



УДК 547.953.2'672.7.07

ПЕРИЛЕНОИЛМЕЧЕННЫЕ ЛИПИД-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ*Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Описан синтез флуоресцентных зондов — триглицерида, фосфатидилхолина и сфингомиелина, содержащих новую метку — 3-периленоильный флуорофор. Зонды имеют максимум возбуждения при 450 нм, а положение их максимума испускания (479–545 нм) изменяется в зависимости от полярности среды. Эти параметры дают возможность применять периленоилмеченные липиды в качестве акцепторов энергии возбуждения антрильной группы, входящей в состав ранее синтезированных липидных зондов, что открывает новые возможности для изучения липид-липидных взаимодействий. Кроме того, периленоилмеченные липиды перспективны как красители для цитологических исследований.

Флуоресцентные липофильные зонды получили широкое распространение (см., например, монографию [1]). Особенно успешным оказалось использование специфических липидных зондов, которые представляют собой природные липиды, содержащие флуоресцентную метку. Их преимущество перед неспецифическими зондами в том, что они по своим свойствам близко имитируют соответствующие липиды и ведут себя подобно последним в биологических системах. Недавно мы сообщали о синтезах фосфолипидных зондов — фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина, содержащих на конце одной из жирнокислотных цепей дансильный или антрильный остаток [2–4]. Для изучения мембран антрилмеченные зонды оказались более подходящими, чем дансилмеченные, так как в отличие от дансильного остатка неполярная антрильная группа располагается всегда в глубине бислоя и мало возмущает область полярных групп [4]. Антрильный флуорофор — хороший акцептор энергии возбуждения триптофанового остатка, что позволяет использовать антрилсодержащие зонды для изучения взаимодействия липидов с белками, содержащими триптофан; таким путем нами было изучено распределение фосфатидилхолина и сфингомиелина в липопротеинах высокой плотности из человеческой плазмы [5].

Для дальнейшего развития работ в этом направлении представлялось целесообразным получить флуоресцентные липидные зонды, пригодные для изучения липид-липидных взаимодействий в сочетании с уже имеющимися антрилмечеными липидами, т. е. зонды, способные акцептировать энергию возбуждения антрильного флуорофора. Для этого флуорофор новых зондов должен был бы быть малополярной группировкой с максимумом возбуждения, приходящимся на область испускания антрила (400–450 нм). Желательным было также, чтобы зонды с новой меткой возбуждались ближе к длинноволновому концу указанной области, что давало бы возможность эффективно использовать их в цитологических исследованиях, применяя флуоресцентную микроскопию и автоматические сортировщики клеток.

После некоторых поисков мы остановились на 3-периленоильной группировке, легко образующейся при ацилировании перилена хлорангтридами кислот. Хотя вещества, содержащие 3-периленоильную группировку, известны давно [6], они, насколько нам известно, в качестве флуоресцентных зондов не применялись. Для того чтобы флуоресцентномеченный жирнокислотный остаток имел длину, близкую длине цепи большинства природных жирных кислот, входящих в липиды биологических мембран (кис-

