



УДК 547.426 (241'466.3'+24'118).057

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКОГО РЕГУЛЯТОРА ОКСИГЕНАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА

*Ушакова И. П., Тузин М. Ю., Серебрянникова Г. А.,
Кольцова Г. Н.*, Вязова Е. П.*, Розенберг Г. Я.*,
Евстигнеева Р. П.*

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

**Центральный научно-исследовательский институт гематологии
и переливания крови, Москва*

Синтезирован рацемический 1-О-(ε-аминогексаноил)-2,3-дифосфоглицерин. Изучено изменение спектра ^{31}P -ЯМР циклогексиламмониевой соли данного соединения в зависимости от pH. Исследованы связывание полученного вещества с гемоглобином и его функциональная активность как регулятора обратимой оксигенации гемоглобина человека.

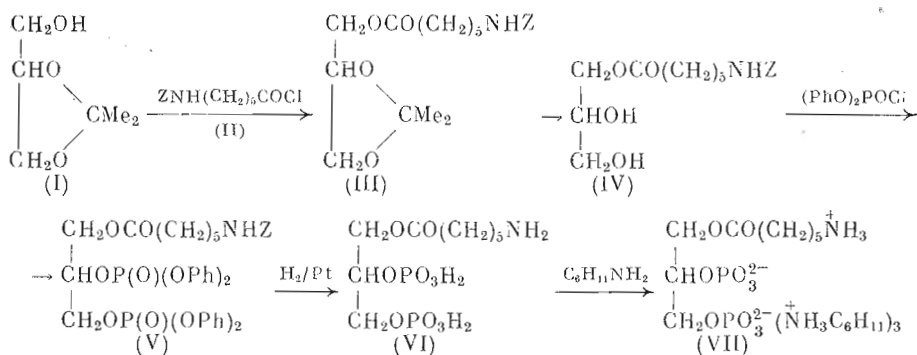
В последние годы показана возможность создания искусственного переносчика кислорода на основе гемоглобина человека [1–3]. Одним из важнейших условий эффективного транспорта кислорода таким внеэритроцитарным гемопротеидом является присутствие в системе переноса регулятора процесса обратимой оксигенации гемоглобина. В связи с этим целый ряд исследований посвящен изучению различных соединений в качестве таких регуляторов [4–9]. Установлено, что фосфорорганические соединения, содержащие от двух до шести фосфатных групп, снижают сродство гемоглобина к кислороду, т. е. регулируют процесс обратимой оксигенации гемоглобина [9]. Поэтому представлялось целесообразным испытать в качестве регулятора обратимой оксигенации человека производные 2,3-дифосфоглицерина, имеющие две фосфатные группы, расположенные так же, как у содержащегося в эритроцитах человека природного регулятора — 2,3-дифосфо-*D*-глицериновой кислоты [10, 11].

Выбор в качестве регулятора 1-О-(ε-аминогексаноил)-2,3-дифосфоглицерина (VI), содержащего в гидрофобной части молекулы NH_2 -группу, обусловлен тем, что данное соединение, обладающее потенциальной способностью к регуляции обратимой оксигенации, может также использоваться при изучении функционирования гемоглобина в модельных системах при присоединении к NH_2 -группе различных меток (флуоресцентных, спиновых).

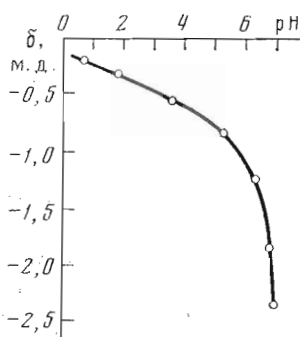
Соединение (VI) было синтезировано (см. схему) в рацемической форме, поскольку известно, что природная 2,3-дифосфо-*D*-глицериновая кислота и ее энантиомер не обнаруживают различий в процессе оксигенации-дезоксигенации [12].

