



УДК 547.96:541.6

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТИОННЫХ АНАЛОГОВ ФОСФОЛИПИДОВ В ИССЛЕДОВАНИИ МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАН С ПОМОЩЬЮ $^{31}\text{P}$ -ЯМР

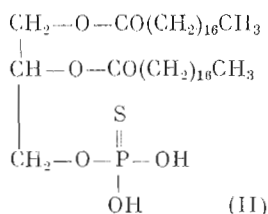
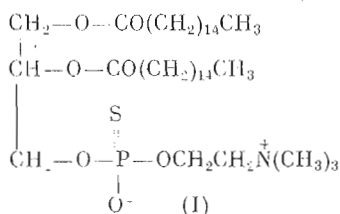
*Чупин В. В., Василенко И. А., Серебренникова Г. А.,  
Евстигнеева Р. П.*

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

Показана возможность использования тионных аналогов фосфолипидов в изучении полиморфных превращений гидратированных липидных систем методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. Определен состав внутримембранных частиц, образующихся при действии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на липосомальную мембрану, содержащую дифосфатидилглицерин и фосфатидилхолин. Изучено полиморфное поведение мембран, содержащих фосфатидную и тионфосфатидную кислоты.

Спектроскопия  $^{31}\text{P}$ -ЯМР нашла широкое применение в исследовании биологических мембран и их моделей [1—4]. Одним из наиболее перспективных направлений в использовании  $^{31}\text{P}$ -ЯМР является изучение полиморфизма фосфолипидов. Разработка удобной в экспериментальном отношении методики регистрации полиморфных превращений гидратированных липидных систем с помощью  $^{31}\text{P}$ -ЯМР [3] дала толчок целому ряду работ в этой области. Накопленные к настоящему времени экспериментальные результаты (см. обзор [5]) позволяют утверждать, что бислой не является единственно возможной формой организации липидов в мембранах. Липиды биологических мембран под действием некоторых факторов способны образовывать в бислой локальные участки гексагональной фазы, так называемые внутримембранные частицы липидной природы, присутствие которых оказывает значительное влияние на функционирование мембран [5].

Однако использование  $^{31}\text{P}$ -ЯМР в изучении биологических и модельных мембран сопряжено с целым рядом трудностей, прежде всего с невозможностью получения информации о поведении отдельных, химически индивидуальных фосфолипидов. Один из возможных подходов в решении этой задачи заключается в использовании тионных аналогов фосфолипидов, кислородный атом в фосфатном остатке которых замещен на серу:



Химические сдвиги ядер  $^{31}\text{P}$  тионфосфолипидов и фосфолипидов природной структуры различаются более чем на 50 м.д. Это позволяет дифференцировать тионфосфолипиды с помощью  $^{31}\text{P}$ -ЯМР даже в составе липосомальных и биологических мембран, где ширина сигналов достигает 50 м.д.

Ранее нами была показана принципиальная возможность использования тионфосфолипидов в исследовании мембран [6], а также изучен фазовый переход гель — жидкий кристалл в бинарной везикулярной мембране, содержащей наряду с тионфосфатидилхолином фосфатидилхолин природной структуры [7]. Целью данной работы является исследование полиморфных превращений неозвученных водных дисперсий, в состав которых входят тионфосфолипиды (I), (II).

Методика регистрации полиморфных превращений гидратированных липидных систем с помощью  $^{31}\text{P}$ -ЯМР теоретически разработана и подтверждена экспериментально лишь в случае фосфолипидов — диаэфиров ортофосфорной кислоты [3]. Применение данной методики при изучении свойств липидных дисперсий, содержащих тионфосфолипиды, требует определенной осторожности. Полученные нами экспериментально спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР неозвученных водных дисперсий 1,2-дипальмитоил-глицеро-3-тионфосфохолина (I) и яичного фосфатидилхолина существенно не различаются (рис. 1). Поэтому для изучения полиморфизма тионфосфолипидов можно использовать методику  $^{31}\text{P}$ -ЯМР в том виде, в котором она была теоретически разработана для фосфолипидов, являющихся диаэфирами ортофосфорной кислоты.

В спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР неозвученной водной дисперсии тионфосфатидилхолина (I) наблюдается сигнал, имеющий плечо, направленное в сторону слабого поля, и анизотропией химического сдвига порядка 40 м.д. (рис. 1а). Параметры данного спектра достаточно хорошо соответствуют параметрам спектра  $^{31}\text{P}$ -ЯМР неозвученной водной дисперсии яичного фосфатидилхолина (рис. 1б). В спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР неозвученных водных дисперсий, содержащих смесь природных фосфолипидов различных классов, наблюдается суммарный сигнал ядер  $^{31}\text{P}$  фосфолипидов. В случае же липосомальной мембраны, в состав которой наряду с яичным фосфатидилхолином входит его тионный аналог, в спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР наблюдаются два сигнала (рис. 1в). Один из сигналов отвечает яичному фосфатидилхолину, другой — тионфосфатидилхолину (I). Таким образом,  $^{31}\text{P}$ -ЯМР позволяет дифференцированно следить за поведением фосфолипидов природной структуры и их тионных аналогов.

Полиморфизм модельных мембран, содержащих несколько фосфолипидов различных классов, наиболее подробно изучен в случае смеси дифосфатидилглицерин — фосфатидилхолин [4, 8]. Методами электронной микроскопии и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР было показано, что данная смесь в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  образует внутримембранные частицы липидной природы. Образование таких внутримембранных частиц сопровождается появлением в спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР узкого симметричного сигнала [4]. Однако ни электронная микроскопия, ни спектроскопия  $^{31}\text{P}$ -ЯМР не дают ответа на вопрос о липидном составе внутримембранных частиц.

Для решения этой задачи нами было проведено исследование полиморфного поведения неозвученной водной дисперсии смеси дифосфатидилглицерина, выделенного из сердец крупного рогатого скота, и тионфосфатидилхолина (I). По данным  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, смесь данных фосфолипидов образует в воде агрегаты ламеллярной структуры: каждый из сигналов имеет плечо, направленное в сторону слабого поля, анизотропия химического сдвига составляет величину порядка 40 м.д. (рис. 2а). При добавлении к такой дисперсии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР наблюдается появление узких симметричных сигналов (рис. 2б) подобно тому, как это происходит в случае смеси дифосфатидилглицерина и фосфатидилхолина природной структуры. Это свидетельствует о нарушении бислоистой организации липидов в мембране и образовании внутримембранных частиц. При этом

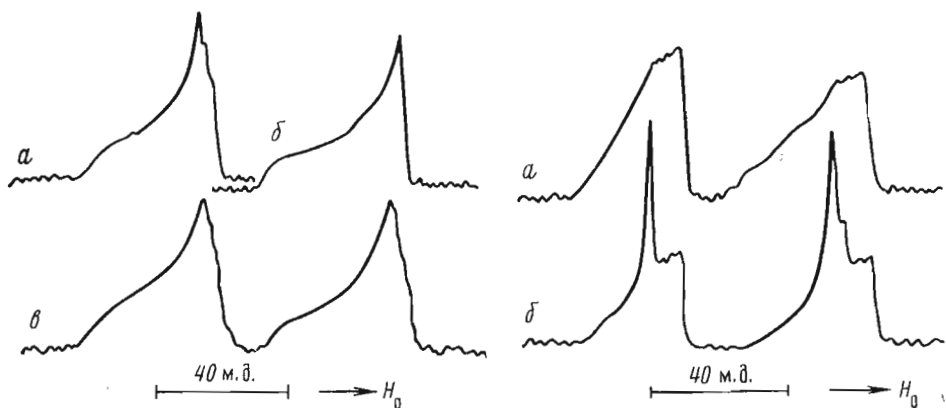


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР неозвученных водных дисперсий при  $42^\circ\text{C}$ : *a* — 1,2-дипальмитоил-*rac*-глицеро-3-тионфосфохолина (I); *б* — яичного фосфатидилхолина; *в* — смеси 1,2-дипальмитоил-*rac*-глицеро-3-тионфосфохолина (I) и яичного фосфатидилхолина

Рис. 2. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР неозвученной водной дисперсии смеси дифосфатидилглицерина и тионфосфатидилхолина (I), 1:2 (мол.) при  $40^\circ\text{C}$ : *a* — в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ; *б* — в присутствии эквимольного по отношению к дифосфатидилглицерину количества ионов  $\text{Ca}^{2+}$

изменяются параметры сигналов, а следовательно, и полиморфное состояние как дифосфатидилглицерина, так и тионфосфатидилхолина (I). Отсюда следует, что наряду с дифосфатидилглицерином в состав внутримембранных частиц входят и молекулы фосфатидилхолина.

