



УДК 547.953.2'672.7.057

## ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЛИПИДНЫЕ ЗОНДЫ С ПЕРИЛЕНИЛЬНОЙ МЕТКОЙ

© 1995 г. И. В. Гречишникова, И. И. Михалев, Юл. Г. Молотковский\*

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
Москва, 117871, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 10.05.94 г.

Описан синтез 4-(3-периленил)бутановой кислоты, а также фосфатидилхолина и сфингомиелина с остатком этой кислоты. Полученные фосфолипидные флуоресцентные зонды имеют высокий квантовый выход и значительную величину анизотропии флуоресценции в липидном бислое; предполагается использовать их для изучения мембранных систем.

*Ключевые слова:* 3-периленильные производные, мембранные зонды, фосфатидилхолин, сфингомиелин.

Ранее нами были получены флуоресцентные липиды с 3-периленильным флуорофором [1]. Эти зонды обладают рядом ценных свойств – значительным квантовым выходом, высоким молярным коэффициентом поглощения; кроме того, положение максимума флуоресценции и ее интенсивность зависят от полярности окружения (периленильная флуоресценция тушится водой), что позволяет оценивать относительное содержание воды в мембране [2]. Однако последнее свойство делает малоподходящим применение периленильных зондов в исследованиях, основанных на регистрации анизотропии флуоресценции, поскольку анизотропия периленильного флуорофора может зависеть не только от его подвижности (для оценки которой и регистрируют, как правило, анизотропию), но и от его доступности для воды (тушение флуоресценции водой предполагает сокращение времени жизни возбужденного состояния, от которого зависит анизотропия).

В то же время регистрация анизотропии флуоресценции – один из наиболее чувствительных методов в изучении мембранных процессов, в частности липид-белковых взаимодействий. Именно этим методом, с применением антривинилмеченых липидов, мы получили ряд интересных данных о строении природных мембран и ли-

попротеинов крови (см., например, обзор [3]). Антривиниловые зонды обладают хорошими флуоресцентными характеристиками – квантовый выход  $\sim 0.8$  и молярный коэффициент поглощения  $\epsilon \sim 8000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  в полосе возбуждения 368 нм [4]. Но в ряде случаев, например при исследовании мембран, содержащих значительные количества хромопротеидов, желательнее иметь зонды с флуорофором, чье возбуждение и испускание приходится на более длинноволновую область спектра.

Все это делает актуальным поиск и применение альтернативных флуорофоров для введения в липид-специфические зонды (т.е. зонды, несущие метку в полярной области и близкие по свойствам исходным липидам [3]). Такой флуорофор, как следует из сказанного выше, кроме нечувствительности к полярности окружения и хорошей химической фотоустойчивости, должен обладать высоким молярным коэффициентом поглощения при  $\lambda > 400 \text{ нм}$  и значительной анизотропией флуоресценции в вязких средах.

Эти соображения побудили нас синтезировать флуоресцентные фосфолипидные зонды, имеющие в гидрофобной области периленильный остаток. Мы провели синтез 4-(3-периленил)бутановой кислоты (III) и на ее основе – меченых фосфатидилхолина PerPC (VI) и сфингомиелина PerSM (VII) (схема). Короткий ацильный остаток, на конце которого располагается флуорофор (общая длина меченой кислоты соответствует примерно жирной кислоте  $\text{C}_{12}$ ) был выбран с тем, чтобы флуорофор, находясь в гидрофобной области бислоя, в то же время располагался ближе к полярным головкам, т.е. в той зоне, где, как мы полагаем, флуоресцентные зонды должны быть

Сокращения: APC – 1-ацил-2-[12-(9-антрил)-11-транс-додеценоил]-sn-глицеро-3-фосфохолин, ASM – N-[12-(9-антрил)-11-транс-додеценоил]сфингозин-1-фосфохолин, DMPC – димристоилфосфатидилхолин, PC – фосфатидилхолин, PerPC – 1-ацил-2-[4-(3-периленил)бутаноил]-sn-глицеро-3-фосфохолин, PerSM – N-[4-(3-периленил)бутаноил]сфингозин-1-фосфохолин, POPC – пальмитоилолеоилфосфатидилхолин, SM – сфингомиелин бычьего мозга, DOPC – диолеилфосфатидилхолин.

\*Автор для переписки.

