



УДК 547.953'639+577.115.4

ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ СЛОЖНЫХ ЛИПИДОВ. СИНТЕЗ ИОНОФОРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДИФОСФАТИДИЛГЛИЦЕРИНА (КАРДИОЛИПИНА)

*Кузьмина Ю. В., Каплун А. П., Швец В. И.,
Саенко В. А. *, Егорова Е. М. ***

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

** Научно-исследовательский институт медицинской радиологии
АМН СССР, Обнинск;*

*** Институт электрохимии Академии наук СССР им. А. Н. Фрумкина, Москва*

Описан синтез аналогов кардиолипина, содержащих ионофорную группу в гидрофобной области. Ионофор, дибензо-18-краун-6, вводили в положение 2 глицеринового остатка фосфолипида путем ацилирования моно- и дилизокардиолипина ангидридом модифицированной жирной кислоты. Лизоформы кардиолипина получали ферментативным гидролизом кардиолипина из сердца крупного рогатого скота с фосфолипазой A_2 из яда *Naja naja oxiana*. Строение синтезированных соединений подтверждено данными ИК-, УФ-, 1H -ЯМР-спектров. Функциональным анализом, дезацилированием фосфолипазой A_2 , а также иммунохимически.

Модифицированные фосфолипиды широко используются для изучения биологических и модельных мембран. Так, например, фосфолипиды с фотореактивными и изотопными метками оказались весьма перспективными соединениями для исследования липид-белковых взаимодействий; важные данные о строении и функциях модельных и биологических мембран были получены при использовании спин- и флуоресцентно меченных фосфолипидов; в качестве субстратов и ингибиторов мембранных и липолитических ферментов модифицированные фосфолипиды нашли применение при исследовании мембран методами ферментативной кинетики [1].

С целью расширения набора средств и методов изучения функционирования фосфолипидных мембран нами был предпринят синтез аналогов кардиолипина, содержащих ионофорный фрагмент в гидрофобной части молекулы, на конце одной из жирнокислотных цепей. В качестве ионофора мы использовали дибензо-18-краун-6, представитель бензокраун-эфиров, которые, как известно, проявляют ионофорную активность по отношению к модельным и клеточным мембранам [2]. Наличие ароматического ядра в молекуле бензокраун-эфира существенно упрощает синтез его производных, так как позволяет модифицировать готовый краун-эфир, используя реакции электрофильного замещения бензольного кольца.

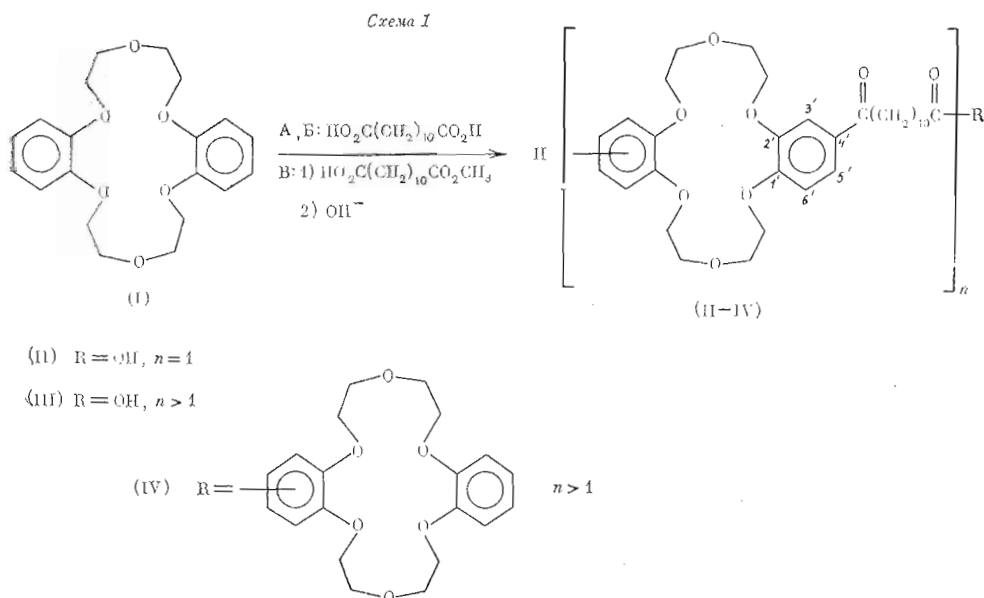
Чтобы длина жирнокислотного остатка, модифицированного ионофором, была близка к длине природных жирных кислот, входящих в состав липидов, дибензо-18-краун-6 был присоединен к 1,10-декадикарбоновой кислоте. В литературе описано ацилирование дибензо-18-краун-6 как дикарбоновыми [3], так и монокарбоновыми [4, 5] кислотами с использованием полифосфорной кислоты (ПФК) [3, 4] и реагента Йтона (насыщенного раствора пятиоксида фосфора в метасульфокислоте) [5] в качестве катализаторов и среды реакции. Так были получены дизамещенные производные краун-эфира с выходом 60–70%. Однако попытки получить аналогичным образом монозамещенный дибензо-18-краун-6 (II) (схема 1АБ) с достаточно хорошим выходом к успеху не привели (таблица). Ацилирование эфира (I) дикарбоновой кислотой приводило к образованию помимо целевого продукта (II) значительных количеств продуктов поликонденсации, среди которых были идентифицированы по данным 1H -ЯМР низкомолекулярные олигомеры типа (IIIa) ($n=2$), (IIIб)

