный фосфат оказался неустойчивым и быстро разложился; его спектр ЭПР был зарегистрирован лишь в момент получения. Одно из преимуществ имоксильного фрагмента по сравнению с доксильным — его устойчивость при низких значениях pH [13]. Это позволяло ожидать устойчивости фосфата (VI); он был получен нами из спирта (III) с высоким выходом действием POCl₃ в эфире. Интенсивность сигнала ЭПР этанольного раствора фосфата (VI) не изменялась в течение 1 мес, что говорит об устойчивости полученного соединения.

* По аналогии с общепринятыми названиями нитроксильных фрагментов «доксильный», «проксильный», «азетоксильный» [14].

Имидазолиниевые соли (XII), (XIII) синтезировали по схеме



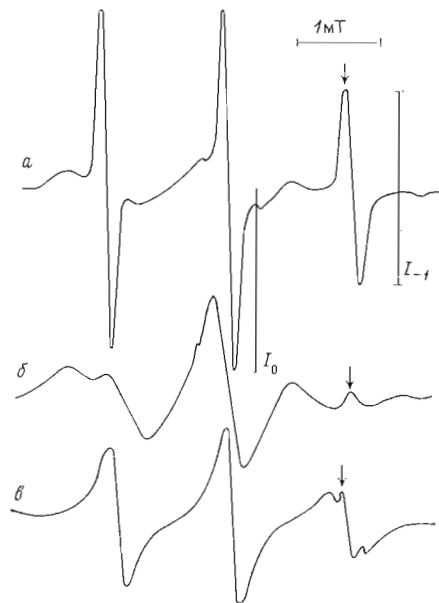
Радикалы (X), (XI) получали ранее описанным способом [11]: конденсацией соответствующих метилкетонов (VII), (VIII) с хлоргидратом 3-гидроксиламино-3-метилбутан-2-она и ацетатом аммония с последующим окислением. Если раньше при этом для окисления промежуточного гидроксиламина (IX) мы использовали PbO_2 [11], то в данном случае окисление проводили длительным нагреванием исходной реакционной смеси в присутствии кислорода воздуха.

Имидазолиниевые соли (XII), (XIII) получали обработкой соответствующих радикалов диметилсульфатом в нитрометане. Спектр ЭПР водных растворов соли (XII) представлял собой уширенный синглет, свидетельствующий о ее агрегации из-за малой растворимости в воде. Только после инкубации соли (XII) с фосфатидилхолиновыми липосомами спектр приобретал характерную триплетную структуру. Таким образом, это соединение может быть использовано в качестве заряженного липидного зонда с нитроксильным фрагментом в полярной области мембраны. Однако для определения потенциала поверхности мембраны оно неприменимо, так как невозможно определить коэффициент его распределения между водной фазой и мембраной. Поэтому в дальнейшем мы получили более гидрофильную соль (XIII).

ИК-спектры полученных соединений соответствовали предложенным для них структурам: соединения с имоксильным фрагментом имели полосу поглощения связи $\text{C}=\text{N}$ при 1645 см^{-1} ; у имидазолиниевых солей эта полоса смещалась к 1670 см^{-1} . Радикальную чистоту полученных соединений контролировали сравнением интенсивности линий их спектров ЭПР со спектром чистого нитроксильного радикала (II) с известным содержанием спин/моль. Спектры ЭПР растворов соединений (III)–(VI), (X)–(XIII) (10 мМ в этаноле) представляли собой характерные для нитроксильных радикалов триплеты с $a_N 1,42\text{--}1,46 \text{ мТ}$.

Нами было изучено встраивание полученных соединений в фосфатидилхолиновые липосомы. Заряд липосом варьировали добавлением фосфатидной кислоты (0–20%). В качестве примера на рисунке приведены спектры ЭПР зондов (V), (XIII) в суспензии липосом. Каждый спектр представляет собой суперпозицию спектров встроившегося и свободного зондов. Изменение распределения зонда оценивали по параметру распределения I_{-1}/I_0 [9], где I_{-1} – амплитуда высокопольной компоненты от спектра свободного зонда (пропорциональна количеству свободного зонда), I_0 – нижняя половина амплитуды центральной компоненты спектра (пропорциональна суммарному количеству встроившегося и свободного зонда) (таблица).

С увеличением соотношения фосфатидилхолия – зонд доли встроившегося зонда увеличивается. При добавлении в липосомы фосфатидной кислоты резко уменьшается количество свободного положительно заряженного зонда (V), (XIII), в то же время количество свободного отрицательно заряженного зонда (VI) увеличивается. Определив из спектров ЭПР параметр I_{-1}/I_0 , можно рассчитать потенциал поверхности мембраны [3, 9].