Ацилированием изопропилиденглицерина (I) хлорангидридом *N*-бензилоксикарбонил-ε-аминокапроновой кислоты (II) [13] был синтезирован сложный эфир (III), изопропилиденовую группировку в котором удаляли кислотным гидролизом. Полученный 1-О-(*N*-бензилоксикарбонил-ε-аминогексаноил)глицерин (IV) охарактеризован данными ИК- и ПМР-спектров; отсутствие ацильной миграции при гидролизе установлено с помощью ТСХ на силикагеле, пропитанном борной кислотой [14].

Фосфорилирование соединения (IV) осуществляли дифенилхлорфосфатом [15], защитные фенильные группы с образовавшегося бисфосфотриэфира (V) удаляли каталитическим гидрированием на платиновом катализаторе в уксусной кислоте или метаноле [16].



Фосфат (VI) выделяли в виде циклогексиламмониевой соли. При этом возможно наличие нескольких ионных форм. Данные элементного анализа и свойства выделенного соединения указывают на то, что это трициклогексилламмониевая соль (VII). В спектре ^{31}P -ЯМР водного раствора соединения (VII) (рН 7,05–7,1) наблюдаются два сигнала ($-2,72$ (P²), $-2,37$ м.д.



Изменение химического сдвига сигнала P² спектра ^{31}P -ЯМР трициклогексилламмониевой соли 1-O-(ε-аминогексаноил)-2,3-дифосфоглицерина (VII) в зависимости от значения рН. Спектры сняты в H₂O с добавлением 10% D₂O. δ — химический сдвиг

(P²) значительно отличающихся по химическому сдвигу от сигналов бисфосфотриэфира (V) (+11,52; +11,19 м.д.).

Известно, что связывание 2,3-дифосфоглицериновой кислоты с окси- и дезоксигемоглобином находится в зависимости от рН [16]. В ряде работ взаимодействие этого регулятора оксигенации с гемоглобином изучалось с помощью спектроскопии ^{31}P -ЯМР [17, 18]. Поэтому мы исследовали изменение спектра ^{31}P -ЯМР соли (VII) в зависимости от рН. Показано (рисунк), что при подкислении водного раствора соли (VII) уменьшается степень ее диссоциации, что ведет к увеличению экранирования атомов фосфора и сдвигу сигналов фосфорных групп в сторону сильного поля.

Представлялось целесообразным изучить встраивание полученного соединения в бислоистую фосфатидилхолиновую мембрану. С помощью ультрафильтрации показано, что при обработке ультразвуком водных дисперсий, содержащих фосфатидилхолин и соединение (VII) при мольных соотношениях от 5:1 до 1:1, происходит равномерное распределение соли (VII) по всему объему. Встраивания в мембрану, очевидно, не происходит, но можно предполагать, что соль (VII) располагается во внутреннем пространстве фосфолипидной везикулы.

1-O-(ε-Аминогексаноил)-2,3-дифосфоглицерин (VI) был получен из соли (VII) с помощью дауэкса в H⁺-форме. Кривая титрования свободной кислоты (VI) весьма близка к кривой титрования 2,3-дифосфо-D-глицериновой кислоты [19]. Как и в случае 2,3-дифосфоглицериновой кислоты, кислотные группы фосфата (VI) титруются в двух областях рН. Первой области соответствуют две группы со средним значением рК 2,8 (в этой области в 2,3-дифосфоглицериновой кислоте титруются три группы); второй — одна группа с рК ~ 6,5 (в 2,3-дифосфоглицериновой кислоте этой области отвечают две группы со средним рК 7,1).

Известны данные о взаимодействии 2,3-дифосфоглицериновой кислоты с гемоглобином в модельных системах [20–21]; мы проводили аналогичные опыты с производным 2,3-дифосфоглицерина (VII) по изучению свя-

звания его с гемоглобином. В спектре ^{31}P -ЯМР образца, содержащего раствор гемоглобина и соли (VII) (молярное соотношение соль (VII) — гемоглобин 34,5 : 1) обнаружен сдвиг сигнала P^3 от $-2,72$ до $-1,5$ м.д., что свидетельствует о наличии взаимодействия между фосфатом (VII) и оксигемоглобином.