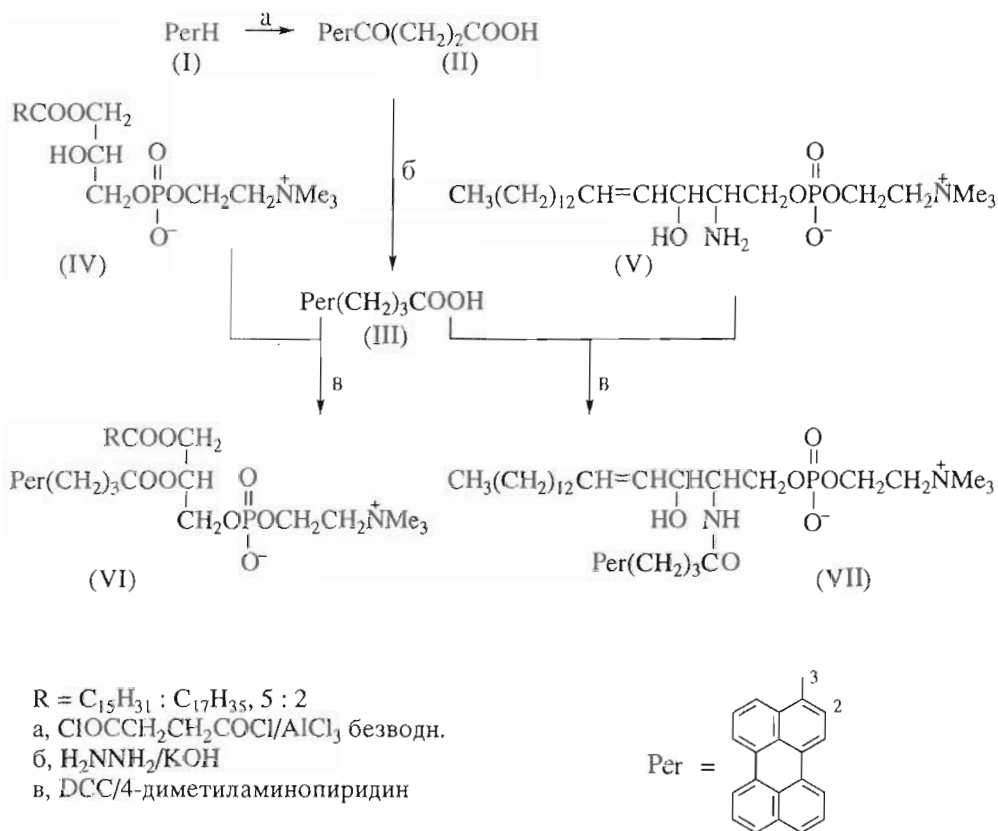


Схема 1.

более чувствительны к влиянию мембранных белков, чем в средней области бислоя.

Кислота (III) была получена восстановлением по Хуан-Минлону 3-(3-периленоил)пропановой кислоты (II), свою очередь синтезированной по описанному методу [5] реакцией перилена (I) с сукциноилдихлоридом по Фриделю-Крафтсу. 4-(3-Периленил)бутановая кислота была синтезирована ранее по той же схеме в МХТИ им. Д.И. Менделеева, однако синтез этот опубликован в малодоступном источнике [6].

Кетокислоте (II) Цинке и др. [5] химическими методами приписали указанное на схеме строение, где боковая цепь занимает положение 3, не рассматривая возможности присутствия других изомеров. По нашим данным, это вещество, как и 4-(3-периленил)бутановая кислота (III), имеет примеси близкородственного соединения, по-видимому изомера присоединения цепи к периленовому ядру (в положение 1 или 2), который не отличается от основного вещества по поведению при ТСХ (оба образуют при ТСХ в нескольких системах узкие полосы) и при ВЭЖХ на силикагеле. Однако метиловые эфиры изомеров положения кислот (II) и (III) разделяются при ВЭЖХ на обращенной фазе  $\text{C}_{18}$  при  $40^\circ\text{C}$  (см. "Экспериментальную часть"), при этом соотношение основного ве-

щества и изомера в обоих случаях составляет  $\sim 9 : 1$ . Спектры флуоресценции обоих изомеров кислоты (III), выделенных в микроколичествах, очень близки (см. ниже). Разделить их кристаллизацией не удалось, препаративное же разделение с помощью ВЭЖХ было бы весьма трудоемким и дорогостоящим.

Для дальнейшего получения меченых фосфолипидов PerPC и PerSM мы применяли кислоту (III) с примесью изомера, что, по нашему мнению, не должно повлиять на ценность синтезированных зондов как инструментов для мембранных исследований. Действительно, флуоресцентные свойства их (спектр испускания, анизотропия флуоресценции и др.) представляют собой сумму свойств изомеров (с учетом доли каждого). Дать неадекватные результаты в мембранных исследованиях изомерные зонды могут лишь в том случае, если в двух (или нескольких) изучаемых системах компоненты этих систем будут избирательно взаимодействовать с изомерами, составляющими зонд. Это едва ли возможно, учитывая чрезвычайную близость физических свойств изомерных флуорофоров: наблюдать разделение изомеров кислот (II) и (III) на два пика удалось лишь при ВЭЖХ на обращенной фазе их метиловых эфиров в тщательно подобранных условиях.

