



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.175.52+543.422.23.

ИЗУЧЕНИЕ ИОНОФОРНЫХ СВОЙСТВ ПРОСТАГЛАНДИНОВ
МЕТОДОМ ЯМР*Безуглов В. В., Викторов А. В., Бергельсон Л. Д.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Ca^{2+} -ионофорная активность простагландинов до сих пор остается одной из интригующих проблем биохимии. Имеющиеся данные носят фрагментарный характер и не позволяют выявить зависимость ионофорной активности известных типов простагландинов от их структуры. Используемые до настоящего времени системы для тестирования ионофорных свойств этих природных веществ либо отличались большой сложностью (например, исследования на митохондриях [1]), либо были совершенно небιологичны (использование двухфазной системы органический растворитель — вода [2]). Очевидно, что для полного изучения ионофорной активности простагландинов и их аналогов необходимо использовать адекватную и в то же время достаточно простую модельную систему. В настоящей работе мы предлагаем в качестве такой модели фосфолипидные везикулы, ионный транспорт в которых четко контролируется методом ЯМР с использованием парамагнитных гидрофильных зондов [3, 4].

Ранее было показано [3], что при добавлении ионов Mn^{2+} (0,1—1 мМ) в наружный объем фосфатидилхолиновых везикул в спектре ПМР наблюдается уменьшение интенсивности N-метильного сигнала приблизительно на $\frac{2}{3}$ в результате полного уширения сигнала ПМР от наружных групп $\text{N}(\text{CH}_3)_3$, контактирующих с ионами Mn^{2+} . Таким образом, регистрируя уменьшение интенсивности остаточного сигнала от протонов «внутренних» N-метильных групп, можно следить за переносом ионов Mn^{2+} через везикулярную мембрану во внутренний объем. Для мембраны, построенной только из одного фосфатидилхолина, подобный перенос отсутствует даже при инкубации препарата в течение 5 ч при 50° С. Однако при введении в образец простагландинов A_2 или E_2 (10 мкг вещества на 1 мг фосфатидилхолина и меньше) мы наблюдали уменьшение интенсивности «внутреннего» N-метильного сигнала при инкубации в течение 20 ч (28° С) на 16 и 30% соответственно. Этот факт свидетельствует о том, что часть ионов Mn^{2+} была перенесена через фосфатидилхолиновый бислой внутрь везикул. При этом одинаковые результаты были получены как при добавлении простагландина E_2 в водную везикулярную дисперсию, так и при совместном озвучивании фосфолипида и простагландина E_2 (рис. 1). Гораздо более интенсивно процесс переноса ионов Mn^{2+} при участии простагландинов происходит при 50° С. Поэтому в данной работе все кинетические кривые были измерены при этой температуре. Как видно из рис. 1,

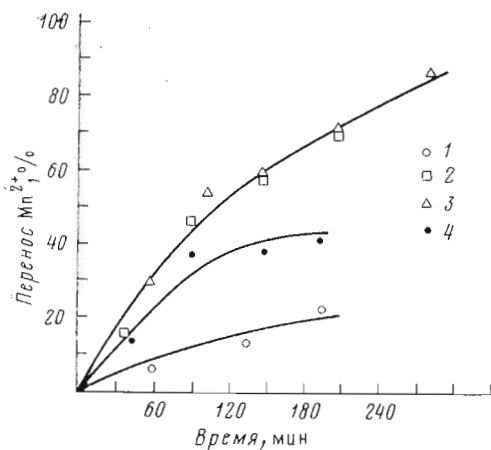


Рис. 1

Рис. 1. Перенос Mn^{2+} с помощью простагландина E_2 и 15-фтор-15-дезоксипростагландина $F_{2\alpha}$ через везикулярную мембрану из фосфатидилхолина (10 мг), $50^\circ C$. 1 — простагландин E_2 , 50 мкг; 2 — простагландин E_2 , 100 мкг; 3 — простагландин E_2 , 100 мкг, совместное озвучивание с фосфатидилхолином; 4 — 15-фтор-15-дезоксипростагландин $F_{2\alpha}$, 50 мкг

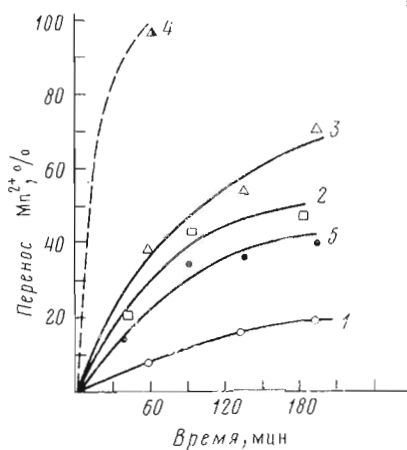


Рис. 2

Рис. 2. Перенос Mn^{2+} с помощью простагландина $F_{2\alpha}$ и 15-фтор-15-дезоксипростагландина через везикулярную мембрану из фосфатидилхолина (10 мг), $50^\circ C$. 1 — простагландин $F_{2\alpha}$, 50 мкг; 2 — простагландин $F_{2\alpha}$, 100 мкг; 3 — простагландин $F_{2\alpha}$, 200 мкг; 4 — простагландин $F_{2\alpha}$, 400 мкг; 5 — 15-фтор-15-дезоксипростагландин $F_{2\alpha}$, 50 мкг