1-О-(ϵ -Аминогексаноил)-2,3-дифосфоглицерин испытан на функциональную активность как регулятор обратимой оксигенации гемоглобина человека. Изучена его способность изменять сродство внеэритроцитарного гемоглобина человека к кислороду в опытах *in vitro*. В качестве контроля исследовали нативный гемоглобин, не содержащий регуляторов сродства к кислороду, а также гемоглобин в смеси с 2,3-дифосфоглицериновой кислотой. Для оценки величины сродства к кислороду из кислородно-диссоциационных кривых гемоглобина рассчитывали величины $p_{50}\text{O}_2^*$. Были получены следующие результаты: гемоглобин без регулятора имел $p_{50}\text{O}_2 = 2,6 \pm 0,17$ кПа, гемоглобин в смеси с 1-О-(ϵ -аминогексаноил)-2,3-дифосфоглицерином — 3,5 кПа, гемоглобин в смеси с 2,3-дифосфоглицериновой кислотой — 4,4 кПа. Эти результаты показывают, что полученное соединение действительно является регулятором сродства гемоглобина к кислороду, хотя и несколько более слабым, чем природная 2,3-дифосфо-D-глицериновая кислота.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР сняты на импульсном фурье-спектрофотометре Bruker WP-60 (ФРГ) с рабочей частотой 60 МГц. В случае ПМР-спектров внешним стандартом служил гексаметилдисилоксан, в случае ^{31}P -ЯМР-спектров — H_3PO_4 . ИК-спектры записаны на спектрофотометре Perkin — Elmer 257 (Швеция).

Ультрафильтрацию выполняли в ячейке 52 с мембраной Diaflo PM-10 при 20°C . Концентрацию соли (VII) в ультрафильтрате и исходной смеси определяли с помощью анализа на фосфор [22].

ТСХ проводили на силуфоле UV-254. Обнаружение достигалось прокаливанием, обработкой нингидрином (для соединений (VI), (VII)), молибденовым синим — реактивом на фосфор (для соединений (V) — (VII)).

Яичный фосфатидилхолин для приготовления везикул выделяли по методу [23]. Везикулы с включенным соединением (VII) готовили обработкой ультразвуком дисперсии липида в буфере (5 мМ трис- HCl , pH 7,2), содержащем исследуемое соединение. Молярное соотношение фосфатидилхолин — соль (VII) меняли от 5 : 1 до 1 : 1.

Исследование 1-О-(ϵ -аминогексаноил)-2,3-дифосфоглицерина на функциональную активность проводили на приборе «Лаборатория газов крови 11-217» в физиологических условиях: 37°C , $p\text{CO}_2$ 5 кПа, pH 7,4, концентрация Cl^- 0,15 М.

Данные элементного анализа синтезированных соединений удовлетворительно соответствовали расчетным.

гас-1-О-(N-Бензилоксикарбонил - ϵ - аминокгексаноил)-2,3-изопропилиденглицерин (III). К раствору 4,3 г 2,3-изопропилиденглицерина (I) в 50 мл безводного хлороформа и 10 мл сухого пиридина прибавляли по каплям в течение 30 мин при перемешивании 10 г хлорангидрида N-бензилоксикарбонил- ϵ -аминокапроновой кислоты. Реакционную массу перемешивали 4 ч при 40°C , охлаждали до $18-20^\circ\text{C}$ и фильтровали через окись алюминия. Сорбент промывали хлороформом, объединенный фильтрат упаривали в вакууме. Остаток очищали хроматографированием на колонке с силикагелем (100/160 мкм), вещество (III) элюировали хлороформом. Выход 10,1 г (75%), R_f 0,66 (ТСХ, хлороформ — метанол, 9 : 1). ИК-спектр (в тонком слое): 3480, 2950, 1799, 1540, 1460, 710 cm^{-1} . Спектр ПМР, CDCl_3 (δ , м.д.): 7,46; 5,23; 5,30; 3,80; 3,35; 2,50; 1,53.