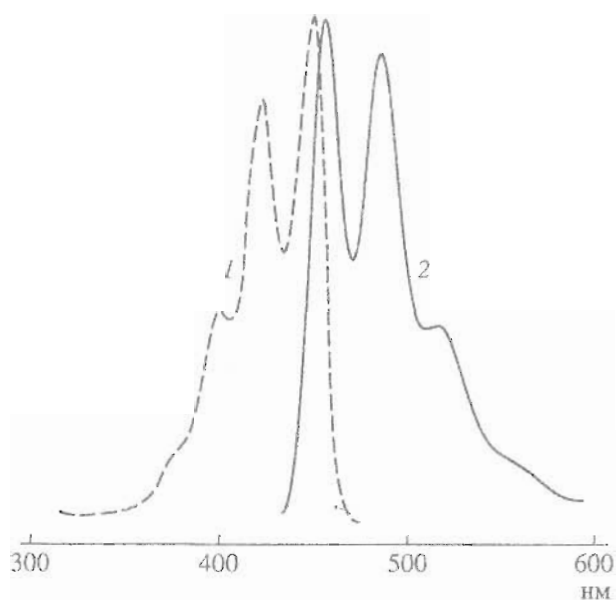


Рис. 1. Нормализованные спектры зонда PerPC в изопропанол: 1 – возбуждения ( $\lambda_{\text{исп}}$  485 нм), 2 – испускания ( $\lambda_{\text{возб}}$  420 нм). Концентрация зонда 0.5 мкМ, температура 20°C.

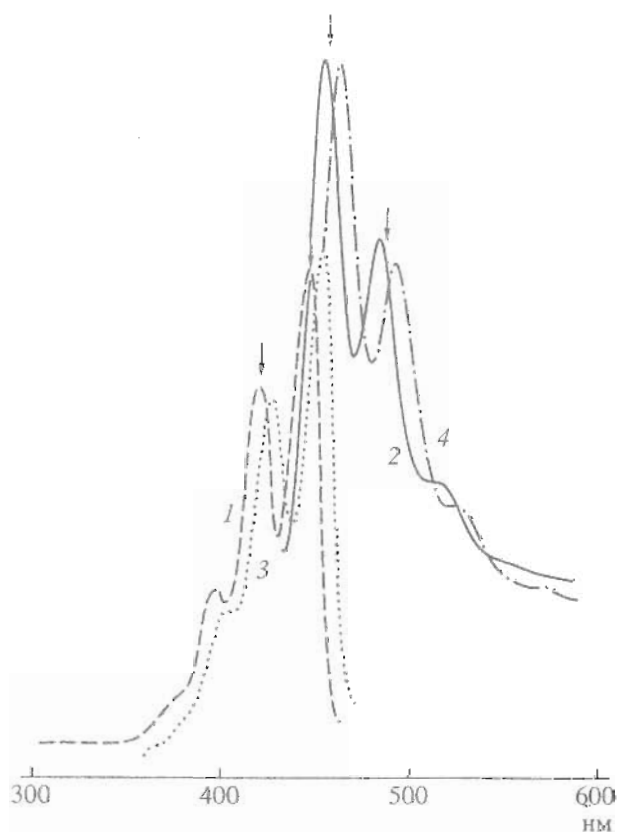


Рис. 2. Нормализованные спектры возбуждения (1, 3) и испускания (2, 4) (сдвинуты по оси ординат) метил-4-(3-периленил)бутаноата и его изомера в многослойных липосомах из яичного РС при 20°C. 1, 2 – спектры основного изомера, 3, 4 – минорного. Стрелки указывают положение максимумов спектров метил-4-(3-периленил)бутаноата в виде неразделенной смеси изомеров (в тех же условиях).

Фосфолипидные зонды PerPC (VI) и PerSM (VII) были синтезированы по стандартным методикам – ацилированием лизофосфатидилхолина (IV) и сфингозин-1-фосфохолина (V) соответственно периленильной кислотой (III) в присутствии DCC и 4-диметиламинопиридина.

По флуоресцентным свойствам периленильные зонды гораздо ближе перилену [7], чем периленоильные зонды на основе кислоты (II) [1]. Спектры возбуждения и испускания зонда PerPC в изопропанол (рис. 1) практически полностью повторяют соответствующие спектры перилена [7] со сдвигом на 9 - 10 нм в длинноволновую область: перилен имеет максимумы при 439, 466 и 497, а PerPC – при 448, 476 и 506 нм.

Спектры как возбуждения (1, 3) (рис. 2), так и испускания (2, 4) обоих изомеров метилового эфира 4-(3-периленил)бутановой кислоты (III) практически полностью совпадают по форме, но максимумы минорного изомера сдвинуты на 8 - 10 нм по сравнению с  $\lambda_{\text{max}}$  для основного. Положения максимумов для метилового эфира кислоты (III) (смесь изомеров), указанные стрелками, как и следовало ожидать, близки максимумам основного изомера.