Ацилирование дибензо-18-краун-6 (I) 1,10-декадикарбоновой кислотой

Соотношение краун-эфир/дикарбоновая кислота, моль/моль	Катализатор	Время реакции, ч	Температура реакции, °C	Выход кислоты (II), %
1:1	Реагент Итона	7-20	20	—
2:1	То же	0,5	60	7,3
1:1	ПФК	0,5	80	3,2
1:4*	»	0,5	80	21,5

* Используемые условия описаны в литературе для получения дикарбокси-диацилдибензо-18-краун-6 [3].

($n=3$), (IVa) ($n=2$). При увеличении времени реакции до нескольких часов наблюдалась полная поликонденсация реакционной массы, что согласуется с данными японских авторов [6], синтезировавших поликетон-содержащие дибензо-18-краун-6 поликонденсацией краун-эфира с алифатическими и ароматическими дикарбоновыми кислотами в среде реагента Итона при комнатной температуре.



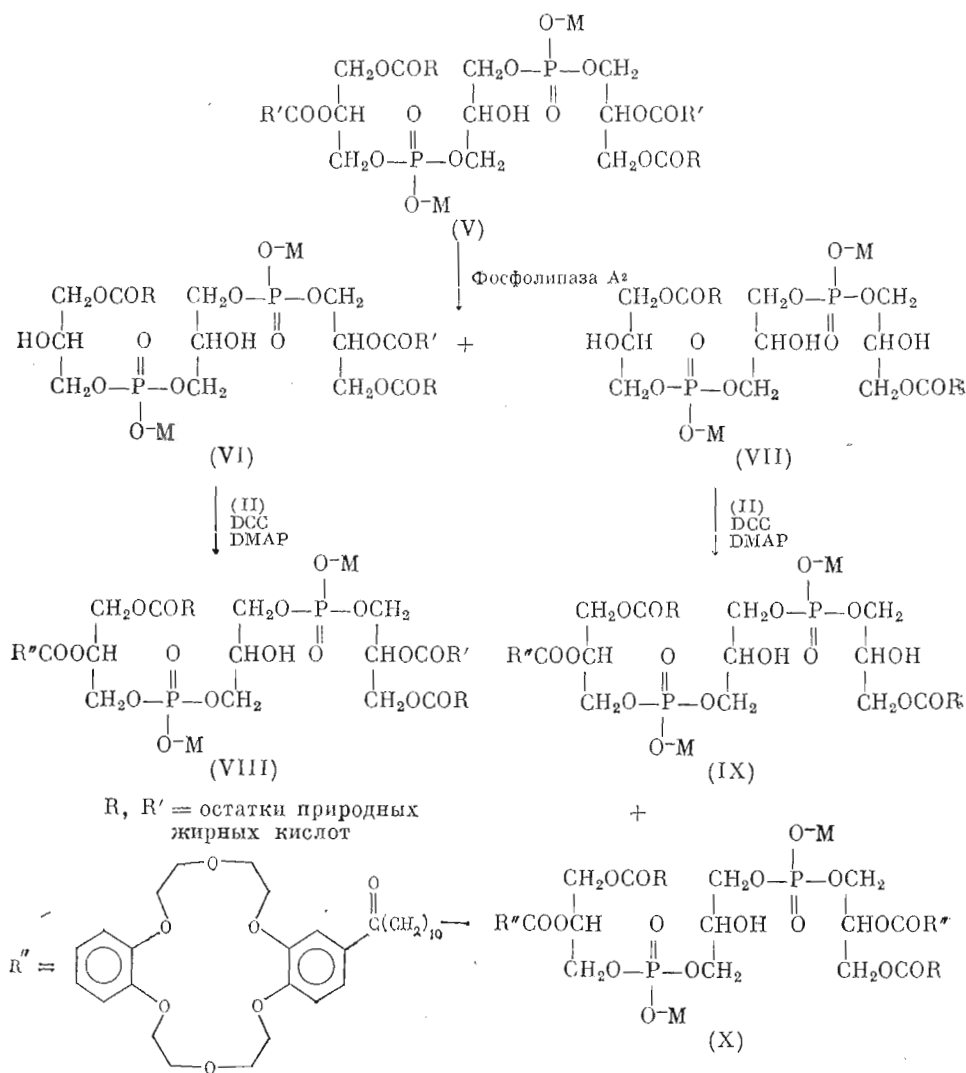
Увеличения выхода моноацильного производного (II) до 52% удалось достичь только при использовании в качестве ацилирующего агента не дикарбоновой кислоты, а ее метилового эфира (схема 1B). Суммарный выход соединения (II) в расчете на исходную дикарбоновую кислоту составил 37%.

