



УДК 547.672.2'+953.057:535.372

## СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНОМЕЧЕНОГО ФАКТОРА АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

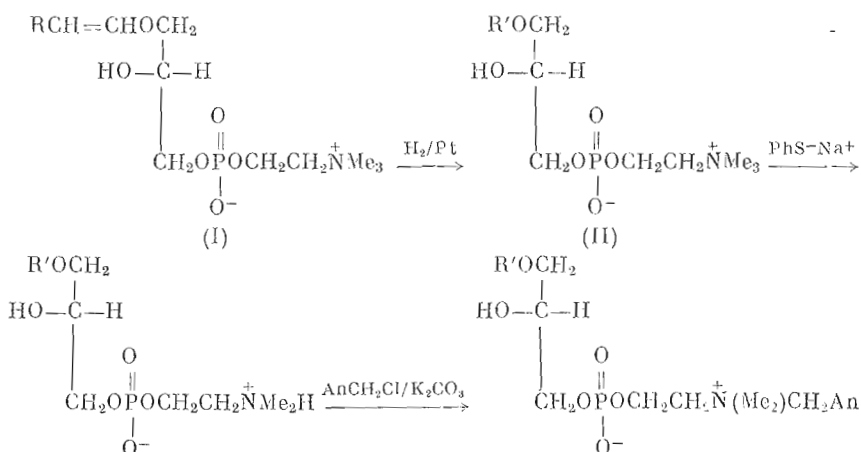
*Ильбс А. Б., Смирнова М. М., Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д.*

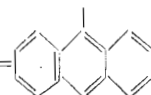
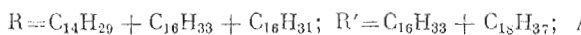
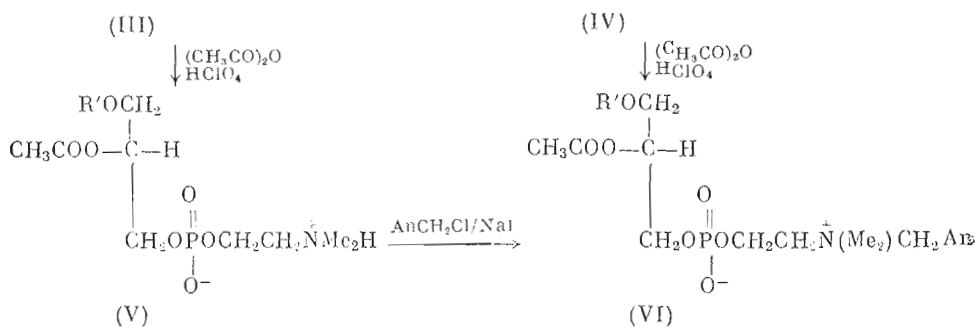
*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Описан синтез флуоресцентномеченого фактора активации тромбоцитов, 1-алкил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфо[N-(9-антрилметил)-N,N-диметилэтанолamina], несущего метку в холиновой части молекулы; исходным соединением служил плазмалоген-фосфатидилхолин сердца крупного рогатого скота.

Фактор активации тромбоцитов (ФАТ) — 1-алкил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин — фосфолипидный медиатор, обладающий высокой физиологической активностью, в частности антигипертензивной, и способностью в очень низких концентрациях ( $10^{-10}$ – $10^{-12}$  М) вызывать агрегацию тромбоцитов (см. обзоры [1, 2]). К настоящему времени осуществлен ряд полных и частичных синтезов ФАТ, а также его аналогов (см. обзор [2]).

Ранее нами был описан синтез флуоресцентных фосфолипидных зондов и их применение для изучения липид-белковых взаимодействий в мембранах [3]. В настоящей работе мы описываем флуоресцентный зонд на основе ФАТ. Известно, что сколько-нибудь существенная модификация диглицеридной части молекулы ФАТ сопровождается потерей физиологической активности, тогда как введение заместителей в холиновый остаток в ряде случаев вызывает частичное ее сохранение или видоизменение [2]. Поэтому мы решили ввести в холиновую часть молекулы ФАТ антрильный флуорофор, ранее с успехом примененный нами для получения липид-специфических флуоресцентных зондов, несущих метку в жирнокислотной части молекулы [3]. Чтобы упростить задачу, мы пошли не по пути полного химического синтеза, весьма длительного и трудоемкого (полный синтез ФАТ из *D*-маннита включает в себя 14 стадий [4]), а применили частичный синтез (схема), причем в качестве исходного соединения использовали плазмалогенлизопосфатидилхолин (I), полученный, в свою очередь, из плазмалогенфосфатидилхолина сердца крупного рогатого скота [5, 6].