Известно, что положение максимумов флуоресценции и характер спектров флуорофоров, не содержащих полярных групп, мало зависит от характеристик среды, в частности от полярности. Периленильные соединения также полностью сохраняют форму спектра во всех изученных средах; при переходе от малополярного растворителя (гексан) к полярному (метанол) максимумы испускания сдвигаются всего на 2 - 3 нм (табл. 1). Однако в липосомах из яичного фосфатидилхолина сдвиг максимумов в длинноволновую область несколько больше, хотя усредненная полярность гидрофобной области бислоя, если судить по константе диэлектрической проницаемости, невелика и соответствует проницаемости для растворителей малой полярности, например, диоксана [8] (по глубине бислоя существует градиент полярности, обусловленный степенью проникновения в мембрану воды [9]). Причиной наблюдаемого для липосом увеличенного сдвига, возможно, является влияние анизотропии бислоя на значительный по размерам периленильный флуорофор, различные части которого находятся в зонах мембраны с разной полярностью и плотностью упаковки.

Высокий квантовый выход периленильного флуорофора (0.81 в *n*-бутанол), близкий квантовому выходу периленоильных зондов (0.65 в гексане), вместе с высоким молярным коэффициентом поглощения в полосе возбуждения ( $\epsilon$  39 000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> при 414 нм) обуславливает значительную “чувствительность флуоресценции” периленильных зондов и, следовательно, возможность вводить

минимальное количество зонда в исследуемую систему, что является существенным достоинством таких соединений.

При сравнении величин анизотропии флуоресценции ( $r$ ) (при 20 и 37°C, т.е. комнатной и "физиологической") антрилвиниловых и периленильных зондов в липосомах двух составов (табл. 2) прежде всего обращает на себя внимание, что во всех приведенных условиях периленильные зонды имеют ббльшие в 2 - 3 раза величины  $r$  по сравнению с антрилвиниловыми. Несомненно, это обусловлено как несколько ббльшими размерами периленильного флуорофора, так и главным образом его меньшим временем жизни возбужденного состояния: для 12-(9-антрил)-*транс*-додеценной кислоты в этаноле  $\tau = 7$  нс [4], а для метил-4-(3-периленил)бутаноата - 4 нс [10]. Во всех случаях для обоих флуорофоров наблюдается значительная разница в величинах  $r$  между фосфатидилхолиновым и сфингомиелиновым зондом. Для периленильных зондов эта разница (~40%) больше, чем для антрилвиниловых (20 - 35%). Возможно, это вызвано тем, что у последних флуорофор находится дальше от полярной головки, где меньше сказывается тормозящее подвижность цепи влияние водородных связей, в которых участвуют группы CONH и OH сфингомиелина [11, 12]. Данные табл. 2 показывают также, что периленильные зонды, как и антрилвиниловые, регистрируют при обеих температурах меньшую жидкость смешанного бислоя, состоящего из смеси яичный PC-SM бычьего мозга, 3 : 1 (по весу) (Б) при 20 и 37°C (Концентрация липосом 200 мкг/мл, зонда - 1 - 2 мкг/мл,  $\lambda_{\text{возб}}$  410 нм,  $\lambda_{\text{исп}}$  452 нм, ширина щелей 1.5 нм на возбуждении и 10 нм на испускании)

Важен и вопрос о липидной специфичности [3] полученных зондов, т.е. о том, адекватно ли они отражают поведение в мембранах липидов, производными которых являются. Для исследования этого вопроса были проведены измерения анизотропии флуоресценции синтезированных зондов в трех типах липосом, различающихся жирнокислотным составом входящего в них фосфатидилхолина. Как известно, введение двойной связи в углеводородную цепь фосфолипидов снижает степень упорядоченности бислоя и приводит к уменьшению анизотропии флуоресценции, причем нарушения упаковки, вызванные введением второй двойной связи, значительно меньше тех, которые обусловлены наличием первой. Результаты опытов с PerPC и PerSM (табл. 3) хорошо согласуются с данной моделью: как и следовало ожидать, PerPC в большей степени, чем PerSM, отзывается на изменение жирнокислотного состава фосфатидилхолинового компонента липосом при переходе от насыщенного фосфатидилхолина

**Таблица 1.** Положение максимумов спектров испускания PerPC в различных средах при 20°C ( $\lambda_{\text{возб}}$  410 нм, ширина щелей 1.5 нм на возбуждении и 10 нм на испускании; концентрация зонда 2 - 5 мкг/мл)

Среда	$\lambda_{\text{max}}$ , нм
Гексан	444, 473, 508
Изопропанол	448, 476, 506
Метанол	446, 475, 507
Липидный бислой*	454, 484, ~515 (плечо)

\* Моноламеллярные липосомы из яичного PC.