Продукты ацилирования дибензо-18-крауна-6 выделяли колоночной хроматографией на окиси алюминия. Их строение подтверждено данными ИК-, УФ-, ^1H -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии. В частности, сигналы в области ароматических протонов в ^1H -ЯМР-спектрах указывают на замещение остатком кислоты в положении 4' ароматического ядра, что характерно для реакций электрофильного замещения бензокраун-эфиров [3-5].

Следующий этап работы заключался в получении лизокардиолипинов и ацилировании их модифицированной ионофором жирной кислотой (II). Лизокардиолипины получали ферментативным гидролизом кардиолипина из сердца крупного рогатого скота фосфолипазой A_2 из яда кобры *Naja naja oxiana* по методу [7]. При инкубации спиртового раствора кардиолипина (V) с лиофилизированным змеиным ядом, растворенным в боратном

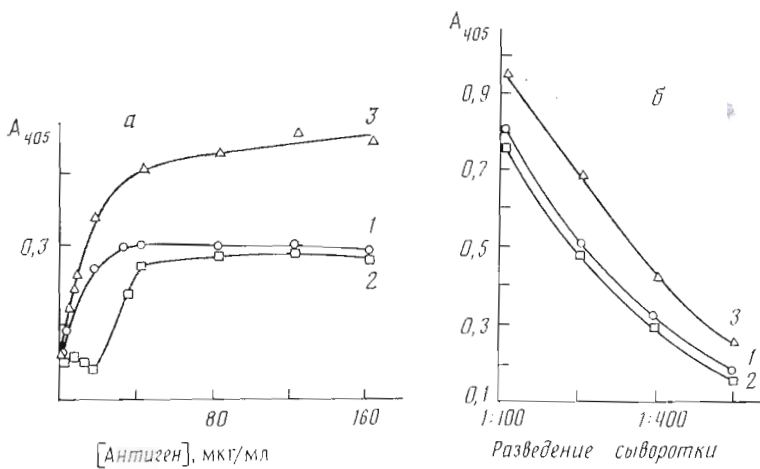
буфере (рН 7,4), в течение 30 мин образовывались два продукта ферментативного дезацелирования: менее полярный монолизокардиолипин (VI) и более полярный дилизокардиолипин (VII) (схема 2), которые выделяли в виде аммониевых солей колоночной хроматографией на силикагеле. Сделанное на основании хроматографической подвижности предвзятельное соотнесение продуктов ферментативной реакции было подтверждено данными по определению количества сложноэфирных групп в полученных соединениях и соотношением интенсивностей сигналов протонов концевых метильных групп жирнокислотных остатков и протонов глицерина в ^1H -ЯМР-спектре.

Схема 2



M-ион металла

Лизокардиолипины затем ацилировали в присутствии 4-(диметиламино)пиридина (DMAP) ангидридом модифицированной кислоты (II), образующимся *in situ* при действии на кислоту дициклогексилкарбодимида (DCC) [8]. В результате ацилирования монолизокардиолипина (VI) образовывался один продукт, содержащий липидный фосфор и краун-эфир. Величина молярного коэффициента погашения, рассчитанная по УФ-спектру, а также соотношение интенсивностей сигналов ароматических протонов, протонов при C11 жирнокислотного остатка, содержащего



Связывание антикардиолипидных антител природным кардиолипидом (V) (1) и модифицированными кардиолипидами (VIII) (2) и (IX) (3) в зависимости от количества иммобилизованного антигена (разведение сыворотки 1:400) (а) от разведения сыворотки (б)