Другим примером использования тионных аналогов фосфолипидов в исследовании полиморфных превращений является изучение неозвученной водной дисперсии смеси фосфатидилхолина и фосфатидной кислоты. В спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР водной дисперсии смеси яичного фосфатидилхолина и 1,2-дистеароил-*rac*-глицеро-3-тионфосфатидной кислоты (II), взятых в мольном отношении 2:1, наблюдаются два сигнала (рис. 3*а, б*). Параметры и форма сигнала ядер  $^{31}\text{P}$  фосфатидилхолина указывают на бислойную организацию липидных молекул при  $15^\circ\text{C}$  (рис. 3*а*). Повышение температуры приводит к разрушению бислойной структуры агрегатов, что находит свое выражение в появлении узкого симметричного пика в сигнале, отвечающем фосфатидилхолину (рис. 3*б*). Такой пик соответствует липидным молекулам, способным к быстрому (во временной шкале  $^{31}\text{P}$ -ЯМР) изотропному движению. Интересно, что повышение температуры приводит к заметному уширению сигнала, отвечающего тионфосфатидной кислоте (рис. 3*а, б*). При понижении температуры эта липидная система возвращается в исходное состояние.

Сходными свойствами обладает и неозвученная водная дисперсия смеси фосфатидной кислоты природной структуры (1,2-дипальмитоил-*rac*-глицеро-3-фосфатидная кислота) и яичного фосфатидилхолина. В этом случае также наблюдается термотропный переход ламеллярной фазы в «изотропную» (рис. 3*б, в*). Однако в отличие от дисперсий, содержащих тионфосфатидную кислоту, этот переход необратим.

Как уже отмечалось выше, методика регистрации полиморфных превращений гидратированных липидных систем с помощью  $^{31}\text{P}$ -ЯМР была разработана лишь для фосфолипидов, являющихся диэфирами ортофосфорной кислоты. Теоретический расчет спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР фосфолипидных агрегатов различной структуры проводили, исходя из значений составляющих тензора анизотропии химического сдвига, определенных из спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР поликристаллических образцов. В случае фосфодиэфиров

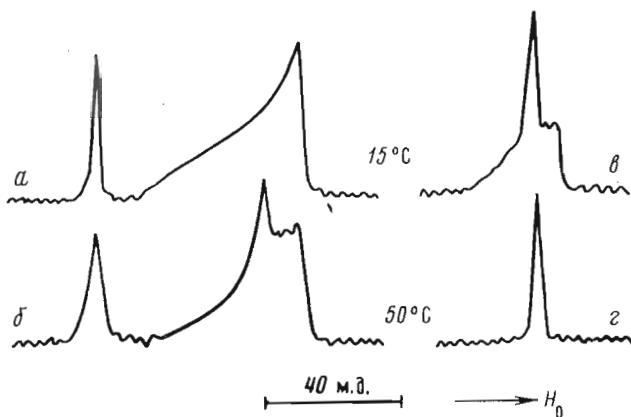


Рис. 3. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР неозвученных водных дисперсий смеси: а, б — 1,2-дистеароил-*гас*-глицеро-3-тионфосфатидной кислоты (II) и яичного фосфатидилхолина, 1:2 (мол.); в, г — 1,2-дипальмитоил-*гас*-глицеро-3-фосфатидной кислоты и яичного фосфатидилхолина, 1:2 (мол.) при различных температурах

значения составляющих тензора анизотропии химического сдвига оказались равными  $\sigma_{11} = -80$  м.д.,  $\sigma_{22} = -20$  м.д.,  $\sigma_{33} = +110$  м.д.; моноэфиров —  $\sigma_{11} = -40$  м.д.,  $\sigma_{22} = -4$  м.д.,  $\sigma_{33} = +48$  м.д. [3]. Поэтому не исключено, что фосфолипиды, являющиеся моноэфирами ортофосфорной кислоты, в составе агрегатов ламеллярной структуры могут давать узкий симметричный сигнал. Это до некоторой степени подтверждается тем фактом, что именно такой сигнал в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР смеси фосфатидилхолин — тионфосфатидная (фосфатидная) кислота отвечает молекулам тионфосфатидной кислоты (рис. 3а) и, возможно, фосфатидной кислоте (рис. 3в). Подобный сигнал наблюдается и в случае «изотропной» фазы фосфолипидов — диэфиров ортофосфорной кислоты. Это усложняет интерпретацию спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР при изучении полиморфизма мембран, содержащих фосфолипиды — моноэфиры ортофосфорной кислоты. Следует подчеркнуть, что для подтверждения выдвинутых здесь предположений о параметрах спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР липидов, являющихся моноэфирами ортофосфорной кислоты, необходимы дополнительные эксперименты, в том числе и с применением тионфосфолипидов.