гас-1-О-(N-Бензилоксикарбонил- ϵ -аминогексаноил)глицерин (IV). К раствору 10 г ацетонида (III) в 100 мл метанола прибавляли 5 г влаж-

* $p_{50}\text{O}_2$ — парциальное давление кислорода при 50% насыщения им гемоглобина.

ного амберлита IR-112 в H^+ -форме и перемешивали 1,5–2,5 ч при 50° С, контролируя с помощью ТСХ ход реакции. По ее окончании смолу отсасывали, метанол отгоняли в вакууме. Соединение (IV): R_f 0,27 (хлороформ — метанол, 9 : 1), выход 8,6 г (96%); при стоянии закристаллизовывается. ИК-спектр (в тонком слое): 3350, 2950, 1700, 1545, 1275, 1050, 710 cm^{-1} . Спектр ПМР, CD_3OD (δ , м.д.): 7,25; 5,05; 3,50; 3,40; 2,30; 1,35.

гас-1-О-(N-Бензилоксикарбонил-ε-аминогексаноил)-2,3-бис(дифенилфосфо)глицерин (V). К раствору 28 мл дифенилхлорфосфата (100% избыток) в 100 мл безводного хлороформа и 20 мл сухого пиридина прибавляли по каплям при перемешивании и охлаждении до -25° С раствор 10 г 1-О-(N-бензилоксикарбонил-ε-аминогексаноил)глицерина (IV) в 100 мл безводного хлороформа. Смесь выдерживали 24 ч при 18–20° С, приливали 100 мл воды и перемешивали 2 ч, затем экстрагировали эфиром, экстракт промывали 0,1 н. HCl (3×150 мл), насыщенным $NaHCO_3$ (150 мл), водой (200 мл), высушивали безводным Na_2SO_4 , упаривали. Остаток хроматографировали на силикагеле (100/160 мкм), вещество (V) элюировали смесью хлороформ — петролейный эфир, 7 : 3. Выход 20,3 г (89%); R_f 0,30 (ТСХ, хлороформ — метанол, 95 : 5). ИК-спектр (в тонком слое): 3350, 2900, 1725, 1600, 1290, 1067, 979, 718 cm^{-1} . Спектр ПМР, $CDCl_3$ (δ , м.д.): 7,46; 2,25; 4,10; 3,35; 2,52; 1,53; спектр ^{31}P -ЯМР, $CDCl_3$ (δ , м.д.): +11,52; +11,19.

Трициклогексиламмониевая соль гас-1-О-(ε-аминогексаноил)-2,3-дифосфоглицерина (VII). К раствору 10 г фосфата (V) в 40 мл метанола прибавляли 0,2 г окиси платины. Реакцию проводили 3 сут в атмосфере водорода при перемешивании и 18–20° С. Окись платины добавляли порциями по 0,2 г (всего 1,4 г). К реакционной смеси, содержащей 1-О-(ε-аминогексаноил)-2,3-дифосфоглицерин (VI), прибавляли при охлаждении до 0° С по каплям при перемешивании 50 мл циклогексилamina до прекращения выпадения осадка. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром, растворяли в воде и вещество осаждали ацетоном. Выход 5,2 г (74%). Белые мелкие кристаллы, т. пл. 146–147° С. ИК-спектр (в вазелиновом масле): 2980, 2200, 1700, 1570, 1475, 1470, 1380, 1080, 970 cm^{-1} . Спектр ^{31}P -ЯМР, 10% D_2O в H_2O , pH 7,05 (δ , м.д.): -2,72; -2,37.

