



УДК 547.422(22+23)'118.057

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИСФОСФАТОВ ГЛИКОЛЕЙ,  
РЕГУЛЯТОРОВ ОБРАТИМОЙ ОКСИГЕНАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА*Чувиллин А. Н., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П.,  
Кольцова Г. Н.\*, Вязова Е. П.\*, Розенберг Г. Я.\***Институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова, Москва;**\* Центральный научно-исследовательский институт гематологии  
и переливания крови, Москва*

Синтезированы бисфосфаты гликолей — этиленгликоля и 1,2-пропандиола. Показано, что эти соединения заметно понижают сродство внеэритроцитарного гемоглобина к кислороду.

Одним из перспективных направлений в поиске искусственных переносчиков кислорода является их создание на основе природного гемоглобина [1—3]. Растворы внеэритроцитарного гемоглобина обладают заметно более высоким сродством к кислороду, чем цельная кровь [4]. Это затрудняет отдачу кислорода в тканях организма, вследствие чего использование таких растворов малоэффективно [5]. В эритроцитах человека и ряда млекопитающих содержится регулятор обратимой оксигенации гемоглобина, 2,3-дифосфо-D-глицериновая кислота (DPG). DPG способна обратимо связываться с гемоглобином, преимущественно с его дезоксиформой. В результате сродство гемоглобина к кислороду понижается, что обуславливает эффективный транспорт кислорода кровью [6].

Известно, что многие другие вещества также способны понижать сродство гемоглобина к кислороду. Как правило, это многоосновные кислоты, иногда содержащие альдегидные группы. Из природных аналогов DPG наиболее активны фосфорсодержащие соединения: АТФ [7], пиридоксаль-5'-фосфат [8], инозитгексафосфат [9].

Необходимым компонентом искусственных переносчиков кислорода на основе гемоглобина (например, гемосом [10]) должен, очевидно, быть регулятор его обратимой оксигенации. Использование в этих целях DPG проблематично из-за малой доступности. В этом плане перспективно создание эффективных и более простых функциональных аналогов DPG, достаточно устойчивых при использовании *in vivo*.

Взаимодействие DPG с гемоглобином происходит по принципу аллостерической регуляции. Не влияя на гем непосредственно, анион- DPG связывается солевыми мостиками с положительно заряженными аминокислотными остатками, расположенными в полости между  $\beta$ -субъединицами гемоглобина [11]. Шесть этих мостиков образованы фосфатными остатками DPG, седьмой — карбоксильной группой.

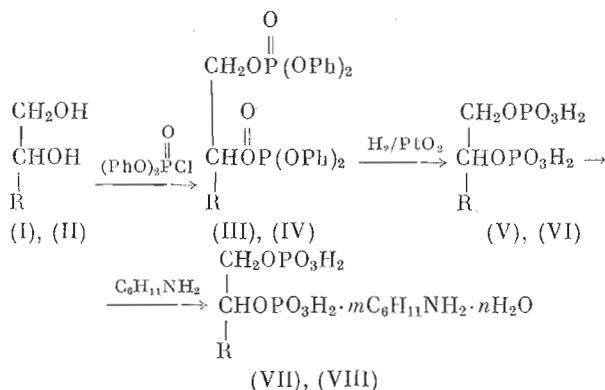
Исходя из представлений о механизме взаимодействия DPG с гемоглобином, мы считали целесообразным синтезировать и испытать в качестве регуляторов оксигенации гемоглобина бисфосфат этиленгликоля (V) и бисфосфат 1,2-пропандиола (VI). Данные соединения можно рассматривать как близкие структурные аналоги DPG, в которых место карбоксильной группы занимает протон или  $\text{CH}_3$ -группа. Изучение этих бисфосфатов помогает установить связь структуры регулятора оксигенации с его активностью.

Выбор таких аналогов позволяет не только максимально приблизиться к строению природного регулятора, но и упростить схему их получения по сравнению с DPG [12]. Соединение (VI) получено нами в рацемической форме, поскольку известно, что природный изомер DPG и его энантиомер по действию на гемоглобин не различаются [13].

Влияние регуляторов на растворы гемоглобина

| Регулятор                                   | $p_{50}O_2$ , кПа | $\Delta p_{50}O_2$ , кПа |
|---|-------------------|--------------------------|
| 2,3-Дифосфо- <i>D</i> -глицериновая кислота | 4,40              | 2,00                     |
| Бисфосфат этиленгликоля                     | 3,52              | 1,12                     |
| Бисфосфат 1,2-пропандиола                   | 3,00              | 0,6                      |
| Без регулятора                              | 2,40              | —                        |

Исходные гликоли (I), (II) действием дифенилхлорфосфата в присутствии пиридина переводили в бисфосфаты (III), (IV) (см. схему).