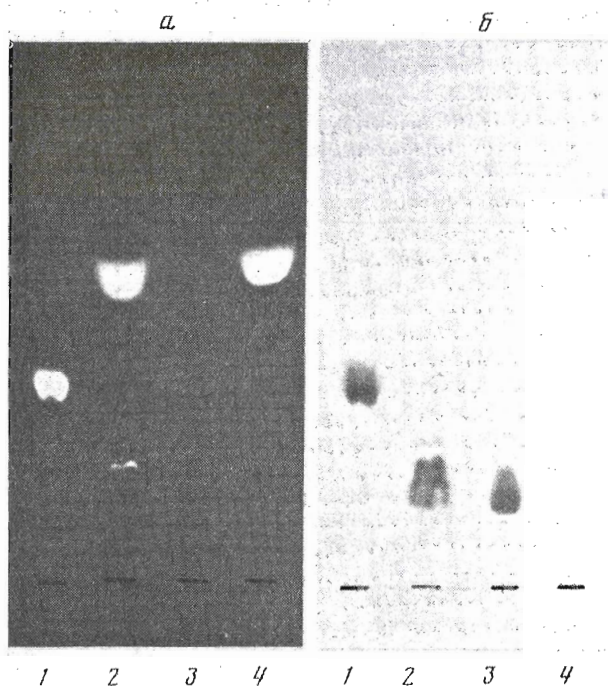


Рис. 1. ТСХ на силикагеле в системе хлороформ – метанол – конц. NH_4OH , 65:35:5; съемка через двукратный желтый светофильтр. *a* – в УФ-свете, *б* – после опрыскивания молибденовым синим: 1 – исходный субстрат для расщепления фосфолипазой A_2 – смесь яичного фосфатидилхолина и фосфатидилхолина (V), 9:1; 2 – та же смесь после расщепления; 3 – яичный лизофосфатидилхолин; 4 – перилеиноилмеченая кислота (III)

Синтезированный таким путем триглицерид – *rac*-1,2-диолеоил-3-[9-(3-перилеиноил)нонаноил]глицерин (IV) в отличие от кислоты (III) хорошо растворим в малополярных органических растворителях (бензол, хлороформ, дихлорметан).

Приступая к синтезу перилеиноилмеченого фосфатидилхолина (IV), мы опасались, что, ацилируя лизофосфатидилхолин кислотой в присутствии дициклогексилкарбодимиды и 4-диметиламинопиридина, мы получим частично рацемизованный продукт. В одной из наших предыдущих работ мы применили этот метод для ацилирования лизофосфатидилхолина [^{14}C] олеиновой кислотой и определили, что полученный фосфатидилхолин не расщепляется целиком фосфолипазой A_2 , а образовавшийся лизофосфатидилхолин содержит значительное количество меченой кислоты. Это могло служить указанием на частичную рацемизацию хирального глицеринового остатка и частичную ацильную миграцию, происходящие при ацилировании указанным методом [11]. Однако фосфатидилхолин (V), полученный нами в настоящей работе по этому же методу, как оказалось, целиком расщепляется при ферментализе фосфолипазой A_2 змеяного яда, т. е. полностью сохраняет оптическую чистоту. В то же время около 4% перилеиноилмеченой кислоты оказалось в лизолецитине (рис. 1). Очевидно, что при получении лизолецитина или при его ацилировании происходит в небольшой степени ацильная миграция. Такая миграция, по-видимому, имеет место при любом методе химического ацилирования лизолецитина. Так, при ацилировании лизолецитина имидазолом спин-меченой жирной кислоты миграция достигала 25% [12]. Вероятно, полученный нами ранее фосфатидилхолин [11] оказался частично рацемическим оттого, что частично рацемическим был исходный лизофосфатидилхолин.

Перилеиноилмеченые фосфатидилхолин (V) и сфингомиелин (VI) (оранжевые воскообразные вещества) по растворимости в бензоле и хлороформе оказались близкими к сфингомиелину бычьего мозга.

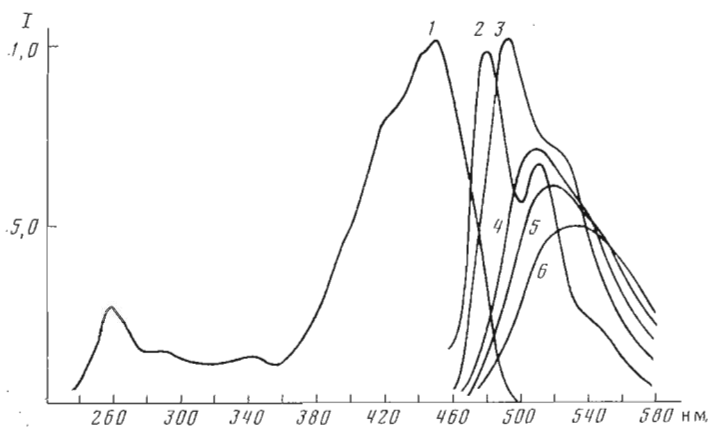


Рис. 2. Флуоресцентные спектры триглицеридного зонда (IV), снятые при 25° С, концентрация 20 мкг/мл. 1 — спектр возбуждения в изопропанол, $\lambda_{\text{исп}}$ 540 нм; спектры испускания ($\lambda_{\text{возб}}$ 450 нм): 2 — в гексане, 3 — в диоксане, 4 — в диметилформамиде, 5 — в изопропанол, 6 — в метаноле