краун-эфир, и концевых метильных протонов, протонов в α -положении к сложноэфирным группам фосфолипида в ^1H -ЯМР-спектре свидетельствовали о том, что на одну молекулу липида в данном соединении приходится одна молекула ионофора. Это позволило приписать ему структуру 1(3)-(1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-3(1)-{1-ацил-2-(11-[дибензо-18-краун-6]-4'-илкарбонил)-ундеcanoил}-*sn*-глицеро-3-фосфо}-*sn*-глицерина (VIII) (схема 2). При ацилировании дилизокардиолипидина (VII) образовывались два продукта липидной природы, содержащие ионофорную группу, которым, также на основании УФ- и ^1H -ЯМР-спектров, были приписаны структуры (IX) (более полярный основной продукт реакции) и (X) (менее полярный продукт).

Строение полученных ионофорных производных кардиолипидина (VIII)–(X) подтверждали также ферментативным гидролизом фосфолипазой A_2 , в результате которого наряду с другими лизосоединениями образовывались исходные лизокардиолипиды (VI) и (VII) и модифицированная ионофором кислота (II). Таким образом, было показано, что ацилирование лизокардиолипидов идет по второму положению глицеринового скелета фосфатидильных остатков, не затрагивая свободный гидроксил глицерина полярной головки.

Так как кардиолипид обладает ярко выраженными антигенными свойствами [9], нами было проведено сравнение антигенных свойств синтезированных ионофорных аналогов кардиолипидина и природного кардиолипидина методом твердофазного иммуноферментного анализа (вариант ELISA — enzyme-Linked immunosorbent assay). В тест-реакциях с сывороткой крови больного системной красной волчанкой, содержащей антитела к кардиолипину, модифицированный кардиолипид (VIII) показал иммунологическую активность, идентичную активности природного кардиолипидина из сердца крупного рогатого скота, а кардиолипид (IX) — несколько более высокую активность (рисунки, а, б).

Были также проведены эксперименты по встраиванию модифицированного кардиолипидина (VIII) в фосфолипидный бислой. Было продемонстрировано встраивание его в бислойную липидную мембрану (БЛМ), сформированную из яичного фосфатидилхолина. Модифицированный липид вводили из суспензии мультислойных липосом в буферный раствор с одной из сторон БЛМ. При этом наблюдались изменения поверхностных потенциалов, соответствующее появлению отрицательного поверхностного заряда на стороне БЛМ, обращенной к липосомам. Как было показано ранее для липосом из фосфатидилсерина [10, 11], такое изменение потенциала БЛМ обусловлено встраиванием отрицательно

заряженных молекул липида, присутствующих в суспензии липосом, в обращенный к ней монослой БЛМ.

Экспериментальная часть

ИК-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu IR-435 (Япония) в вазелиновом масле, УФ-спектры — на спектрофотометре Beckman DU-6 (США), масс-спектры — на приборе Varian MAT-311A (США). Спектры ^1H -ЯМР записывали на импульсном фурье-спектрометре Bruker WM-250 (ФРГ).

Колоночную хроматографию проводили на окиси алюминия L 40/250, нейтральной по Брокману (Chemapol, ЧССР) и силикагеле L 40/100 (Chemapol, ЧССР), ТСХ — на пластинках Aluminiumoxide 60 F254 neutral (Type E) (Merck, ФРГ) в системе растворителей хлороформ — метанол — 25% аммиак, 40:6:1 (А) и на пластинках Kieselgel 60 F254 (Merck, ФРГ) в системе растворителей хлороформ — метанол — 25% аммиак, 65:25:4 (Б). Для обнаружения веществ на ТСХ использовали: облучение в УФ-свете (а), прокаливание (б), реактив Драгendorфа (в) для обнаружения краун-эфиров и их производных [12], молибденовый синий (г) для обнаружения липидов [13].

Количество сложноэфирных групп в липидах определяли спектрофотометрически известным методом [14].

В работе использовали дибензо-18-краун-6, ч. отечественного производства, кардиолипин из сердца крупного рогатого скота (Харьковское предприятие по производству бактериальных препаратов), 1,10-декандикарбоновую кислоту (Fluka, Швейцария), дициклогексилкарбодимид (Ferkal Berlin (West)), 4-(диметиламино)пиридин (Fluka, Швейцария). Полифосфорную кислоту и реагент Итона готовили по методикам [15] и [16] соответственно.

Поглощение растворов в лунках планшет для анализа по методу ELISA измеряли на приборе Titertek Multiscan (Flow, Великобритания).

