



УДК 547.963.4:577.352.26

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМНЫХ ФОРМ ГИДРОФОБНЫХ  
ПРОИЗВОДНЫХ ГЕМИНАУшакова И. П., Серебрянникова Г. А., Никанорова Е. А.,  
Евстигнева Р. П.

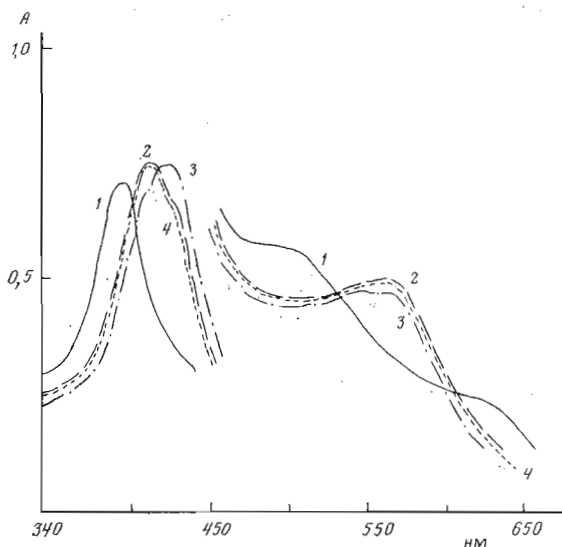
Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Описано получение липидных производных гемина, содержащих остатки фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и дигексадецилглицерина, а также ковалентно присоединенный метиловый эфир гистидина. Изучалось встраивание синтезированных соединений в фосфолипидные везикулярные мембраны. Показано, что восстановленные формы данных систем обладают способностью обратимо связывать кислород.

В последние годы успешно развиваются работы по созданию модели эритроцита на основе встроенных в липосомы производных протогема IX [1—4]. Липосомный гем должен включать производные металлопорфиринов, способные обратимо связывать кислород и оксид углерода. Для выполнения этих функций в их составе должен присутствовать структурный элемент, который мог бы образовать координационную связь с атомом железа с одной стороны от плоскости порфиринового кольца, подобно проксимальному гистидину гемоглобина. Тогда становится возможным присоединение кислорода с другой стороны порфиринового кольца. С этой целью используется ковалентное [5, 6] и координационное [7] присоединение гидрофобных производных имидазола или гистидинсодержащих пептидов. Для моделирования функций эритроцита на основе липосомного гема необходимо увеличение гидрофобности железопорфирина. Гидрофобные группы должны имитировать белковое окружение протетических групп гемоглобина, предохраняющее атом железа гема от координационного насыщения и необратимого окисления.

По нашему мнению, для создания гидрофобного окружения целесообразно осуществлять ковалентное присоединение по карбоксильным группам гемина фрагментов наиболее распространенных мембранных фосфолипидов — фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина. Наличие остатков этих фосфолипидов в молекуле липидного производного гема позволяет встраивать данные соединения в мембраны без значительного нарушения структурной организации фосфолипидного бислоя. Получение производного гема, содержащего остаток дигексадецилглицерина, вызвано необходимостью исследовать поведение липосомного гема при контакте с компонентами крови, так как известно, что мембраны, содержащие липиды с простой эфирной связью, более устойчивы к расщеплению при взаимодействии с липопротеинами сыворотки крови [8, 9]. Ковалентное присоединение метилового эфира гистидина к липидным производным гемина позволило синтезировать 6(7)-[1-ацил-3-(триметиламмониеэтилфосфо)-sn-глицеро-2]-7(6)-(метиловый эфир N<sup>α</sup>-гистидино)протогемин IX (1), 6(7)-(фосфатидилэтаноламино)-7(6)-(метиловый эфир N<sup>α</sup>-гистидино)протогемин IX (2), 6(7)-(1,2-*rac*-дигексадецилглицеро)7(6)-(метиловый эфир N<sup>α</sup>-гистидино)протогемин IX (3).