Положение максимумов возбуждения и испускания и интенсивность флуоресценции кислоты (III), ее эфира (II) и периленоилмеченых липидов (IV—VI) в органических растворителях практически одинаковы; на рис. 2 приведены спектры возбуждения и испускания флуоресцентного триглицерида (IV), а положения максимумов его испускания в различных растворителях указаны в таблице.

Сам перилен ранее неоднократно применялся в мембранных исследованиях в качестве зонда (см., например, работы, цитируемые в книге [1]). Недостаток его — частичное перекрывание спектров поглощения и флуоресценции [13] при практически полном совпадении длин волн главных максимумов обоих спектров (около 435 нм). 3-Периленоильному хромофору такое перекрывание свойственно в гораздо меньшей степени. Он имеет кроме обычного для ароматических соединений максимума поглощения при 260 нм близкий по интенсивности максимум при 446 нм; аналогичные максимумы имеет спектр возбуждения (рис. 2). Спектр испускания периленоильной группы зависит от полярности среды (см. таблицу и рис. 2) — положение максимума меняется от 479 нм в гексане до 545 нм в глицерине. При этом в малополярных средах имеется дополнительный максимум или плечо при 510–540 нм. Зависимость положения максимума испускания от полярности среды является дополнительным преимуществом флуорофора, позволяющим оценивать полярность его микроокружения.

Достаточно высокая величина поляризации флуоресценции зонда (IV) в вязкой среде (0,21 в глицерине при 20° С) указывает на то, что время жизни возбужденного состояния 3-периленоильной группы составляет не более 10 нс. Это позволяет применять поляризационные измерения с периленоильными зондами в мембранных исследованиях.

Положения максимумов испускания периленоилмеченого триглицерида (IV) в органических растворителях
25° С, концентрация 20 мкг/мл, $\lambda_{\text{возб}}$ 450 нм

Растворитель	$\lambda_{\text{исп}}$, нм	Растворитель	$\lambda_{\text{исп}}$, нм
Гексан	479, 510	Диметилформамид	507
Толуол	495 (плечо 520)	Изопропанол	516
Хлороформ	506	Этанол	527
Диоксан	490 (плечо 520)	Метанол	533
Ацетон	500	Глицерин	545

Температуры плавления определены по блоку Кофлера и не исправлены. ИК-спектры измеряли на приборе «Sperord 75 IR» (Carl Zeiss, ГДР), УФ-спектры — на спектрофотометре «Beckman Acta M VI» (США), масс-спектр — на спектрометре LKB-9000 (Швеция), спектры флуоресценции (корректированы) — на флуориметре «Aminco SPF-1000» (США). Удаление растворителей проводили в вакууме при температуре не более 40° С. Для колоночной хроматографии применяли силикагель КСК (фракция 100—150 меш), для ТСХ — пластинки с микросиликагелем КСК [14]. Для обнаружения веществ на хроматограммах использовали: флуоресценцию при УФ-облучении (а), фосфорномолибденовую кислоту (б), молибденовый синий [15] (в) и реактив Драгендорфа (г). ВЭЖХ проводили на приборе «Рус Unicam LCM-2» (Англия) с детектором UV-20 (254 нм) при скорости потока 1 мл/мин. Периллин и 4-диметиламинопиридин (Fluka, Швейцария) использовали без дополнительной очистки. 1,2-Диолеин (Sigma, США) перед применением очищали хроматографией на силикагеле в градиентной системе петролейный эфир — этилацетат. Лизофосфатидилхолин из яичного фосфатидилхолина и сфингозин-1-фосфохолин из сфингомиелина бычьего мозга получали как описано ранее [4]. Дихлорацетид себадиновой кислоты синтезировали ее кипячением (6 ч) с избытком хлористого тионила в четыреххлористом углероде с последующей перегонкой в вакууме. Для вновь синтезированных веществ получено удовлетворительное совпадение данных элементного анализа с теоретически вычисленными значениями; для фосфолипидов (V) и (VI) анализ проводился только на содержание фосфора (по методу [16]). С перилленоплечеными веществами работали при слабом свете лампы накаливания.