**Таблица 2.** Значения анизотропии флуоресценции антрилвиниловых и периленильных зондов в многослойных липосомах из яичного PC (А) и смеси PC-SM бычьего мозга, 3 : 1 (по весу) (Б) при 20 и 37°C (Концентрация липосом 200 мкг/мл, зонда - 1 - 2 мкг/мл,  $\lambda_{\text{возб}}$  410 нм,  $\lambda_{\text{исп}}$  452 нм, ширина щелей 1.5 нм на возбуждении и 10 нм на испускании)

Зонд	А		Б	
	20°C	37°C	20°C	37°C
APC	0.044	0.029	0.050	0.035
ASM	0.068	0.037	0.075	0.046
PerPC	0.094	0.077	0.105	0.080
PerSM	0.163	0.136	0.178	0.142

Примечание. Во всех средах спектр возбуждения имеет максимумы 393 - 394, 415 - 416, 441 - 443 нм.

**Таблица 3.** Значения анизотропии флуоресценции периленильных зондов при различном жирнокислотном составе входящего в моноламеллярные липосомы PC (Температура 37°C, длина волны возбуждения 448 нм, испускания 482 нм, щели монохроматора возбуждения 3 нм и испускания 5 нм; концентрация липосом 200 мкг/мл, зондов 1 - 2 мкг/мл. Величины  $\Delta r$  соотносят соседние по вертикали значения  $r$ )

Состав липосом*	PerPC	$\Delta r$ , %	PerSM	$\Delta r$ , %
DMPC-SM-холестерин	0.262		0.273	
		25		14
POPC-SM-холестерин	0.209		0.239	
		14		6
DOPC-SM-холестерин	0.183		0.226	

\* Мол. соотношение 3 : 1 : 2.

**Таблица 4.** Значения анизотропии флуоресценции периленильных зондов в телях эритроцитов при добавлении холестерина (Температура 37°C, длина волны возбуждения 448 нм и испускания 482 нм, ширина щелей 3 нм на возбуждении и 10 нм на испускании)

Зонд	Без холестерина	С холестерином	$\Delta r$ , %
PerPC	0.248	0.264	6.4
PerSM	0.261	0.309	18.4

(DMPC) к фосфолипиду с одной ненасыщенной связью (POPC) и с двумя (DOPC).

В табл. 4 представлены результаты измерения анизотропии флуоресценции PerPC и PerSM в телях эритроцитов при добавлении к системе холестерина (10% от массы липидов). Как видно, оба зонда регистрируют уменьшение при этом жидкости мембраны, причем отклик PerSM на введение стерина значительно больше, чем отклик PerPC. Это вполне закономерно: эритроцитарная мембрана гетерогенна, что было показано нами ранее с помощью антривиниловых зондов [13]; добавленный в небольшом количестве холестерин (10% от суммы липидов) в первую очередь включается в домены, обогащенные сфингомиелином, к которому имеет большее по сравнению с другими фосфолипидами сродство [12], что выражается большим увеличением анизотропии флуоресценции PerSM.

Таким образом, представленные здесь данные предварительных мембранных экспериментов говорят о том, что периленилмеченные фосфолипиды близки по поведению соответствующим природным веществам и поэтому могут быть применены как инструменты при исследовании биологических объектов, прежде всего мембранных систем.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работы с флуоресцентными веществами выполняли при рассеянном свете ламп накаливания. В синтезе использовали перилен, 4-(N,N-диметиламино)пиридин (Fluka, Швейцария), безводный хлорид алюминия (Merck, ФРГ), янтарную кислоту (Reanal, Венгрия) без дополнительной очистки. N,N'-Дициклогексилкарбодимид (Serva, ФРГ) перед применением перегоняли в вакууме. Все растворители очищали по обычным методикам. Удаление растворителей проводили в вакууме на ротаторном испарителе при температуре не более 40°C. Дихлорангидрид янтарной кислоты синтезировали кипячением (6 ч) кислоты с избытком тионилхлорида в CCl<sub>4</sub> с последующей перегонкой в вакууме. Также применяли яичный фосфатидилхолин и сфингомиелин бычьего мозга (отечественного производства), диолеилфосфатидилхолин, димиристоилфосфатидилхолин, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилхолин и холестерин (Serva, ФРГ). Сфингозин-1-фосфохолин из сфингомиелина бычьего мозга [14], лизофосфатидилхолин из яичного фосфатидилхолина [15] получали, как описано ранее. Лизофосфатидилхолин в положении I содержал, согласно данным ГЖХ, главным образом остатки пальмитиновой и стеариновой кислот в соотношении ~5 : 2. Индивидуальность липидов контролировали с помощью

ТСХ; при надобности их очищали колоночной хроматографией.