Спектры ЭПР зондов в суспензии липосом в буфере трис-НСI (рН 7,4): *a* — зонд (V) в суспензии липосом из фосфатидилхолина ($2 \cdot 10^{-3}$ М); *b* — то же с добавкой 10% фосфатидной кислоты; *c* — зонд (XIII) в суспензии липосом из фосфатидилхолина ($1 \cdot 10^{-3}$ М). Концентрация зондов $2,4 \cdot 10^{-4}$ М. Стрелкой указано положение высокопольной компоненты сигнала свободного зонда

Полученная серия липидных спиновых зондов помимо определения потенциала мембраны в различном сочетании может быть использована для решения разнообразных биофизических задач. Так, совокупность зондов (III), (V), (VI) позволяет изучать липид-белковые взаимодействия [4, 5]; зондов, различающихся как положением нитроксильного фрагмента, так и зарядом, (V), (XII), (XIII) или (II), (III) и (X), (XI), — уточнить локализацию возмущающего действия различных агентов на мембрану [6]; сочетание заряженных зондов (V), (VI), (XII), (XIII) и их нейтральных аналогов (II), (III), (X), (XI) дает возможность различать характер процессов (связанных или не связанных с взаимодействием зарядов), происходящих на поверхности мембраны [3].

Экспериментальная часть

ИК-спектры снимали на спектрометре Perkin — Elmer 257 (США) в пленке или вазелиновом масле, спектры ПМР — на приборе Bruker WM-250 с внутренним стандартом гексаметилдисилазаном. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре Varian E-4 (США) при амплитуде модуляции 0,1–0,2 мТ, частоте 100 кГц, развертке магнитного поля 2,5 Гс/мин при постоянной времени 0,3–1 с; поступающая в резонатор мощность 10 мВт.

Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L40/100, препаративную ТСХ — на стеклянных пластинках (20×20 см) с силикагелем, а ТСХ — на силуфоле (ЧССР). Для ТСХ использовали системы: хлороформ — метанол — ацетон, 10 : 0,5 : 0,5 (А), хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (Б), хлороформ — метанол, 3 : 1 (В), эфир — петролейный эфир, 1 : 1 (Г). Обнаружение осуществляли парами иода, соединение (V) обнаруживали также реактивом Драгендорфа, соединение (VI) — реактивом на фосфорорганические соединения [15].

Использовали метилгептадецилкетон фирмы Fluka (Швейцария), метилнонилкетон получали по методике [16].

Значения параметра распределения I_{-1}/I_0 спиновых зондов в суспензии липосом, приготовленных из смеси фосфатидилхолина и фосфатидной кислоты (концентрация зондов 10^{-4} М) *

Зонд	Количество фосфатидной кислоты в липосомах, %	Общая концентрация липидов, 10^{-3} М	I_{-1}/I_0
(V)	0	2	1,16
	0	10	1,06
	0	20	0,57
	10	2	0,79
	10	10	0,04
	20	2	0,42
(VI)	0	10	0,84
	10	10	0,87
	20	10	0,90
(XIII)	0	0,6	1,07
	10	0,6	0,09

* Приготовление липосом и образцов — см. «Экспериментальную часть».

Все синтезированные вещества имели удовлетворительный элементный анализ; хроматографически очищенные вещества были, по данным ТСХ, гомогенными.

Для получения липосом использовали яичный фосфатидилхолин отечественного производства и фосфатидную кислоту (Sigma, США). Раствор фосфолипидов в этаноле упаривали, добавляли 5 мМ буфер трис-HCl, pH 7,4, и озвучивали образцы 5 мин при 0°C на дезынтеграторе УЗДН-2 в атмосфере азота. К полученным суспензиям липосом добавляли спиновый зонд в виде 10 мМ раствора в этаноле.

7-Имоксилоткадеканол (III). В атмосфере азота к 513 мг этилового эфира 7-имоксилстеариновой кислоты (II) в 10 мл сухого свежеперегнанного над LiAlH_4 тетрагидрофурана добавляли суспензию 41 мг LiAlH_4 в 4 мл тетрагидрофурана при охлаждении льдом и перемешивании. Смесь перемешивали 1 ч при 0°C , осторожно гидролизовали 5 мл 10% раствора NH_4Cl . Органический слой отделяли, сушили Na_2SO_4 и упаривали, колоночной хроматографией остатка в хлороформе выделяли (собирали единственную окрашенную фракцию) 445 мг (94%) соединения (III) в виде темно-желтого масла; R_f 0,3(A). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3400–3100 (ОН), 1645 (C=N). ЭПР-спектр: a_N 1,45 мТ, $5,9 \cdot 10^{23}$ спин/моль.