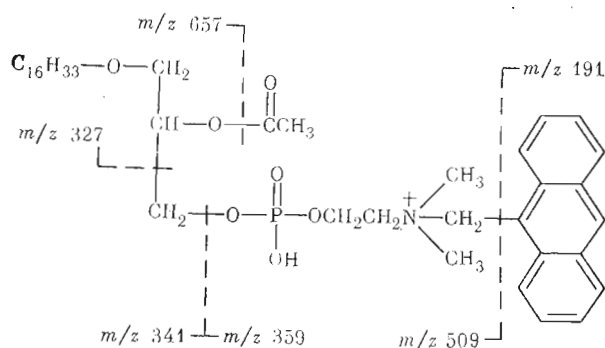
Хотя при таком методе синтеза целевое вещество (VI) должно представлять собой смесь гомологов в соответствии с алкенильным составом исходного лизосоединения (I), анализ показал, что в нем ~83% алкенильных остатков имеет 16 или 18 С-атомов. Известно, что индивидуальные гомологи ФАТ, содержащие гекса- и октадецильный остатки, имеют одинаковую, и притом наибольшую, физиологическую активность, поэтому такое исходное вещество вполне соответствовало нашим целям.

Синтез флуоресцентного аналога ФАТ, 1-алкил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфо[*N*-(9-антрилметил)-*N,N*-диметилаэаноламина] (VI), был осуществлен следующим образом. Исходный лизофосфатид (I) гидрировали над платиновым катализатором и получали 1-алкил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (II), который деметилировали тиофенолятом натрия по методу Штоффеля [7]. Поскольку фосфолипид (II) не содержит сложноэфирной связи, чувствительной к действию тиофенолята, методику деметилирования оказалось возможным упростить: избыток тиофенолята мы добавляли одной порцией, реакцию проводили в запаянной ампуле при 85° С, а выход фосфолипида (III) составлял в таких условиях 74%. Перед хроматографическим выделением последнего оказалось необходимым удалить диметилсульфоксид и низкомолекулярные продукты реакции, и наиболее простым методом для этого оказалась диализ реакционной смеси.

*N*-Антрилметилирование фосфатида (III) было связано с некоторыми затруднениями. Простое применение обычной методики *N*-метилирования (например, действием избытка иодистого метила и щелочи [8]) не дало желаемых результатов, так как по сравнению с иодистым метилом 9-антрилхлорметан обладает меньшей реакционной способностью, а превратить его в иодид из-за неустойчивости последнего с удовлетворительным выходом затруднительно. Провести требуемую реакцию мы смогли двумя способами. По одному из них, предложенному для *N*-метилирования Пателем и др. [9], лизопроизводное (III) *N*-антрилметилировали 9-антрилхлорметаном в присутствии краун-эфира в бензоле. Полученный фосфолипид (IV) ацетилювали уксусным ангидридом в присутствии хлорной кислоты как катализатора и получали антрилмеченый ФАТ (VI). Реакция шла быстро, но при этом, как показали данные ТСХ, происходила частичная деградация антрилметильного производного с образованием нефлуоресцирующего, по-видимому линейного антрилметильной группы, продукта.

По другому способу лизопроизводное (III) сначала ацетилювали, а затем ацетоэфир (V) подвергали кватернизации с 9-антрилхлорметаном в метилэтилкетоне в присутствии иодистого натрия. Видимо, здесь в реакцию кватернизации вступал промежуточно образующийся 9-антрилиодметан. Полученный аналог ФАТ (VI) оказался идентичным веществу, синтезированному по первому пути. Второй путь позволяет получать целевой продукт (VI) с большим выходом, однако у первого способа есть преимущество, что лизофосфатид (IV) можно при необходимости использовать для синтеза набора аналогов ФАТ с различными заместителями во втором положении глицеринового остатка.