ЛИТЕРАТУРА

1. *De Venute F., Zegna A. J. Surg. Res.*, 1983, v. 34, № 3, p. 205–212.
2. *Sehgal L. R. Transfusion*, 1983, v. 23, № 2, p. 158–162.
3. *Хачатурьян А. А., Вязова Е. П., Ажигирова М. А., Зейналова А. М., Петисова Л. Ф., Розенберг Г. Я.* Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1982, № 4, с. 28–30.
4. *Edalji R., Benesch R. E., Benesch R. J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251, № 23, p. 7720–7721.
5. *Gustavsson T., de Verdier C.-H. Acta biol. et med. Germ.*, 1980, v. 30, № 1, p. 25–31.
6. *Benesch R. E., Yung S., Susuki T., Baner C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, v. 70, № 9, p. 2595–2599.
7. *Benesch R. E., Edalji R., Benesch R. Biochemistry*, 1977, v. 16, № 12, p. 2594–2598.
8. *Banerjee R. C. r. Acad. Sci.*, 1973, v. 277, № 11, p. 963–966.
9. *Кольцова Г. Н., Монапова Н. Н., Крылова Н. К., Ушакова М. М., Морозова Г. М., Розенберг Г. Я.* Пробл. гематологии и переливания крови, 1979, т. 24, № 8, с. 14–17.
10. *Benesch R., Benesch R. E. Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1967, v. 26, № 1, p. 162–167.
11. *Chanutton A., Curnish R. R. Arch. Biochem. and Biophys.*, 1967, v. 121, № 1, p. 96–102.
12. *Benesch R. E., Benesch R., Yu C. I. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, v. 59, № 2, p. 526–532.
13. *Rothe M., Kunitz F.-W. Liebigs Ann. Chem.*, 1957, v. 609, № 1–3, p. 88–102.
14. *Химия биологически активных соединений / Ред. Преображенский Н. А., Евстигнеева П. И. М.: Химия*, 1976, т. 2, с. 455.
15. *Baer E. J. Biol. Chem.*, 1950, v. 185, № 2, p. 763–767.
16. *Van Beek G. G. M., de Bruin S. H. Eur. J. Biochem.*, 1970, v. 100, № 2, p. 497–502.
17. *Costello A. J. R., Marshall W. E., Omaci A., Henderson T. O. Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 427, № 2, p. 481–499.

18. Marshall W. E., Costello A. J. R., Henderson T. O., Omaci A. *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 490, № 2, p. 290-300.
19. Benesch R. E., Benesch R., Yu C. I. *Biochemistry*, 1969, v. 8, № 6, p. 2567-2571.
20. Hamasaki N., Rose Z. B. *J. Biol. Chem.*, 1974, v. 249, № 24, p. 7896-7901.
21. Djordjevich L., Miller I. F. *Exp. Hemat.*, 1980, v. 8, № 5, p. 584-592.
22. Bartlett G. R. *J. Biol. Chem.*, 1959, v. 234, № 3, p. 466-468.
23. Dawson R. M. C. *Biochem. J.*, 1963, v. 88, № 3, p. 414-423.

Поступила в редакцию
26.VI.1984

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF ORGANOPHOSPHORIC REGULATOR OF HEMOGLOBIN OXYGENATION

USHAKOVA I. P., TUVIN M. Yu., SEREBRENNIKOVA G. A.,
KOL'TSOVA G. N.*, VYAZOVA E. P.*, ROSENBERG G. Ya.*,
EVSTIGNEEVA R. P.

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow:
** Central Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Moscow*

Racemic 1-O-(ϵ -aminohexanoyl)-2,3-diphosphoglycerol (ADPG) was synthesized. The pH dependence of the ^{31}P -NMR spectra was studied for the ADPG cyclohexylammonium salt. ADPG binding to hemoglobin and its functional activity as a regulator of human hemoglobin reversible oxygenation were assayed.