БЛМ формировали по методу Мюллера в тefлоновой ячейке из раствора яичного фосфатидилхолина (Харьковское предприятие по производству бактериальных препаратов) в *n*-декане (25 мг/мл) на отверсти диаметром 1 мм в вертикальной перегородке, разделяющей два буферных раствора одинакового состава (10 мМ КСl, 2 мМ трис-HCl, pH 7,0) объемом 10 мл. Липосомы из модифицированного кардиолипина (VIII) получали встряхиванием его дисперсии в буферном растворе вышеуказанного состава.

II-[Дибензо-18-краун-6]-4'-алкарбонил]ундекановая кислота (II). Способ А. 2,88 г (8 ммоль) дибензо-18-краун-6 (I) и 0,92 г (4 ммоль) 1,10-декандикарбоновой кислоты перемешивали в 7,6 мл реагента Итона 30 мин при 60°С. Сидер выливали в 50 мл воды, выпавший осадок отфильтровывали, растворяли в 40 мл хлороформа, хлороформный раствор промывали водой (3×20 мл) и сушили безводным сульфатом натрия. Остаток из экстракта хроматографировали на колонке со 100 г окиси алюминия, элюируя последовательно 500 мл хлороформа, 500 мл смеси хлороформ — метанол — 25% аммиак (40:6:1) и 800 мл смеси хлороформ — метанол — 25% аммиак (20:6:1); фракции апализировали ТСХ в системе А (обнаружение «а» — «в»). Получали 250 мг (7,3%) кислоты (II), R_f 0,35 (А), т. пл. 98–100°С (из этанола). ИК (ν , см^{-1}): 3060 (ArH), 3000 (OH), 1695 (COOH), 1675 (ArCO), 1590, 1450 (Ar), 1260, 1140, 1040 (CH_2OCH_2). УФ (хлороформ — метанол, 95:5, λ_{max} , нм (ϵ): 241 (4500), 274 (11400), 302 (6600). ^1H -ЯМР (дейтерохлороформ — дейтерометанол, 2:1, δ , м.д.): 1,27м (12H, $(\text{CH}_2)_6$), 1,57м (2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 1,67м (2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COAr}$), 2,24т (2H, CH_2COOH), 2,92г (2H, CH_2COAr), 4,00–4,22м (16H, OCH_2), 6,92м (4H, ArH), 6,98д (1H, $\text{ArH}^{\delta'}$), 7,5д (1H, $\text{ArH}^{\beta'}$), 7,62кв (1H, $\text{ArH}^{\gamma'}$). Масс-спектр (m/z): 572 (M^+), 402 ($\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{O}_6\text{C}(\text{O})\text{CH}_3^+$), 387 ($\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{O}_6\text{CO}^+$), 136 ($\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2\text{C}_2\text{H}_4^+$), 121 ($\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2\text{CH}^+$). Из реакционной массы при хроматографии на колонке выделяли также олигомеры (IVa, $n=2$), (IIIб, $n=3$), (IIа, $n=2$).

Для (IVa, $n=2$) R_f 0,95 (А), ^1H -ЯМР (дейтерохлороформ — дейтерометанол, 2:1, δ , м.д.): 1,28м (24H, CH_2), 1,66м (8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COAr}$), 2,90т (8H, CH_2COAr), 4,02м (24H, CH_2OCH_2), 4,18м (8H, ArOCH_2), 4,22м (16H, $\text{RC}(\text{O})\text{ArOCH}_2$), 6,90м (12H, ArH), 7,50д (4H, $\text{ArH}^{\beta'}$), 7,58кв (4H, $\text{ArH}^{\gamma'}$).

Для (IIIб, $n=3$) R_f 0,6 (А), ^1H -ЯМР (дейтерохлороформ — дейтерометанол, 2:1, δ , м.д.): 1,30м (36H, CH_2), 1,56м (2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 1,68м (10H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COAr}$), 2,26т (2H, CH_2COOH), 2,88т (10H, CH_2COAr), 4,01м (24H, CH_2OCH_2), 4,14м (4H, ArOCH_2), 4,20м (20H, $\text{RC}(\text{O})\text{ArOCH}_2$), 6,86м (9H, ArH), 7,48д (5H, $\text{ArH}^{\beta'}$), 7,54кв (5H, $\text{ArH}^{\gamma'}$).

Для (IIа, $n=2$) R_f 0,52 (А), ^1H -ЯМР (дейтерохлороформ — дейтерометанол, 2:1, δ , м.д.): 1,24м (24H, CH_2), 1,52м (2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 1,62м (6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COAr}$), 2,18т (2H, CH_2COOH), 2,88т (6H, CH_2COAr), 3,98м (16H, CH_2OCH_2), 4,12м (4H, ArOCH_2), 4,20м (12H, $\text{RC}(\text{O})\text{ArOCH}_2$), 6,88м (7H, ArH), 7,46д (3H, $\text{ArH}^{\beta'}$), 7,52кв (3H, $\text{ArH}^{\gamma'}$).