Метилловый эфир 9-(3-периленоил)нонановой кислоты (II). К раствору 1,7 г дихлорацетид себадиновой кислоты в 20 мл сухого свежеперегнанного нитрометана добавляли 0,6 г безводного хлористого алюминия, смесь охлаждали до -5° С и прибавляли в течение 10 мин четыремя равными порциями 1 г тонкоизмельченного перилена, после чего перемешивали еще 30 мин при температуре от -4 до -6° С. Охлаждали смесь до -20° С, прибавляли сразу 30 мл охлажденного до -20° С метанола, перемешивали до достижения комнатной температуры и еще 1 ч (всего около 2 ч). Затем смесь разбавляли 100 мл толуола и 100 мл эфира, промывали водой (2×50 мл) и насыщенным раствором NaCl (2×50 мл), сушили CaSO₄, фильтровали, осадок промывали дихлорметаном и фильтрат упаривали. Остаток (2,6 г) хроматографировали на колонке с 140 г силикагеля, элюируя сначала системой гексан — толуол (1:1), затем толуолом и смесью толуол — хлороформ (1:1), состав фракций контролировали ТСХ в системе толуол — этилацетат — CH₃COOH, 50:5:1 (обнаружение: а, б). Получали 0,26 г непрореагировавшего перилена и 0,50 г (25%) эфира (II) в виде темно-оранжевых кристаллов, т.пл. 139—140° С (из дихлорметана — гексана), R_f 0,55; УФ (этанол), λ_{макс}, нм (ε): 259 (29 100), 447 (23 800); ИК (вазелиновое масло, ν, см⁻¹): 3070 сл (ArH), 1736 с (COOR), 1670 (ArCO), 1595 ср, 1580 ср (Ar). Характерные интенсивные пики в масс-спектре, m/z: 450 (M⁺) (максимальный), 294 [C₂₀H₁₁C(OH)CH₂]⁺, 279 (C₂₀H₁₁CO⁺), 251 (C₂₀H₁₁⁺).

9-(3-Периленоил)нонановая кислота (III). К раствору 0,35 г эфира (II) в 10 мл изопропанола при 70° С прибавляли 4 мл 1 н. NaOH, выдерживали 1 ч при 70° С, охлаждали, подкисляли 1 н. HCl и выдерживали 16 ч при 5° С. Выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали водой и высушивали в вакууме. Для отделения от примеси темно-красного вещества (предположительно продукт окисления), более полярного, чем кислота (III), при ТСХ в системе бензол — этилацетат — CH₃COOH, 50:5:1, R_f соответственно 0,4 и 0,2 (обнаружение: а, б), продукт хроматографировали на колонке с 20 г силикагеля в системе хлороформ — этилацетат — CH₃COOH, 19:1:0,1, контролируя состав фракций ТСХ. Получали 0,22 г кислоты (III) в виде красного кристаллического порошка, т.пл. 194—196° С (т.пл. не изменилась после кристаллизации вещества из хлорофор-

ма), индивидуальной, по данным ТСХ и ВЭЖХ на колонке (4,5×250 мм) с силикагелем марки «Silasorb 600» (Chemapol, ЧССР) в системе гексан — хлороформ — CH_3COOH , 50 : 50 : 2, k' 0,74. ИК (вазелиновое масло, ν , см^{-1}): 3200—2500 с шир, 1715 с (COOH), 1675 с (AgCO), 1585 с_p, 1570 с_p (Ar).