Температуры плавления определены на блоке Кофлера и исправлены. ИК-спектры измеряли на приборе Specord 75 IR (Carl Zeiss, ГДР), УФ-спектры – на спектрофотометре Beckman Acta M (США), масс-спектры с ионизацией электронным ударом (энергия электронов 70 эВ) и химической (NH<sub>3</sub>) снимали на масс-спектрометре Varian MAT 44S (США); с бомбардировкой ускоренными атомами и регистрацией положительных ионов – на приборе Kratos MS-50TC (Великобритания), энергия атомов ксенона 8 эВ, матрица – глицерин; спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре Hitachi F-4000. Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле L 40/100 мкм (Chemapol, ЧСФР) и окиси алюминия III степени активности (Reanal, Венгрия), ТСХ – на пластинках Silufol F254 (Chemapol, ЧСФР) или пластинках Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) в системах толуол–этилацетат–CH<sub>3</sub>COOH, 50 : 5 : 1 (А), хлороформ–метанол–вода–конц. NH<sub>4</sub>OH, 65 : 25 : 2 : 2 (Б), хлороформ–метанол–CH<sub>3</sub>COOH–вода, 50 : 25 : 8 : 4 (В), хлороформ–метанол–вода, 65 : 25 : 4 (Г). Для обнаружения веществ на хроматограммах использовали флуоресценцию при УФ-освещении (а), фосфорномолибденовую кислоту (б), молибденовый синий (в). ВЭЖХ проводили на приборе Altex 334 (США) с флуоресцентным детектором Beckman 157 (США); возбуждение 305 - 395 нм, регистрация испускания при λ > 430 нм; колонка (4 × 250 мм) Nucleosil 500-7C<sub>18</sub> (Macherey-Nagel, ФРГ), температура 40°C.

**3-(3-Периленоил)пропановая кислота (II).** К раствору 3.1 г дихлорангидрида янтарной кислоты в 115 мл сухого свежеперегнанного дихлорэтана при перемешивании добавляли 1.5 г безводного хлористого алюминия, смесь перемешивали 30 мин при 20°C, после чего прибавляли в течение 10 мин четыремя равными порциями 2.5 г тонкоизмельченного перилена, перемешивали еще 4 ч. Колбу охлаждали льдом до 0°C и содержимое выливали в стакан с 300 мл 5% HCl со льдом. Смесь перемешивали 1 ч при 20°C и экстрагировали хлороформом (5 × 150 мл), экстракт упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с 100 г окиси алюминия, которую последовательно промывали системой гексан–толуол (1 : 1), затем смесью хлороформ–этилацетат (19 : 1) и хлороформ–этилацетат–CH<sub>3</sub>COOH (19 : 1 : 0.2). Получали 0.88 г непрореагировавшего перилена и 1.1 г кислоты (II), красный порошок, т. пл. около 240°C (с разложением), R<sub>f</sub> 0.26 (А). Литературные данные [5]: т. пл. 255°C (темнеет при 240°C).

УФ (этанол), λ<sub>max</sub>, нм (lg ε): 259 (4.46), 447 (4.38); ИК (KBr, см<sup>-1</sup>): 3400 - 2500 с. шир. (COOH), 3040 сл. (ArH), 1710 с. (COOH), 1660 с. (ArCO),

1500, 1570, 1600 *ср.* (Ar). ВЭЖХ метилового эфира кислоты (получен действием HCl в метаноле) дает два пика в соотношении ~9 : 1 и величинами *k'* 5.0 и 6.8 соответственно. Масс-спектр метилового эфира (ионизация электронным ударом; в скобках указана высота пика в % от максимального с *m/z* 57), *m/z*: 367 (12) [*M* + 1]<sup>+</sup>; 366 (12) [*M*]<sup>+</sup>, 352 (4) [*M* - CH<sub>3</sub> + 1]<sup>+</sup>; 279 (15) [*M* - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOMe]<sup>+</sup>.

**4-(3-Периленил)бутановая кислота (III).** К смеси 0.58 г кислоты (II) и 0.27 г гидразина прибавляли 0.70 г тонкорастертого едкого кали и 5 мл триэтиленгликоля, смесь кипятили 2 ч с обратным холодильником в атмосфере аргона. Затем соединяли колбу с нисходящим холодильником и медленно отгоняли гидразин, пока температура реакционной смеси не поднималась до 195°C. Температуру поддерживали до прекращения выделения азота (~3 ч). После охлаждения реакционной смеси ее разбавляли 5 мл воды и подкисляли HCl, отсасывали осадок, промывали его водой (3 × 5 мл), высушивали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с 30 г силикагеля, элюируя последовательно CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, затем смесями CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>COOH (10 : 0.01) и CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-этилацетат-CH<sub>3</sub>COOH (19 : 1 : 0.3). Получали 0.25 г кислоты (III), т. пл. около 225°C с разложением, *R<sub>f</sub>* 0.3 (A); УФ (этанол), λ<sub>max</sub>, нм (lgε): 247 (4.70), 255 (4.84), 392 (4.27), 414 (4.60), 442 (4.72); ИК (KBr, ν, см<sup>-1</sup>): 3400 - 2600 *с.* шир (COOH), 3040 *сл.* (ArH), 1710 *с.* (COOH), 1500 *ср.*, 1570 *ср.*, 1600 *сл.* (Ar). Литературные данные [6]: т. пл. 205 - 207°C с разложением; УФ (этанол), λ<sub>max</sub>, нм (lgε): 249 (4.63), 256 (4.76), 395 (4.19), 420 (4.56), 449 (4.69).