Способ В. 720 мг (2 ммоль) дибензо-18-краун-6 (I) и 1,84 г (8 ммоль) 1,10-декандикарбоновой кислоты перемешивали 30 мин в 14,4 г полифосфорной кислоты при 85°С. Реакционную массу охлаждали до 20°С, выливали в 50 мл воды, выпавший осадок отфильтровывали, промывали 20 мл воды, 30 мл смеси этанол — вода (1:1) и растворяли в 5 мл смеси хлороформ — метанол — 25% аммиак (40:6:1). Растворители упаривали, остаток растворяли в 3 мл хлороформа и хроматографировали, как описано в способе А. Получали 246 мг (21,5%) кислоты (II), идентичной полученной по способу А.

Способ В. 720 мг (2 ммоль) дибензо-18-краун-6 (I) и 122 мг (0,5 ммоль) монометилового эфира 1,10-декандикарбоновой кислоты, полученного известным методом [17], перемешивали 1 ч в 3,8 мл реагента Итона при 20° С, смесь выливали в 30 мл воды, осадок отфильтровывали, растворяли в 15 мл хлороформа, промывали водой (3×20 мл). Хлороформный раствор сушили безводным сульфатом натрия, после уваривания остаток растворяли в 8 мл 2% NaOH в метаноле и нагревали 10 ч при 60° С. Реакционную массу подкисляли 10 мл 0,2 М HCl и экстрагировали 30 мл хлороформа. Хлороформный раствор сушили безводным сульфатом натрия, из остатка хроматографией (см. способ А) выделяли 150 мг (52%) кислоты (II), идентичной полученной по способу А.

1(3)-(1-Ацил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-3(1)-(1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-*sn*-глицерин (монолизокардиолипин) (VI) и 1,3-ди-(1-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-*sn*-глицерин (дизлизокардиолипин) (VII). 270 мг кардиолипина (V) в 110 мл этанола перемешивали 40 мин при 20° С с 75 мг лиофилизованного яда кобры *Naja naja oxiana*, растворенного в 8 мл 0,1 М боратного буфера (pH 7,4), содержащего 2,5 mM CaCl₂. К реакционной массе прибавляли 50 мл хлороформа и упаривали. Остаток растворяли в 2 мл хлороформа, наносили на колонку с 15 г силикагеля и элюировали 250 мл смеси хлороформ-метанол-25% аммиак в соотношении 40:10:1, а затем в соотношения 30:10:1 до полного вымывания всех компонентов. Получали 80 мг (36,4%) монолизокардиолипина (VI) и 67 мг (39%) лизокардиолипина (VII).

Для соединения (VI) R_f 0,31 (Б) (обнаружение «г»); ¹H-ЯМР (дейтерохлороформ, δ, м.д.): 0,87т (9H, CH₃), 1,29м ((CH₂)_n), 1,58м (6H, CH₂CH₂COOR), 2,02м (CH₂CH=), 2,32т (6H, CCl₂COOR), 2,78м (=CHCH₂CH=), 3,90-4,40м (15H, глицерин), 5,30м (=CH), 7,37с (8H, NH₄⁺); количество сложнэфирных групп (моль/моль липида) 3.

Для соединения (VII) R_f 0,24 (Б) (обнаружение «г»); ¹H-ЯМР (дейтерохлороформ, δ, м.д.): 0,88т (4H, CH₃), 1,32м ((CH₂)_n), 1,6м (4H, CH₂CH₂COOR), 2,04м (CH₂CH=), 2,34т (4H, CH₂COOR), 2,76м (=CHCH₂CH=), 3,60-4,30м (15H, глицерин), 5,32м (=CH), 7,36с (8H, NH₄⁺); количество сложнэфирных групп (моль/моль липида) 2.