гас-1,2-Диолеил-3-[9-(3-периленоил)нонаноил]глицерин (IV). К раствору 10 мг 1,2-диолеина, 7 мг кислоты (III), 5 мкл триэтиламина и 1 мг 4-диметиламинопиридина в 0,3 мл сухого дихлорметана прибавляли 35 мкл 10% раствора дициклогексилкарбодимиды в CCl_4 , перемешивали 8 ч при 20° С, добавляли еще 20 мкл раствора дициклогексилкарбодимиды, перемешивали 5 ч и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с 1,5 г силикагеля в толуоле, получали 9 мг (54%) триглицерида (IV) в виде оранжевого масла, индивидуально хроматографически (ТСХ в системе толуол — этилацетат, 12 : 1, обнаружение: а, б), R_f 0,6. УФ (этанол), $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ): 257 (28 900), 446 (23 500); характеристические полосы в ИК-спектре те же, что и у эфира (II). Флуоресцентные данные приведены в таблице и на рис. 2.

1-Ацил-2-[9-(3-периленоил)нонаноил]-sn-глицеро-3-фосфохолин (V). В круглодонную колбу емкостью 10 мл помещали 2 г стеклянных шариков диаметром 0,15 мм, колбу выдерживали при 200° С/2 кПа, заполняли аргоном и охлаждали до 20° С. Вносили в колбу раствор свежеприготовленного яичного лизофосфатидилхолина (45 мг) в 3 мл смеси хлороформ — метанол, 2 : 1, и упаривали в вакууме, после чего выдерживали 4 ч в вакууме (10 Па) при 20° С. К содержимому колбы прибавляли 60 мг кислоты (III), 16 мг 4-диметиламинопиридина, 50 мкл сухого триэтиламина, 3 мл абсолютного хлороформа, перемешивали 3 мин в атмосфере аргона (для перемешивания применяли роторный испытатель), прибавляли 150 мкл 20% раствора дициклогексилкарбодимиды в CCl_4 , перемешивали 10 ч при 20° С, оставляли на ночь, затем к смеси прибавляли еще 100 мкл раствора дициклогексилкарбодимиды и перемешивали 10 ч. После разбавления 10 мл хлороформа смесь промывали 1% HCl с 1% NaCl (2×3 мл), 1% NaCl (2×3 мл; разделение фаз центрифугированием) и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с 4 г силикагеля в градиенте хлороформ — метанол, получали 45 мг (54%) периленоилмеченого фосфатидилхолина (V) в виде оранжево-красной аморфной массы, индивидуальной хроматографически и имеющей одинаковую с яичным фосфатидилхолином подвижность при ТСХ в системах хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4, R_f 0,4, хлороформ — метанол — конц. NH_4OH , 65 : 35 : 5, R_f 0,5, и хлороформ — метанол — CH_3COOH — вода, 25 : 70 : 25 : 4, R_f 0,3 (обнаружение: а, в, г). УФ-спектр фосфолипида (V) повторяет спектр эфира (II).

N-[9-(3-Периленоил)нонаноил]сфингозин-1-фосфохолин (VI). 32 мг сфингозин-1-фосфохолина растворяли при слабом нагревании в 0,7 мл изопропанола и 0,2 мл хлороформа, к раствору при комнатной температуре прибавляли раствор 30 мг кислоты (III) в 0,8 мл хлороформа и 0,15 мл триэтиламина, затем 5 мг 4-диметиламинопиридина и 85 мкл 20% раствора дициклогексилкарбодимиды в CCl_4 , смесь перемешивали 1 ч, оставляли на ночь, добавляли еще 40 мкл раствора дициклогексилкарбодимиды, выдерживали 1 сут, затем обрабатывали и хроматографировали, как описано для фосфатидилхолина (V). Получали 25 мг (42%) сфингомиелина (VI) в виде аморфной красной массы. Вещество при ТСХ в нейтральной (R_f 0,3) и основной (R_f 0,4) системах (см. предыдущую методику) мигрирует в виде двух рядом расположенных пятен, что вызвано присутствием в исходном сфингозин-1-фосфохолине насыщенного (сфинганинового) компонента (подробнее об этом см. [4]).