Для синтеза липидных производных гема (1, 2) были использованы природный фосфатидилэтаноламин, лизофосфатидилхолин, полученный ферментативом фосфатидилхолина фосфолипазой A<sub>2</sub>, и *rac*-дигексадецилглицерин, полученный по методу [10]. Липидные производные гема (1—3) синтезировали по приведенной схеме. Активацию гема осуществляли по методу смешанных ангидридов в пиридине в присутствии эквимолярных количеств триэтиламина с использованием разбавлен-



Электронные спектры соединения (1), встроенного в фосфатидилхолиновую мембрану: 1 — ферриформа  $Fe^{3+}$ ; 2 — ферроформа  $Fe^{2+}$ ; 3 — ферриформа, оксигенированный комплекс; 4 — дезоксигенированный комплекс. Концентрация соединения (1) 0,01 мг/мл, фосфатидилхолина 0,1 мг/мл. Масштаб в области 450–660 нм увеличен в 10 раз. Соответствующие спектры соединений (2, 3) абсолютно идентичны приведенным

ного раствора пивалоилхлорида при температуре от  $-10$  до  $-15^{\circ}C$ . При этом происходит активация преимущественно одной карбоксильной группы. Контроль за активацией гемина (4) вели с помощью тонкослойной хроматографии. Активированный комплекс (5) без выделения вводили во взаимодействие с лизофосфатидилхолином, фосфатидилэтаноламином или дигексадецилглицерином в хлористом метиле. Таким путем были синтезированы соединения (6–8). Для получения соединений (1–3) свободную карбоксильную группу липидных производных (6–8) активировали пивалоилхлоридом в пиридине в присутствии триэтиламина, затем добавляли метиловый эфир гистидина; после хроматографической очистки получали соединения (1–3).

Состав и строение соединений (1–3, 6–8) подтверждены данными ИК-, УФ-спектров, элементного анализа.

Изучалось встраивание синтезированных соединений (1–3, 6–8) в фосфолипидные везикулярные мембраны. Показано, что при весовом соотношении фосфатидилхолин — гидрофобное производное гемина (10 : 1) исследуемые соединения (1–3, 6–8) при обработке ультразвуком соответствующих дисперсий встраиваются в бислоиные везикулярные мембраны на 90–96% от взятого количества. Образующиеся при этом везикулярные дисперсии устойчивы при хранении в течение месяца при  $5^{\circ}C$ .

Электронные спектры соединений (1–3) в метаноле и везикулярной форме идентичны. На основании этих данных можно предположить, что плоскость порфиринового кольца исследуемых соединений расположена в непосредственной близости от полярной области мембраны, что согласуется с литературными данными [11].

Для везикулярной формы гемина характерно наличие полосы Сорэ при 390 нм, тогда как для везикулярной формы соединений (1–3, 6–8) эта полоса сдвигается до 400 нм, что обусловлено, по-видимому, изменением окружения атома железа при введении в молекулу гемина гидрофобных групп. Соединения (1–3) в везикулярной форме восстанавливали дитионитом натрия. Способность ферроформ соединений (1–3), встроенных в фосфатидилхолиновую мембрану, связывать кислород изучали спектрофотометрически (рисунок). Соединения (1–3) в восстановленной форме образуют пентакоординационный комплекс, о чем свиде-

тельствует характерный пик (570 нм с плечом при 540 нм) и полоса Сорэ при 410 нм (рисунок, 2). При этом происходит внутренняя координация атома железа гема с атомом азота гистидина [12]. После барботирования кислорода через исследуемую систему был получен электронный спектр с двумя максимумами поглощения (565 и 545 нм; полоса Сорэ 420 нм; рисунок, 3), что характерно для оксигенированного гексакоординационного комплекса [12]. Аналогичные спектральные характеристики имеет гексакоординационный комплекс ферроформы соединений (1–3) с имидазолом. При удалении кислорода из системы получен электронный спектр, характерный для восстановленного состояния соединений (1–3): полоса поглощения при 570 нм, плечо 540 нм. Однако аксиальная координация гистидина, связанного с остатком пропионовой кислоты порфиринового кольца, и атома железа непрочна. Оксигенированный комплекс устойчив только в присутствии восстановителя. По-видимому, для получения обратимых переносчиком кислорода целесообразно создание гидрофобных производных гемина, в которых гистидин отделен от гема большим числом углеродных атомов, чем в соединениях (1–3), и имеет поэтому большую возможность приблизиться к железу.