1(3)-(1,2-Диацил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-3(1)-(1-ацил-2-{11-(дибензо-18-краун-6)-4'-илкарбонил}ундеканойл)-*sn*-глицеро-3-фосфо)-*sn*-глицерин (VIII). Раствор 90 мг (76 мкмоль) монолизокардиолипина, 87 мг (152 мкмоль) кислоты (II), 360 мкл 10% раствора дициклогексилкарбодимиды (304 мкмоль) в CCl₄ и 18 мг (152 мкмоль) 4-(диметиламино)пиридина в 5 мл сухого хлороформа перемешивали 24 ч при 20° С, фильтровали, упаривали, остаток растворяли в 2 мл смеси хлороформ-метанол-25% аммиак, 40:10:1, и хроматографировали на колонке с 30 г силикагеля, элюируя той же системой растворителей. Получали 25 мг (19%) модифицированного кардиолипина (VIII). R_f 0,40 (Б) (обнаружение «а», «в», «г»). УФ (хлороформ-метанол, 1:1, λ_{max}, нм (ε)): 248 (6800), 274 (10400), 303 (5000). ¹H-ЯМР (дейтерохлороформ, δ, м.д.): 0,86т (9H, CH₃), 1,27м ((CH₂)_n), 1,59м (8H, CH₂CH₂COOR), 1,67м (2H, CH₂CH₂COAr), 2,05м (CH₂CH=), 2,28т (8H, CH₂COOR), 2,76м (=CHCH₂CH=), 2,9т (2H, CH₂COAr), 3,70-4,30м (15H, глицерин, 16H, CH₂O), 5,34м (CH=), 6,90-7,00м (5H, ArH), 7,34с (8H, NH₄⁺), 7,51-7,69м (2H, ArH).

1(3)-(1-Ацил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-3(1)-(1-ацил-2-{11-(дибензо-18-краун-6)-4'-илкарбонил}ундеканойл)-*sn*-глицеро-3-фосфо)-*sn*-глицерин (IX) и 1,3-ди-(1-ацил-2-{11-(дибензо-18-краун-6)-4'-илкарбонил}ундеканойл)-*sn*-глицеро-3-фосфо)-*sn*-глицерин (X). По методике, аналогичной предыдущей, из 185 мг (0,21 ммоль) дизлизокардиолипина (VII), 487 мг (0,84 ммоль) кислоты (II) при действии 1,98 мл (1,68 ммоль) 10% раствора дициклогексилкарбодимиды в CCl₄ в присутствии 104 мг (0,84 ммоль) 4-(диметиламино)пиридина получали 60 мг (16,6%) модифицированного кардиолипина (IX) и 11 мг (2,7%) модифицированного кардиолипина (X).

Для соединения (IX) R_f 0,34 (Б) (обнаружение «а», «в», «г»); УФ (хлороформ-метанол, 1:1, λ_{max}, нм (ε)): 248 (6200), 272 (11000), 297 (7200); ¹H-ЯМР (дейтерохлороформ, δ, м.д.): 0,9т (6H, CH₃), 1,32м ((CH₂)_n), 1,59-1,72м (6H, CH₂CH₂COOR), 2H, CH₂CH₂COAr), 2,08м (CH₂CH=), 2,30т (6H, CH₂COOR), 2,80м (=CHCH₂CH=), 2,92т (2H, CH₂COAr), 3,90-4,30м (15H, глицерин, 16H, CH₂O), 5,36м (CH=), 6,92-6,98м (5H, ArH), 7,38с (8H, NH₄⁺), 7,54-7,64м (2H, ArH).

Для соединения (X) R_f 0,41 (Б) (обнаружение «а», «в», «г»); УФ (хлороформ-метанол, 1:1, λ_{max}, нм (ε)): 247 (8300), 273 (18100), 298 (12300); ¹H-ЯМР (дейтерохлороформ, δ, м.д.): 0,88т (6H, CH₃), 1,26м ((CH₂)_n), 1,56-1,70м (8H, CH₂CH₂COOR), 4H, CH₂CH₂COAr), 2,04м (CH₂CH=), 2,28т (8H, CH₂COOR), 2,74м (=CHCH₂CH=), 2,90т (4H, CH₂COAr), 3,90-4,30м (15H, глицерин, 32H, CH₂O), 5,34м (CH=), 6,90м (10H, ArH), 7,38с (8H, NH₄⁺), 7,50-7,56м (4H, ArH).

Иммуноферментный анализ. 25 мкл раствора антигена (соединения (V), (VIII) или (IX)) в этаноле (80 мкг/мл) вносили в каждую лунку планшеты для иммуноферментного анализа (Nunc, Дания). Этанол из лунок испаряли в течение почти при 4° С. После иммобилизации антигена планшеты промывали 3 раза 0,01 М фосфатносолевым буфером (ФСБ), содержащим 0,15 Н NaCl, по 150 мкл в лунку. Неспецифическую сорбцию устраняли блокированием мест неспецифического связывания белками сыворотки крови крупного рогатого скота (СККРС), для чего в каждую лунку добавляли по 75 мкл 10% раствора СККРС в ФСБ (СККРС/ФСБ) и инкубировали 1 ч при 20° С. После удаления раствора СККРС/ФСБ планшету промывали