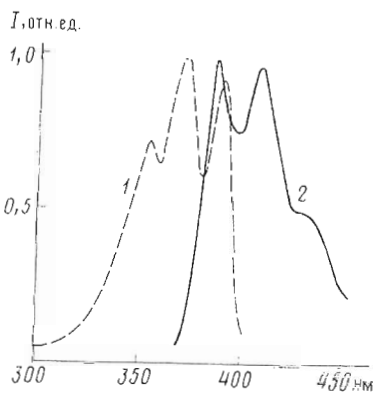
Для подтверждения строения полученного соединения (VI) были получены его масс-спектры при ионизации электрошным ударом или химической ионизацией ( $\text{NH}_3$ ) без предварительной защиты фосфатной группы. Ионы с  $m/z$  700 ( $M^+$ ), 657, 509, 359, 341, 327, 191 в спектре, полученном методом электронного удара, подтверждают структуру соединения (VI):



Так как анализируемое вещество является смесью гомологов с различными алкильными заместителями, каждый характеристический ион представляет собой семейство пиков; на схеме указаны массовые числа для наиболее интенсивных пиков, соответствующих гомологу с гексадециловым алкилом. Масс-спектр антримеченого ФАТ, полученный методом химической ионизации, также соответствует структуре (VI).

УФ-спектр аналога (VI) (см. «Экспериментальная часть») характерен для 9-монозамещенных производных антрацена [10].

По своим флуоресцентным характеристикам антримеченый ФАТ (VI) несколько отличается от ранее синтезированных нами зондов с 9-антриметилметильной меткой по жирнокислотному остатку [11]. На рисунке показаны спектры возбуждения и испускания фосфолипида (VI). Спектры возбуждения, снятые в различных растворителях, очень близки; то же относится и к спектрам испускания: так, средний максимум спектра испускания приходится на 415 нм в хлороформе и на 409 нм — в этаноле. Подобные небольшие смещения спектра испускания, не имеющие прямой корреляции с полярностью растворителя, отмечались и для антриметилметильного флуорофора [11]. Величина поляризации флуоресценции зонда (VI) в везикулах из яичного фосфатидилхолина (0,05 при 20°С) примерно вдвое меньше соответствующей величины для антриметилметильного фосфатидилхолина (0,10 при 23°С) [12]. Возможно, это объясняется большим временем жизни возбужденного состояния зонда (VI), поскольку мало вероятно, что в бислое подвижность флуорофора, присоединенного к остатку холина, больше подвижности подобного же флуорофора на конце жирнокислотной цепи. В настоящее время мы изучаем биологическую активность флуоресцентного аналога ФАТ (VI) и намерены использовать его в дальнейшем для выяснения поведения ФАТ в мембранных системах.



Спектры флуоресценции антримеченого ФАТ (VI) в этаноле (температура 20°С, концентрация 5 мкг/мл): 1 — спектр возбуждения ( $\lambda_{\text{всп}} 410$  нм), 2 — спектр испускания ( $\lambda_{\text{возб}} 365$  нм)

### Экспериментальная часть

Все работы с антримечеными веществами выполняли при рассеянном свете лампы накаливания. В синтезе использовали тиофенол, дибензо-18-краун-6 и 9-антриметилметан фирмы Fluka (Швейцария). Плазмалогенфос-

Фосфатидилхолин выделяли из сердца крупного рогатого скота и превращали в плазмалогенизофосфатидилхолин (I) по методу [13]. Его алкильный состав определяли, отщепляя кислотным гидролизом альдегиды, которые после восстановления алюмогидридом лития и превращения в триметилсилиловые производные [14] анализировали с помощью ГЖХ (колонок 2500×3 мм с 3% OV-1 на хромосорбе W, температура 150→315°С, 6°С/мин; скорость течения 30 мл/мин; пламенно-ионизационный детектор), основные компоненты (идентификация по стандартам): C<sub>16:0</sub> 58%, C<sub>18:0</sub> 11%; C<sub>18:1</sub> 14%. Для колоночной хроматографии применяли силикагель 5/40 мкм (Сhemarol, СССР), отмытый от мелких фракций и активированный в течение 24 ч при 120°С; для препаративной ТСХ — силикагель 60 с 10% гипса (Serva, ФРГ), для аналитической ТСХ — силикагель Н (Merck, ФРГ) с добавлением 5% гипса. Тиофенолят натрия получали по методу [7]. Диметилсульфоксид высушивали перегонкой над диметилнатрием, бензол — перегонкой над натрием, остальные растворители очищали по стандартным методикам. Для ТСХ использовали системы: хлороформ — метанол — вода, 65:35:8 (А), хлороформ — метанол — вода, 140:30:4 (Б), пятна обнаруживали молибденовым синим. Для ГЖХ применяли прибор «Хром-5» (СССР), спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре Hitachi MPF-3 (Япония), масс-спектры — на приборе Varian MAT 44S, УФ-спектры — на спектрофотометре Beckman Acta M VI.