(I), (III), (V), (VII) R=H,  $m = 4$ ,  $n = 1, 5$ ; (II), (IV), (VI), (VIII) R=Me,  $m = 3$ ,  $n = 0$

Последующее каталитическое гидрирование приводило к целевым бисфосфатам (V), (VI), выделенным в виде циклогексиламмониевых солей, элементный состав которых соответствовал формулам (VII), (VIII). Индивидуальность промежуточных и целевых веществ (III), (IV), (VII), (VIII) подтверждена данными элементного анализа, ТСХ, спектров ИК и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. Общие выходы солей (VII), (VIII) составили 74,5 и 68,7% на исходные гликоли.

Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР бисфосфата (VIII) содержит два сигнала. Съемка спектра без развязки от протонов позволила отнести сигнал, расположенный в более слабом поле, к атому фосфора при первичном атоме углерода.

Для изучения функциональной активности полученных бисфосфатов соли (VII), (VIII) переводили с помощью амберлита в свободные кислоты (V), (VI). Эталонном выбрали DPG природного строения, полученную из соответствующей пентациклогексиламмониевой соли (фирма Calbiochem). Исследовали растворы гемоглобина в отсутствие регулятора, а также гемоглобина с добавлением DPG или бисфосфата (V) или (VI). Для этих растворов на основании кривых диссоциации оксигемоглобина были рассчитаны значения парциального давления кислорода при оксигенации гемоглобина на 50% ( $p_{50}O_2$ ). Это основной параметр, характеризующий сродство гемоглобина к кислороду.

Полученные бисфосфаты заметно повышают величину  $p_{50}O_2$  (таблица) и, следовательно, понижают сродство гемоглобина к кислороду, но в меньшей степени, чем DPG. Очевидно, что карбоксильная группа DPG вносит существенный вклад во взаимодействие гемоглобина — регулятор. Наиболее низкой оказалась активность бисфосфата 1,2-пропандиола;  $\Delta p_{50}O_2$ , вызванное его действием, почти вдвое меньше, чем у бисфосфата этиленгликоля. По-видимому, это можно объяснить тем, что метильная группа бисфосфата (VI) способна не только экранировать соседнюю фосфатную группу, нарушая ее взаимодействие с гемоглобином, но и понижать степень ее диссоциации посредством индукционного эффекта.

Полученные нами соединения по активности уступают 2,3-дифосфо-*D*-глицериновой кислоте. Однако они обладают некоторыми преимуществами в плане их использования в качестве ее синтетических аналогов: доступ-

ностью исходных веществ и более высокими выходами при синтезе. Кроме того, можно ожидать, что в организме они будут стабильнее, как неприродные соединения.

### Экспериментальная часть

Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР сняты на импульсном фурье-спектрометре Bruker WM-250 (ФРГ) с рабочей частотой 101,25 МГц. Внешний стандарт — 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  в  $\text{D}_2\text{O}$ . ИК-спектры записаны в пленке на спектрофотометре Shimadzu IR-450 (Япония).

ТСХ выполнена на силуфоле UV-254 в системах: эфир — бензол, 1:3 (А); метанол — вода — 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$  — 30%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ , 10:6:3:0,4 (Б). Для колоночной хроматографии использовали силикагель L 40/100 мкм (Сhemapol, ЧССР). Вещества на пластинках обнаруживали в УФ-свете, параами йода, обугливанием, реактивом на фосфорсодержащие органические вещества [14].

Функциональную активность регуляторов исследовали на приборе «Лаборатория газов крови ИЛ-217» при условиях, моделирующих физиологические: 37° С,  $p\text{CO}_2$  5,3 кПа, pH 7,4, концентрация  $\text{Cl}^-$  0,15 М, гемоглобина 0,154 мМ. Мольное соотношение регулятор — гемоглобин 5:1.

Данные элементного анализа соответствовали расчетным значениям.

*1,2-Бис(дифенилоксифосфорилокси)этан (III)*. К раствору 7,0 мл дифенилхлорфосфата (36% избыток) в 25 мл сухого хлороформа и 4 мл сухого пиридина при перемешивании и температуре — 20° С прибавляли по каплям раствор 0,70 мл этиленгликоля в 5 мл сухого хлороформа. Перемешивали 1 ч при — 20° С, выдерживали 16 ч при 20° С. Далее перемешивали 1 ч при 30° С, добавляли 15 мл воды, перемешивали 0,5 ч и экстрагировали продукт эфиром (2×100 мл). Экстракт промывали 1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  до pH 3, водой (15 мл), 2%  $\text{KHCO}_3$  до pH 9 и водой до pH 7, сушили безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Остаток после упаривания очищали на колонке 2,2×30 см, вымывая продукт смесью эфир — бензол, 1:4. После упаривания и сушки в вакууме бесцветная жидкость закристаллизовалась. Выход 5,496 г (86,7%), т. пл. 32,5—33,5° С.  $R_f$  0,3 (А).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): — 2,87. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 3065, 2950, 1585, 1485, 1290, 1215, 1185, 1160, 1020, 765, 690.