7-Имоксилоткадециловый эфир метансульфокислоты (IV). К смеси 170 мг спирта (III) и 0,09 мл триэтиламина в 3 мл сухого CH_2Cl_2 при перемешивании и охлаждении до -25°C добавляли 57 мкл метансульфохлорида в 1 мл CH_2Cl_2 . Смесь перемешивали без охлаждения 3 ч, промывали водой, из органического слоя колоночной хроматографией в хлороформе выделяли (первая окрашенная фракция) 173 мг (90,4%) мезилата (IV) в виде желтого масла, R_f 0,8 (A). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 1180, 1380 (S=O), 1645 (C=N). ЭПР-спектр: a_N 1,45 мТ, $5,8 \cdot 10^{23}$ спин/моль.

Метансульфонат 7-имоксилоткадецилтриметиламмония (V). В ампуле со 145 мг мезилата (IV) в 10 мл сухого тетрагидрофурана при охлаждении смесью ацетона с сухим льдом конденсировали 2–3 мл триметиламина, ампулу замораживали жидким азотом, запаивали и нагревали 3 ч при 120°C . Полученную смесь упаривали досуха, остаток растворяли в минимальном количестве CH_2Cl_2 , осаждали эфиром, осадок отделяли и хроматографировали на колонке с силикагелем. Хлороформом вымывали примесь спирта (III), а смесью хлороформ–метанол, 3:1, — соль (V) с выходом 96 мг (60,3%) в виде светло-желтого воскообразного вещества, R_f 0,1(B). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 1210–1180 (SO_3^-), 1650 (C=N). Спектр ПМР: δ 3,0–3,6 м.д. (широкий мультиплет). ЭПР-спектр: a_N 1,46 мТ, $5,8 \cdot 10^{23}$ спин/моль.

7-Имоксилоткадецилфосфат (VI). К 5 мкл POCl_3 в 1 мл сухого эфира при 0°C и интенсивном перемешивании медленно прибавляли раствор 20 мг спирта (III) и 12 мкл пиридина в 3 мл сухого эфира, смесь переме-

шивали 2 ч при 0° С, промывали охлажденной 0,05 н. HCl, эфирный раствор сушили Na₂SO₄ и упаривали досуха. Из остатка препаративной ТСХ в системе (А) выделяли (желтая полоса на старте) 21 мг фосфата (VI) с примесью соответствующего фосфодиэфира. Эту смесь хроматографировали на колонке, элюировали хлороформом, затем смесью хлороформ — метанол, 3:1. Получали 17 мг (76,3%) фосфата (VI) в виде светло-желтого воскообразного вещества, R_f 0,1 (В). ИК-спектр (ν, см⁻¹): 3500—3150 (ОН), 1650 (C=N), 1240—1210 (P=O), 1100—1030 (P—O—C и C—O—C). ЭПР-спектр: a_N 1,45 мТ, 5,7·10²³ спин/моль.

2-Имоксилнонадекан (X). Смесь 5,03 г метилгептадецилкетона (VII), 4,07 г хлоргидрата 3-гидроксиламино-3-метилбутан-2-она и 4,07 г высушенного до постоянного веса ацетата аммония в 150 мл абсолютного метанола выдерживали 5 ч при 40° С и затем кипятили 5 сут. Смесь упаривали досуха, распределяли между 150 мл хлороформа и 100 мл воды, хлороформный слой промывали насыщенным водным K₂CO₃, снова водой, сушили K₂CO₃ и упаривали. Маслообразный остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя градиентной системой петролейный эфир — эфир. Собирали окрашенную фракцию, получали 3,1 г (48,5%) радикала (X) в виде оранжевых кристаллов с т. пл. 36—38° С (пентан). ИК-спектр (ν, см⁻¹): 1645 (C=N). ЭПР-спектр: a_N 1,45 мТ, 6,01·10²³ спин/моль.

2-Имоксилундекан (XI). Из 3,01 г метилнонилкетона (VIII), 5,31 г хлоргидрата 3-гидроксиламино-3-метилбутан-2-она и 3,98 г ацетата аммония аналогично соединению (X) получали 1,99 г (43,4%) 2-имоксилундекана в виде темно-красного масла, R_f 0,3 (Г), ЭПР-спектр: a_N 1,45 мТ, 6,00·10²³ спин/моль.