*1-Алкил-sn-глицеро-3-фосфо(N,N-диметил)этаноламин (III)*. 40 мг 1-алк-1'-енил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (I) гидрировали над 5 мг восстановленной окиси платины в 8 мл смеси изопропанол — гептан (2:1) до прекращения поглощения водорода. Полученный таким образом 1-алкил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (II) переносили в ампулу, сушили 2 сут над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> в вакууме, затем под аргоном прибавляли 45 мг тиофенолята натрия и 2 мл сухого диметилсульфоксида и запаившую ампулу выдерживали 6 ч при 85°С. Охлажденную реакционную смесь разбавляли 20 мл смеси хлороформ — метанол (1:1), подкисляли 6 н. HCl до pH 2 и диализовали 2 сут против дистиллированной воды (5 л) при 20°С, трижды в день сменяя воду. Содержимое диализного мешка диализовали, остаток хроматографировали на колонке (8×140 мм) с 4 г силикагеля, элюируя градиентной системой хлороформ — 95% метанол, от 8:2 до 6:4, со скоростью 82 мл/ч, состав фракций контролировали ТСХ в системе А. Получали 29 мг фосфатида (III) в виде бесцветного хроматографически индивидуального аморфного вещества с R<sub>f</sub> 0,60 в системе А (у исходного лизосоединения (II) R<sub>f</sub> 0,50). Масс-спектр фосфолипида (III), снятый при ионизации электроном ударом, содержит интенсивные пики ионов гомологов [M + H]<sup>+</sup> с алкильным остатком C<sub>16</sub> (m/z 468) и C<sub>18</sub> (m/z 496), а также пики ионов [M - OH]<sup>+</sup> с m/z 450 и 478.

*1-Алкил-2-ацетил-sn-глицеро-3-фосфо[N-(9-антрилметил)-N,N-диметилэтаноламин] (VI) а*. К смеси 24 мг фосфолипида (III), 100 мг дибенз-18-краун-6-эфира и 100 мг 9-антрилхлорметана, высушенных в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> в течение 1 сут, прибавляли под аргоном 36 мг сухого K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и 3 мл сухого бензола, энергично перемешивали и выдерживали в темноте 3 сут. Затем смесь уваривали, остаток суспендировали в хлороформе, фильтровали и переносили на колонку (8×120 мм) с 3,5 г силикагеля в хлороформе. Элюировали со скоростью 82 мл/ч градиентной системой хлороформ — 95% метанол, от 95:5 до 70:30. Ход разделения контролировали с помощью фотометрического детектора при 365 нм и ТСХ в системе Б (обнаружение в УФ-свете). Фракции, содержащие 1-алкил-*sn*-глицеро-3-фосфо[N-(9-антрилметил)-N,N-диметилэтаноламин] (IV), дополнительно очищали препаративной ТСХ в системе Б, обнаруживая в УФ-свете. Получали 6,7 мг бледно-желтого аморфного вещества с R<sub>f</sub> 0,64 в системе Б (у исходного фосфатида (III) R<sub>f</sub> ~ 0,3). УФ-спектр лизосоединения повторяет спектр аналога ФАТ (VI) (см. ниже).

К раствору 3 мг соединения (IV) в 0,5 мл хлороформа прибавляли при перемешивании 0,1 мл уксусного ангидрида, через 1 мин — 0,05 мл 60% хлорной кислоты, через 10 с смесь быстро охлаждали и выливали при интенсивном перемешивании в охлажденную смесь 2 мл хлороформа, 1,95 мл

метанола и 1,8 мл воды. Эмульсию разделяли центрифугированием, нижнюю фазу промывали смесью метанол — вода, 1 : 1 (3×3 мл), и упаривали. Остаток растворяли в хлороформе и очищали на колонке с 0,5 г силикагеля, элюируя хлороформом (3 мл), затем смесями хлороформ — метанол, 95 : 5 (3 мл) и 90 : 10 (5 мл); контроль фракций — ТСХ в системе Б. Получали 2 мг фосфолипида (VI) в виде желтого аморфного вещества,  $R_f$  0,7 в системе Б, УФ (в абс. этаноле),  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ): 252 ( $69 \cdot 10^3$ ), 366 ( $2,8 \cdot 10^3$ ), 374 ( $2,4 \cdot 10^3$ ), 393 ( $1,6 \cdot 10^3$ ). Данные масс-спектра приведены выше.