1 раз ФСБ по 150 мкл в лунку и вносили образец сыворотки крови больного системной красной волчанкой с высоким титром антикардиолипидных антител в соответствующем разведении в объеме 50 мкл на лунку. Разведение сыворотки делали СККРС/ФСБ. Планшеты инкубировали с сывороткой 1 ч при 20°С и после удаления сыворотки промывали 3 раза ФСБ по 150 мкл в лунку. Затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл конъюгата антител к иммуноглобулинам человека с пероксидазой из хрена (Amersham, Великобритания) в разведении 1:1000 раствором СККРС/ФСБ. Планшеты с конъюгатом инкубировали 1 ч при 20°С, удаляли раствор конъюгата и промывали 3 раза ФСБ по 150 мкл в лунку. После промывки в каждую лунку приливали по 50 мкл раствора субстрата (2,2-азино-ди(3-этилбензотиазолия-6-сульфоната) — Amersham, Великобритания), инкубировали 30 мин при 20°С, останавливали реакцию, добавляя в каждую лунку по 50 мкл 0,1 М раствора лимонной кислоты, и измеряли оптическое поглощение в каждой лунке при 405 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Евстигнеева Р. П., Звонкова Е. Н., Серебрянникова Г. А., Швец В. И. Химия липидов. М.: Химия. 1983.
2. Богатский А. В., Назаров Е. И., Головенко Н. Я. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1985. Т. XXX. № 5. С. 593–599.
3. Ташмухамедова А. К., Полешко И. В., Стемпневская И. А. // Химия природ. соединений. 1983. № 1. С. 95–98.
4. Ташмухамедова А. К., Абдулаева Р. А., Стемпневская И. А., Сайфуллина Н. Ж., Абылабеков М. Т. // Биоорг. химия. 1978. Т. 4. № 6. С. 806–812.
5. Parish W. W., Stott P. E., McCausland C. W., Bradshaw J. S. // J. Org. Chem. 1978. V. 43. № 24. P. 4577–4581.
6. Ueda M., Kano T., Waragai T., Sugita H. // Makromol. Chem. Rapid. Commun. 1985. V. 6. № 12. P. 847–850.
7. Окуята Н., Нойима С. // J. Biochem. 1965. V. 57. № 4. P. 529–538.
8. Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1256–1262.
9. Janoff A. S., Rauch J. // Chem. and Phys. Lipids. 1986. V. 40. № 2–4. P. 315–332.
10. Егорова Е. М. // Электрохимия. 1984. Т. 20. № 10. С. 1396–1399.
11. Егорова Е. М. // Электрохимия. 1984. Т. 20. № 11. С. 1527–1531.
12. Trezi L., Bako P., Fenichel L., Rusznak I. // J. Chromatogr. 1983. V. 269. № 1. P. 40–43.
13. Dittmer J. C., Lester R. L. // J. Lipid Res. 1964. V. 5. № 1. P. 126–127.
14. Snyder F., Stephenes N. // Biochim. et biophys. acta. 1959. V. 34. № 1. P. 244–245.
15. Улиг Ф., Снайдер Г. // Успехи органической химии. Т. 1./Ред. Рафаэль Р. А.: Пер. с англ./Ред. Кнузянц И. Л. М.: ИЛ, 1963. С. 84.
16. Eaton P. E., Carlson G. R., Lee J. T. // J. Org. Chem. 1973. V. 38. № 23. P. 4071–4073.
17. Синтезы органических препаратов./Пер. с англ. М.: ИЛ, 1960. Сб. 10. С. 56.

Поступила в редакцию
7.1.1988

STUDIES ON COMPLEX LIPIDS. SYNTHESIS OF IONOPHORE DERIVATIVES OF DIPHOSPHATIDYLGLYCEROL (CARDIOLIPIN)

KUZMINA Yu. V., KAPLUN A. P., SHVETS V. I.,
SAENKO V. A. *, EGOROVA E. M. **

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;
** Scientific Research Institute of Medical Radiology,*
Academy of Medical Sciences of the USSR, Obninsk;
*** A. N. Frumkin Institute of Electrochemistry,*
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Synthesis of cardiolipin analogues containing an ionophore residue in the fatty acid moiety is described. The ionophore, dibenzo-18-crown-6, has been incorporated into second position of the glycerol residue by acylating mono- and dilyocardiolipin with a modified fatty acid anhydride. Lyso-derivatives of cardiolipin have been prepared by enzymatic hydrolysis of beef heart cardiolipin by snake venom phospholipase A₂ (*Naja naja oxiana*).