Метилсульфат 2,3,4,5,5-пентаметил-2-нонил-1-оксил-Δ³ - имидазолиния (XIII). К раствору 51 мг радикала (XI) в 2 мл сухого нитрометана прибавляли 0,1 мл свежеперегнанного диметилсульфата, смесь выдерживали 8 ч, упаривали при 30 гПа, из остатка колоночной хроматографией в градиентной системе хлороформ — метанол выделяли 61,9 мг (83,1%) соли (XIII) в виде темно-желтого масла, R_f 0,25 (В). ИК-спектр (ν, см⁻¹): 1670 (C=N⁺). ЭПР-спектр: 1,42 мТ, 6,02·10²³ спин/моль.

Метилсульфат 2,3,4,5,5-пентаметил-2-нонадецил-1-оксил-Δ³ - имидазолиния (XII). К 75 мг 2-имоксилнонадекана (X) в 3 мл сухого нитрометана прибавляли 0,13 мл свежеперегнанного диметилсульфата, смесь выдерживали 5 ч, упаривали при 30 гПа, к остатку добавляли эфир и выпавшую соль (XII) отфильтровывали. Выход 82 мг (74,5%), т. пл. 102—104° С (эфир — гексан). ИК-спектр: 1670 см⁻¹ (C=N⁺). ЭПР-спектр: a_N 1,44 мТ, 5,95·10²³ спин/моль.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории биофизических основ патологии мембран ЦНИЛ 2-го МОЛГМИ им. Н. И. Пирогова и проф. К. Арнольду (Лейпцигский университет) за снятие спектров ЭПР и участие в обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берлинер Л. Метод спиновых меток: Теория и приложения. М.: Мир, 1979.
2. Жданов Р. И. Парамагнитные модели биологически активных соединений. М.: Наука, 1981.
3. Cafiso D. S., Hubbell W. L. Annu. Rev. Biophys. Bioenerg., 1981, v. 10, p. 214—244.
4. Brothertus J. R., Jost P. C., Griffith O. H., Keana J. F. W., Hokin L. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 1, p. 272—276.
5. Keana J. F. W., Boyd S. A., McMillan D. A., Bernard E. M., Jost P. C. Chem. Phys. Lipids, 1982, v. 31, № 4, p. 339—349.
6. Hubbell W. L., Metcalfe J. C., Metcalfe S. M., McConnell H. M. Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 219, № 1, p. 415—427.
7. Eriksson L. E., Westman J. Biophys. Chem., 1981, v. 13, № 1, p. 253—264.
8. Gaffney B. J., Mich R. J. J. Amer. Chem. Soc., 1976, v. 98, № 10, p. 3044—3045.
9. Castle J. D., Hubbell W. L. Biochemistry, 1976, v. 15, № 22, p. 4818—4831.
10. Sanson A., Ptak M., Rigand J. L., Gary-Bobo C. M. Chem. Phys. Lipids, 1976, v. 17, № 4, p. 435—444.
11. Борин М. Л., Кедик С. А., Володарский Л. Б., Швецу В. И. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 2, с. 251—255.

12. Борин М. Л., Давиденко Н. Н., Швец В. И., Кедик С. А., Володарский Л. Б. Био-
орган. химия, 1984, т. 10, № 10, с. 1423-1425.
13. Volodarsky L. B., Grigor'ev I. A., Sagdeev R. Z. In: Biological magnetic resonance /
/Eds Berliner L. I., Reuben J. N. Y.—L.: Plenum Press, 1980, v. 2, p. 169-241.
14. Кеана J. F. W. Chem. Rev., 1978, v. 78, № 1, p. 37-64.
15. Новицкая Г. В. Методическое руководство по ТСХ липидов. М.: Наука, 1972,
с. 44-45.
16. Шевардина Н. И., Кочешков К. А. Методы элементоорганической химии. Цинк,
кадмий. М.: Химия, 1964.

Поступила в редакцию
19.IV.1984

CHARGED LIPID SPIN PROBES COMPRISING AN IMIDAZOLINE NITROXYL FRAGMENT

BORIN M. L., KEDIK S. A., VOLODARSKY L. B.*, SHVETS V. I.**

Research Institute for Biological Testing of Chemical Compounds, Kupavna;

** Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch*

of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk;

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

The synthesis of a series of charged lipid spin probes with imidazoline-N-oxyl (imo-
xyl) fragment situated in either hydrophobic or polar part of the molecule has been
carried out. The sensitivity of these spin labels to the changes in the surface potential
of the membrane has been demonstrated.