*1,2-Бис(дифенилоксифосфорилокси)пропан (IV)*. По аналогичной методике 2,0 мл 1,2-пропандиола вводили во взаимодействие с 13,0 мл дифенилхлорфосфата (15% избыток) в присутствии 6 мл сухого пиридина. Хроматографировали на колонке 2,5×40 см, продукт вымывали смесью эфир — бензол, 1:5. Выход 12,33 г (83,5%).  $n_D^{20}$  1,5432.  $R_f$  0,4 (А). Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): — 2,95; — 3,60. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 3065, 2960, 2850, 1585, 1487, 1290, 1215, 1185, 1160, 1010, 755, 690.

*Бисфосфат этиленгликоля, тетрациклогексиламмониевая соль (VII)*. Раствор 2,215 г бисфосфата (III) в 12 мл ледяной  $\text{CH}_3\text{COOH}$  гидрировали при 35° С над 0,25 г двуокиси платины, контролируя прохождение реакции хроматографически. Платиновую чернь отфильтровывали, промывали  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (3×10 мл) и водой (6×10 мл). Фильтрат упаривали в вакууме при температуре не выше 40° С, остаток выпаривали с водой (6×15 мл). Затем остаток растворяли в 2 мл воды, доводили pH раствора до 13 циклогексиланином. Продукт осаждали 100 мл изопропанола при 5° С, осадок отсасывали, промывали изопропанолом (4×10 мл), ацетоном (4×10 мл) и эфиром (4×20 мл). Сушили над  $\text{P}_2\text{O}_5$  3 ч при 25 Па и 40° С. Выход 2,335 г (85,9%), т. пл. 150—151° С.  $R_f$  0,6 (Б). Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ , м.д.): — 2,65 г (т,  $J_{\text{P-H}}$  7,7 Гц).

*Бисфосфат 1,2-пропандиола, трициклогексиламмониевая соль (VIII)*. По методике, аналогичной предыдущей, гидрированием 1,870 г бисфосфата (IV) над 0,35 г двуокиси платины получен бисфосфат, выделенный в виде соли (VIII). Выход 1,520 г (82,3%), т. пл. 142—143° С.  $R_f$  0,5 (Б). Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ , м.д.): — 3,19; — 1,93 (д и т соответственно,  $J_{\text{P-H}}$  6,0 Гц).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Розенберг Г. Я. В кн.: Тезисы докладов XII Международного конгресса по переливанию крови. М.: Медицина, 1969, с. 13—14.
2. Розенберг Г. Я., Хачатурьян А. А., Шлимак В. М. Пробл. гематологии и переливания крови, 1979, т. 24, № 8, с. 3—10.
3. Vonneaux F., Labrude P., Dellacherie E. *Experientia*, 1981, v. 37, № 8, p. 884—886.
4. Rabiner S. F., Helbert J. R., Lopas L., Zriedman L. H. *J. Exper. Med.*, 1967, v. 126, № 6, p. 1126—1142.
5. Dudziak R., Bonhard K. *Anaestisist*, 1980, v. 29, № 4, p. 181—189.
6. Groth T. L., de Verdier C. H., Garby L. *Acta biol. et med. Germ.*, 1977, v. 36, № 3—4, p. 523—529.
7. Hamasaki N., Rose Z. B. *J. Biol. Chem.*, 1974, v. 249, № 24, p. 7896—7901.
8. Arnone A., Benesch R. E., Benesch R. J. *Mol. Biol.*, 1977, v. 115, № 4, p. 627—642.
9. Brygier J., Paul C. *Biochimie*, 1976, B. 58, № 6, S. 755—756.
10. Djordjevich L., Miller I. F. *Exp. Hematol.*, 1980, v. 8, № 5, p. 584—592.
11. Arnone A. *Nature*, 1972, v. 237, № 5351, p. 146—149.
12. Baer E. *J. Biol. Chem.*, 1950, v. 185, № 2, p. 763—767.
13. Benesch R. E., Benesch R., Yu C. I. *Biochemistry*, 1969, v. 8, № 6, p. 2567—2581.
14. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y. *J. Lip. Res.*, 1968, v. 9, № 3, p. 396.

Поступила в редакцию  
29.XI.1984

### SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF GLYCOLS BIPHOSPHATES, REGULATORS OF REVERSIBLE HEMOGLOBIN OXYGENATION

CHUVILIN A. N., SEREBRENNIKOVA G. A., EVSTIGNEEVA R. P.,  
KOLTSOVA G. N.\*, VYAZOVA E. P.\*, ROSENBERG G. Ya.\*

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

*\*Central Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Moscow*

Bisphosphates of glycols, ethyleneglycol and 1,2-propanediol, were synthesized. These structural analogues of 2,3-diphosphoglyceric acid were shown to reduce significantly the oxygen affinity of stripped hemoglobin.