Для метилового эфира, синтезированного из кислоты (III) действием сухого HCl в метаноле, масс-спектр (ионизация электронным ударом), *m/z*: 352 [*M*]<sup>+</sup>; 321 [*M* - OMe]<sup>+</sup>; 293 [*M* - COOMe]<sup>+</sup>.

Хроматограмма, полученная при ВЭЖХ метилового эфира кислоты, показывает два пика в соотношении ~9 : 1, *k'* 2.8 и 4.2 соответственно. Около 0.1 мг метилового эфира разделяли на изомеры в указанных условиях; спектры флуоресценции изомеров см. на рис. 2.

**1-Ацил-2-[4-(3-периленил)бутаноил]-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (VI, PerPC).** В круглодонную колбу помещали 2 г стеклянных шариков диаметром 0.15 мм, колбу выдерживали при 200°C/2 кПа, заполняли аргоном и охлаждали до 20°C. Вносили в колбу раствор 61 мг свежеприготовленного яичного лизофосфатидилхолина (IV) в 4 мл смеси хлороформ-метанол, 2 : 1, и упаривали в вакууме (10 Па) при 20°C. К содержимому колбы прибавляли 50 мг кислоты (III), 22 мг диметиламинопиридина, 70 мкл сухого триэтиламина, 4 мл абсолютного хлороформа, 200 мкл 20% раствора DCC

в CCl<sub>4</sub>, перемешивали до гомогенности раствора при 20°C и оставляли на ночь. Затем к смеси прибавляли еще 140 мкл раствора DCC и перемешивали 8 ч. После разбавления 15 мл смеси хлороформ-гептан (2 : 1) смесь упаривали в вакууме, остаток растворяли в 10 мл хлороформа, промывали 1% HCl с 1% NaCl (2 × 3 мл), 1% NaCl (2 × 3 мл; разделение фаз центрифугированием). Водную фазу промывали хлороформом (2 × 4 мл), объединенные хлороформные растворы упаривали. Остаток растворяли в 1.5 мл 5% метанола в хлороформе, отфильтровывали от выпавшего осадка дициклогексилмочевины и упаривали. Операцию повторяли дважды. Остаток хроматографировали на колонке с 5 г силикагеля, элюируя системой хлороформ-метанол (65 : 25) и далее хлороформ-метанол-вода (65 : 25 : 1); получали 11.2 мг PerPC, оранжево-красного аморфного вещества, имеющего одинаковую подвижность с яичным фосфатидилхолином при ТСХ; *R<sub>f</sub>* 0.36 (Б), 0.45 (В) и 0.26 (Г) (обнаружение: а, б, в). Масс-спектр (химическая ионизация), *m/z*: 817, 845 [*M* + 2]<sup>+</sup>; 816, 844 [*M* + H]<sup>+</sup>; 775, 803 [*M* + 2H - NMe<sub>3</sub> + NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>. В каждой паре массовых чисел отношение интенсивностей первого и второго пиков составляет ~5 : 2, что соответствует относительному содержанию остатков пальмитиновой и стеариновой кислот в исходном лизофосфатидилхолине. Предложенное строение фрагментов дано в соответствии с данными Джерасси и др. [16]. УФ-спектр фосфолипида (VI) повторяет спектр кислоты (III).

**N-[4-(3-Периленил)бутаноил]сфингозин-1-фосфохолин (VII, PerSM).** 7.6 мг сфингозин-1-фосфохолина (V) растворяли при слабом нагревании в 0.2 мл изопропанола и 0.05 мл хлороформа, к раствору при 20°C прибавляли раствор 6 мг кислоты (III) в 0.2 мл хлороформа и 0.04 мл триэтиламина, затем 1.25 мг диметиламинопиридина и 21 мкл 20% раствора DCC в CCl<sub>4</sub>, смесь перемешивали 1 ч, оставляли на ночь, добавляли еще 10 мкл раствора DCC, выдерживали 1 сут, затем обрабатывали, как описано для фосфатидилхолина (VI), и хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя системой хлороформ-метанол (65 : 25), затем смесью хлороформ-метанол-вода (65 : 25 : 2). Получали 2.74 мг PerSM в виде оранжево-красного аморфного вещества, которое при ТСХ мигрирует в виде двух рядом расположенных пятен, что вызвано присутствием в исходном сфингозин-1-фосфохолине (основной компонент) насыщенного сфинганинового компонента (минорного) [1]; *R<sub>f</sub>* основного компонента 0.28 (Б), 0.32 (В) и 0.22 (Г). Масс-спектр (бомбардировка ускоренными атомами), *m/z*: 785 [*M* + H]<sup>+</sup>; 786 [*M* + 2H]<sup>+</sup>; 697 [*M* - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>3</sub>]<sup>+</sup>. УФ-спектр фосфолипида (VII) повторяет спектр кислоты (III).