б. К раствору 6 мг 1-алкил-*sn*-глицеро-3-фосфо-N,N-диметиламиноламина (III) в 0,5 мл сухого хлороформа при 20° С и интенсивном перемешивании прибавляли 100 мкл уксусного ангидрида, через 1,5 мин приливали быстро, по по каплям, 50 мкл 60% хлорной кислоты, через 15 с реакционную смесь выливали в охлажденную смесь 2 мл хлороформа, 1,95 мл метанола и 1,8 мл воды и энергично перемешивали. После расслоения нижнюю фазу промывали 2 мл воды и упаривали несколько раз с изопропанолом до исчезновения запаха уксусной кислоты. Получали 6,4 мг хроматографически однородного 1-алкил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфо-N,N-диметиламиноламина (V) в виде аморфного бесцветного вещества с  $R_f$  0,32 в системе Б (соединение III) в тех же условиях имело  $R_f$  0,29, вещество дальнейшей очистке не подвергали.

6,4 мг фосфатида (V) растворяли в 0,2 мл сухого метилэтилкетона, прибавляли 3 мг 9-антрилхлорметана и к раствору при перемешивании по каплям приливали 40 мкл 10% раствора иодида натрия в метилэтилкетоне. Смесь перемешивали 6 ч при 20° С, причем она окрашивалась в бурый цвет и выпадал белый осадок. Осадок отфильтровывали, из фильтрата хроматографией, как описано выше, выделяли 6,1 мг хроматографически чистого аналога ФАТ (VI), идентичного, по данным ТСХ и УФ-спектра, веществу, полученному по методу а.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Vargaftig B. B., Chignard M., Benveniste J., Lefort J., Wal F. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1981, v. 370, p. 119—137.
2. Гордеев К. Ю., Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 12, с. 1589—1605.
3. Молотковский Ю. Г., Маневич Е. М., Бабак В. И., Бергельсон Л. Д. Биол. мембраны, 1984, т. 1, № 1, с. 33—43.
4. Neumans F., Michel E., Borrel M.-C., Wichrowski B., Godfroid J. J., Convert O., Coffier E., Tence M., Benveniste J. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 666, № 2, p. 230—237.
5. Simon M. F., Shap H., Donste-Blazy L. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, v. 198, № 4, p. 1743—1750.
6. Kumar R., Weintraub S. T., McManus L. M., Pinckard R. N., Hanahan D. J. J. Lipid Res., 1984, v. 25, № 2, p. 198—208.
7. Stoffel W. Methods Enzymol., 1975, v. 25, part B, p. 533.
8. Бергельсон Л. Д. Препаративная биохимия липидов. М.: Наука, 1981, с. 122.
9. Patel K. M., Morrisett J. D., Sparrow J. J. Lipids, 1979, v. 14, № 3, p. 596—597.
10. Shinitzky M., Dianoux A.-C., Güller C., Weber G. Biochemistry, 1971, v. 10, № 11, p. 2106—2113.
11. Молотковский Ю. Г., Дмитриев П. И., Никулина Л. Ф., Бергельсон Л. Д. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 588—594.
12. Молотковский Ю. Г., Дмитриев П. И., Молотковская Н. М., Бергельсон Л. Д., Маневич Е. М. Биоорг. химия, 1979, т. 7, № 4, с. 586—600.
13. Бергельсон Л. Д. Препаративная биохимия липидов. М.: Наука, 1981, с. 119.
14. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975, с. 236, 256.

Поступила в редакцию  
23.I.1985

#### SYNTHESIS OF A FLUORESCENT ANALOGUE OF THE PLATELET-ACTIVATING FACTOR

IMBS A. B., SMIRNOVA M. M., MOLOTKOVSKY Ju. G., BERGELSON L. D.  
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow

The synthesis of a fluorescently labelled PAF-acether, 1-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phospho-[N-(9-anthrylmethyl)-N,N-dimethylethanolamine] with the label in the choline moiety is described, plasmalogen lysophosphatidylcholine of bovine heart being used as starting material.