Расщепление периленоилмеченого фосфатидилхолина (V) фосфолипазой A_2 змеиного яда. В пробирке объемом 2 мл выпаривали 9 мкл 1% бензольного раствора яичного фосфатидилхолина и 10 мкл 0,1% раствора флуоресцентного фосфатидилхолина (V) в хлороформе; при этом фосфолипид распределялся тонким слоем на дне пробирки. К нему добавляли 50 мкл свежеперегнанного эфира и 10 мкл раствора неочищенного фермен-

та (1 мг лиофилизированного яда кобры *Naja naja oxiana* растворяли в 1 мл 0,05 М трис-НСl, содержащего 15 мМ CaCl₂, рН 7,6), смесь встряхивали под аргоном 30 мин при 35° С, лиофилизировали, остаток тщательно растирали со смесью хлороформ — метанол, 2 : 1, и разделяли ТСХ на силикагеле (пластинка 5×10 см) в системе хлороформ — метанол — конц. NH₄ОН (обнаружение: а, в, г). Фосфатидилхолин в реакционной смеси отсутствовал, зоны периленоилмеченой кислоты и лизофосфатидилхолина (при обнаружении а) элюировали смесью хлороформ — метанол — вода, 5 : 5 : 1. Количество периленоилсодержащего вещества во второй зоне, определенное по поглощению при 446 нм, составляло не более 4% от количества кислоты (III).

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980.
2. Молотковский Юл. Г., Дмитриев П. И., Нижулина Л. Ф., Бергельсон Л. Д. Биоорганич. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 588—594.
3. Молотковский Юл. Г., Унковский В. И., Бергельсон Л. Д. Биоорганич. химия, 1980, т. 6, № 1, с. 144—145.
4. Молотковский Юл. Г., Дмитриев П. И., Молотковская П. М., Бергельсон Л. Д., Маневич Е. М. Биоорганич. химия, 1981, т. 7, № 4, с. 586—600.
5. Молотковский Юл. Г., Бергельсон Л. Д., Маневич Е. М., Герасимова Е. Н., Полеский В. А. Биоорганич. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1395—1403.
6. Gore P. H. Chem. Revs, 1955, v. 55, № 2, p. 229—281.
7. Zinke A., Troger H., Ziegler E. Ber., 1940. B. 75, № 10, S. 1042—1048.
8. Selinger Z., Lapidot Y. J. Lipid Res., 1966, v. 7, № 1, p. 174—175.
9. Hassner A., Alexanian V. Tetrahedron Lett., 1978, № 46, p. 4475—4478.
10. Neises B., Steglich W. Angew. Chem. Int. Ed., 1978, v. 17, № 7, p. 522—524.
11. Молотковский Юл. Г., Лазуркина Т. Ю., Фаерман В. Н., Смоляков В. С., Бергельсон Л. Д. Биоорганич. химия, 1980, т. 6, № 4, с. 594—599.
12. London E., Feigenson G. W. Biochemistry, 1981, v. 20, № 7, p. 1932—1938.
13. Shinitzky M., Dianoux A.-C., Gutter C., Weber G. Biochemistry, 1971, v. 10, № 11, p. 2107—2113.
14. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. J. Chromatogr., 1972, v. 67, № 2, p. 376—378.
15. Vaskovsky V. E., Kostelsky V. Y., Vasendin I. M. J. Chromatogr., 1975, v. 114, № 1, p. 129—141.
16. Gerlach E., Deuticke B. Z. Physiol. Chem., 1963, B. 337, № 4, S. 477—479.

Поступила в редакцию
15.III.1982

PERYLENOYL-LABELED LIPID-SPECIFIC FLUORESCENT PROBES

MOLOTKOVSKY Jul. G., BERGELSON L. D.

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

A synthesis of fluorescent probes — triglyceride, phosphatidylcholine and sphingomyelin — with a new label, 3-perylenoyl fluorophore, is described. The probes have excitation maximum at 450 nm, the position of the emission maximum (479—545 nm) being dependent on the polarity of the medium. These parameters permit to employ perylenoyl-labeled lipids as acceptors of the excitation energy from the anthryl groups incorporated into the earlier synthesized lipid probes. This opens new possibilities for the investigation of lipid-lipid interactions and intermembrane phospholipid exchange. Perylenoyl-labeled lipids are also promising as fluorescent dyes in cytological studies.