**Липосомы** готовили в 20 мМ трис-буфере, рН 7.4, содержащем 1 мМ EDTA и 0.02 %  $\text{NaN}_3$ . Хлороформный раствор смеси липидов выпаривали на ротормном испарителе в круглодонной колбе, остаток растворяли в сухом эфире, выпаривали и затем высушивали 4 ч при 10 Па. Многослойные липосомы получали суспендированием липидной пленки интенсивным встряхиванием на вибраторе (50 Гц) в течение 10 мин при 37°C. Моноламеллярные липосомы получали обработкой ультразвуком (100 Вт, частота 24 кГц) в течение 3 мин.

**Тени эритроцитов человека** были получены по методу [17]. Флуоресцентные зонды добавляли к суспензии теней эритроцитов в виде растворов в диметилсульфоксиде до конечного соотношения зонд/сумма липидов 0.2 : 100 (по массе); инкубировали 3 ч при 37°C. Этанольный раствор холестерина добавляли к суспензии теней эритроцитов с зондом до соотношения холестерин/сумма липидов 1 : 10 (по массе) (общее количество этанола не превышало 0.5% объема образца), инкубировали 24 ч при 37°C.

**Флуоресцентные измерения.** Корректированные спектры флуоресценции регистрировали в термостатированных кварцевых кюветках (10 × 10 мм) на спектрофлуориметрах Hitachi 650-50 и Hitachi 4000 (Япония). Анизотропию флуоресценции определяли по стандартной методике [18].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Молотковский Ю.Г., Бергельсон Л.Д. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1256 - 1269.
2. Molotkovsky Jul.G., Manevich Y.M., Babak V.I., Bergelson L.D. // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 778. № 2. P. 281 - 288.
3. Bergelson L.D., Molotkovsky Jul.G., Manevich Y.M. // Chem. and Phys. Lipids. 1985. V. 37. № 2. P. 165 - 195.
4. Johansson L.B.-A., Molotkovsky J.G., Bergelson L.D. // Chem. and Phys. Lipids. 1990. V. 53. № 2 - 3. P. 185 - 189.
5. Zinke A., Troger H., Ziegler E. // Ber. 1940. B. 73. № 10. S. 1042 - 1048.
6. Дугарова И.Д. Синтез некоторых  $\omega$ -(антр-9-ил)- и  $\omega$ -(перилен-3-ил)-карбоновых кислот. Дис. ... канд. хим. наук. М.: МХТИ им. Д.И. Менделеева, 1990. 103 с.
7. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. N.Y.: Plenum Press, 1984. P. 120 - 123.
8. Menger F.M., Aikens P., Wood M. // Chem. Commun. 1988. № 3. P. 180 - 182.
9. Griffith O.H., Dehlinger P.J., Van S.P. // J. Membrane Biol. 1974. V. 15. № 2. P. 159 - 192.
10. Johansson L.B.-A., Molotkovsky J.G., Bergelson L.D. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. № 24. P. 7374 - 7381.
11. Barenholz Y., Thompson T.E. // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 604. № 2. P. 129 - 158.
12. Boggs J.M. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 906. № 3. P. 353 - 404.
13. Manevich E.M., Lakin K.M., Archakov A.I., Li V.S., Molotkovsky J.G., Bezuglov V.V., Bergelson L.D. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 815. № 3. P. 455 - 460.
14. Stoffel W., Assmann G. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1972. B. 353. № 1. S. 65 - 74.
15. Hanahan D.J., Robell M., Turner L.D. // J. Biol. Chem. 1954. V. 206. № 2. P. 431 - 441.
16. Ayanoğlu E., Wegmann A., Pilet O., Marbury G.D., Hass J.R., Djerassi C. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 18. P. 5246 - 5251.
17. Колчинская Л.И., Лишко В.К., Мальшова М.К. // Биохимия. 1976. Т. 41. С. 933 - 938.
18. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. N.Y.: Plenum Press, 1984. P. 125 - 128.

## Fluorescent Lipid Probes with Perylenyl Label

I. V. Grechishnikova, I. I. Mikhalev, and Jul. G. Molotkovsky

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, 117871 Moscow, GSP-7, Russia

**Abstract** – A synthesis of 4-(3-perylenyl)butanoic acid is described; a phosphatidylcholine and a sphingomyelin with the labeled acid residue are also synthesized. The phospholipid fluorescent probes have a good quantum yield and a high fluorescence anisotropy value in lipid bilayer; they are proposed as useful tools in studies of membrane systems.

**Key words:** 3-perylenyl derivatives, membrane probes, phosphatidylcholine, sphingomyelin.