Использование тионных аналогов фосфолипидов в исследовании мембран на настоящий момент является единственным подходом, позволяющим дифференцированно следить за полиморфным поведением отдельных, химически индивидуальных липидов. Применение этого подхода может оказать существенную помощь в решении ряда задач, связанных со структурными и функциональными особенностями биологических мембран.

### Экспериментальная часть

В работе использовались хроматографически чистые фосфолипиды. Яичный фосфатидилхолин выделяли по методу [9], дифосфатидилглицерин был выделен из сердец крупного рогатого скота по методу [10]. Синтез 1,2-дипальмитоил-*гас*-глицеро-3-тионфосфохолина (I) [11], 1,2-дистеароил-*гас*-глицеро-3-тионфосфатидной кислоты (II) [12], 1,2-дипальмитоил-*гас*-глицеро-3-фосфатидной кислоты [13] был осуществлен по ранее описанным методам.

Образцы для получения спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР готовили механическим диспергированием 150–200 мг фосфолипидов в 2 мл  $\text{D}_2\text{O}$ . Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР

снимали на импульсном фурье-спектрометре WP-60 (Bruker, ФРГ) с рабочей частотой 24,28 МГц, при широкополосной развязке от протонов. Количество накоплений — 20 000—30 000.

Авторы выражают благодарность проф. Э. Е. Нифантьеву и доц. Д. А. Предводителеву (МГПИ им. В. И. Ленина) за предоставленные тиофосфолипиды.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Cullis P. R., de Kruijff B.* Polymorphic phase behaviour of lipid mixtures as detected by  $^{31}\text{P}$  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. *Steir A., Finsh S. A. E., Bosterling B.* Non-lamellar structure in rabbit liver microsomal membranes. A  $^{31}\text{P}$  NMR study.— *FEBS Lett.*, 1978, v. 91, № 1, p. 109—112.
3. *Seelig J.*  $^{31}\text{P}$  Nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes.— *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 515, № 2, p. 105—140.
4. *De Kruijff B., Verkley A. J., van Echteld C. J. A., Gerritsen W. J., Mommers C., Noordam P. C., de Gier J.* The occurrence of lipid particles in lipid bilayers as seen by  $^{31}\text{P}$  NMR and freeze-fracture electron-microscopy.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 555, № 2, p. 200—209.
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. *Чупин В. В., Василенко И. А., Предводителев Д. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П.* Использование тиофосфатидилхолина в исследовании фосфолипидных мембран с помощью  $^{31}\text{P}$ -ЯМР.— Докл. АН СССР, 1979, т. 248, № 1, с. 235—237.
7. *Чупин В. В., Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П.* Изучение с помощью  $^{31}\text{P}$ -ЯМР фазовых переходов в одно- и двухкомпонентных фосфатидилхолиновых мембранах.— Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1219—1224.
8. *Vail M. J., Stollery J. G.* Phase changes of cardiolipin vesicles mediated by divalent cation.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 551, № 1, p. 74—84.
9. *Dawson R. M. E.* The mechanism of action of phospholipase A.— *Biochem. J.*, 1965, v. 88, № 3, p. 414—420.
10. *Rose H. D.* Studies on the molecular structure of rat liver cardiolipin.— *Biochim. et biophys. acta*, 1964, v. 84, № 1, p. 109—115.
11. *Нифантьев Э. Е., Предводителев Д. А., Аларкон Х. Х.* Синтез липидов и их моделей на основе алкилфосфитов глицерина. II. Фосфатидилхолины и их аналоги.— Ж. орган. химии, 1978, т. 14, № 1, с. 63—71.
12. *Нифантьев Э. Е., Предводителев Д. А., Смирнова Л. И., Фурсенко И. В.* Ацилирование ацетатей и кеталей глицеринов. Новый синтез 1,2- и 1,3-диацилбензилглицеринов и фосфатидных кислот.— Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1346—1354.
13. *Vaer E., Buchnea D.* Synthesis of unsaturated  $\alpha$ -phosphatidic acids and  $\alpha$ -bisphosphatidic acids.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1958, v. 78, № 2, p. 294—301.

Поступила в редакцию  
29.VII.1980

#### USE OF THIOANALOGS OF PHOSPHOLIPIDS IN $^{31}\text{P}$ NMR STUDIES OF MODEL MEMBRANES

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

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

A potency of thioanalogs of phospholipids was demonstrated for studying polymorphic transformations of hydrated lipid systems by means of  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. Analysis was made of the composition of intramembrane particles formed upon the action of  $\text{Ca}^{2+}$  ions on liposome membrane containing diphosphatidylglycerol and phosphatidylcholine. The polymorphic behaviour of membranes containing phosphatidic and thiophosphatidic acid was studied.