для простагландина E_2 при мольном отношении фосфатидилхолин / простагландин, равном 50 : 1, через 5 ч наблюдается почти полное уширение сигнала «внутренних» групп $N(CH_3)_3$. Двукратное уменьшение содержания простагландина в образце приводит к заметному уменьшению интенсивности переноса ионов Mn^{2+} и к достижению насыщения, при котором, видимо, концентрация зонда во внутреннем объеме везикул больше не возрастает. Аналогичный эффект наблюдался и для переноса Mn^{2+} через фосфатидилхолиновый бислой с помощью простагландина $F_{2\alpha}$ (рис. 2). При этом уменьшение мольного отношения фосфатидилхолин / простагландин до 25 : 1 или 13 : 1 очень сильно ускоряет трансмембранный перенос ионов Mn^{2+} . Так, например, в последнем случае равновесие (насыщение) достигается менее чем через 1 ч.

Неожиданной оказалась аномально высокая активность 15-фтор-15-дезоксипростагландина $F_{2\alpha}$ в переносе Mn^{2+} . Этот фторированный аналог был в 2 и 1,7 раза активнее, чем простагландины $F_{2\alpha}$ и E_2 соответственно. Можно предположить, что связывание простагландинами ионов Mn^{2+} происходит с участием нескольких функциональных групп молекулы биорегулятора, однако 15-ОН-группа, видимо, в этом процессе не участвует. Так, в наших экспериментах ионофорная активность простагландинов убывала в следующем ряду: 15-фтор-15-дезоксипростагландин $F_{2\alpha}$ > E_2 > $F_{2\alpha}$ > A_2 . В настоящее время проводится дальнейшее изучение влияния особенностей структуры простагландинов на перенос двухвалентных ионов.

Важно отметить, что катализируемый простагландинами перенос Mn^{2+} через везикулярную мембрану не зависит от изменения концентрации ионов Mn^{2+} в диапазоне 0,2—0,4 мМ. Принимая во внимание, что Mn^{2+} замещает Ca^{2+} в ряде биологических систем (см., например, [5]), можно предположить, что установленные нами закономерности будут справедливы также и для переноса ионов Ca^{2+} с помощью простагландинов.

Экспериментальная часть

Яичный фосфатидилхолин выделен по методу [6]. Простагландины E₂ и F_{2α} — отечественного производства. Простагландин A₂ получен по методу [7]. 15-Фтор-15-дезоксипростагландин F_{2α} синтезирован как описано ранее [8].

Фосфолипидные везикулы получали обработкой ультразвуком (УЗДН-1, 22 КГц, 0—+5° С, 10 мин, атмосфера аргона) грубой дисперсии фосфатидилхолина (20 мг/мл) в 0,05 М буфере (H₂O, имидазол — HCl, рН 7,0) с последующим центрифугированием в течение 20 мин при 10 000g. Индекс окисленности полученного препарата, D₂₃₃/D₂₁₅ [9], не превышал 0,1. К приготовленным везикулам был добавлен раствор MnCl₂ в конечной концентрации 0,4 мМ и вслед за этим — определенное количество раствора простагландина в (C²H₅)₂SO; в контрольный образец добавляли эквивалентное количество (C²H₅)₂SO. В случае совместного озвучивания простагландина E₂ с фосфатидилхолином раствор последнего в хлороформе первоначально смешивали с раствором простагландина в (C²H₅)₂SO и упаривали в вакууме. Дисперсию везикул получали как указано выше.

Спектры ПМР сняты в режиме Фурье-преобразования на спектрометрах «Varian XL-100» и «Brücker WP-60» на частотах 100 и 60 МГц соответственно. Относительная ошибка измерения интегральных интенсивностей сигналов ПМР составляла 10%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Malmström K., Carafoli E. (1975) Arch. Biochem. and Biophys., 171, 418-423.
2. Carsten M. E., Miller J. D. (1978) Arch. Biochem. and Biophys., 185, 282-283.
3. Бергельсон Л. Д., Барсуков Л. И., Дубровина Н. И., Быстров В. Ф. (1970) Докл. АН СССР, 194, 708-710.
4. Bergelson L. D. (1978) Meth. Membr. Biol., 9, 275-335.
5. Case G. D. (1975) Biochim. et biophys. acta, 375, 69-86.
6. Dawson R. M. C. (1965) Biochem. J., 88, 414-420.
7. Corey E. J., Andersen N. H., Carlson R. M., Paust J., Veolejs J. R. E., Vlattas I., Winter R. E. K. (1968) J. Amer. Chem. Soc., 90, 3245-3247.
8. Безуглов В. В., Бергельсон Л. Д. (1980) Докл. АН СССР, 250, 468-469.
9. Klein R. A. (1970) Biochim. et biophys. acta, 210, 468-489.

Поступило в редакцию
23.VIII.1980

STUDY OF IONOPHORIC PROPERTIES OF PROSTAGLANDINS BY NMR SPECTROSCOPY

BEZUGLOV V. V., VICTOROV A. V., BERGELSON L. D.

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

The transfer of manganese ions across the membranes of sonicated phosphatidylcholine vesicles promoted by prostaglandins (PG) of different types was measured by PMR spectroscopy. The ionophoric activity of various PGs was found to decrease in the following series: 15-fluoro-15-deoxy PG F_{2α}>PGF₂>PGF_{2α}>PGA₂.