### Экспериментальная часть

ИК-спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu IR-435, УФ-спектры — на приборе Shimadzu UV-240 (Япония). ТСХ проводили на силуфоле UV 254 (Merck, ФРГ), колоночную хроматографию — на силикагеле 40/100 мкм (Chemapol, ЧССР). Фосфатидилхоллин и фосфатидилэтаноламин выделяли из яичных желтков по методу [13]. *гас*-Дигексадецилглицерин получали по методу [10]. Протогемин IX отечественного производства. Данные элементного анализа удовлетворительно соответствовали расчетным.

*6(7)-(Фосфатидилэтаноламино)протогемин IX (7)*. Протогемин IX (0,1 г) растворяли в 7 мл безводного пиридина и перемешивали 5 мин при 20°С, добавляли 0,06 мл триэтиламина, охлаждали до -10÷-15°С и прибавляли по каплям (30 мин) при интенсивном перемешивании 0,06 мл пивалоилхлорида в 5 мл безводного  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . К реакционной смеси добавляли раствор 0,11 г фосфатидилэтанолamina в 3 мл безводного  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , перемешивали 4 ч при 20°С, выливали в 100 мл 5% HCl, экстрагировали хлороформом, промывали водой до нейтральной реакции и органическую фазу упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке (1,5×25 см) с 20 г силикагеля, вещество элюировали смесью хлороформ — метанол, 20 : 1, скорость элюирования 2 мл/мин. Выход 0,14 г (66%).  $R_f$  0,7 (хлороформ — метанол, 9 : 1). ИК-спектр (вазелиновое масло): 1730, 1620, 1420  $\text{см}^{-1}$ .

*6(7) - [1-Ацил-3-(триметиламмониетилфосфо)-sn-глицеро-2]протогемин IX (6)*. Гемин (0,2 г) активировали 0,12 г пивалоилхлорида как описано выше, добавляли 0,13 г лизофосфатидилхолина и перемешивали 4 ч при 20°С. Выделение и очистку соединения (6) проводили как в предыдущем опыте. Выход 0,27 г (77%).  $R_f$  0,68 (хлороформ — метанол, 10 : 1). ИК-спектр (вазелиновое масло): 1730, 1630, 1360, 722  $\text{см}^{-1}$ .

*6(7)-гас-Дигексадецилглицеропротогемин IX (8)*. Гемин (0,1 г) активировали 0,06 г пивалоилхлорида как описано выше. Добавляли раствор 0,12 г *гас*-дигексадецилглицерина в 5 мл безводного  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , перемешивали 4 ч при 20°С. Выделение и очистку соединения (8) проводили аналогично описанному выше. Выход 0,17 г (92%).  $R_f$  0,75 (хлороформ — метанол, 9 : 1). ИК-спектр (вазелиновое масло): 3450, 1730, 1700  $\text{см}^{-1}$ .

*6(7)-(1,2-гас-Дигексадецилглицеро)-7(6)-(метилловый эфир N<sup>α</sup>-гистидино)протогемин IX (3)*. Дихлоридат метилового эфира гистидина (0,04 г) растворяли в 1,4 мл безводного метанола, охлаждали, не допуская кристаллизации, добавляли метилат натрия, полученный из 0,008 г натрия и 0,16 мл безводного метанола, и выдерживали 20 мин при 0°С. Добавляли затем 2 мл безводного эфира, фильтровали и упаривали в вакууме. Полученный метилловый эфир гистидина растворяли в 2 мл без-

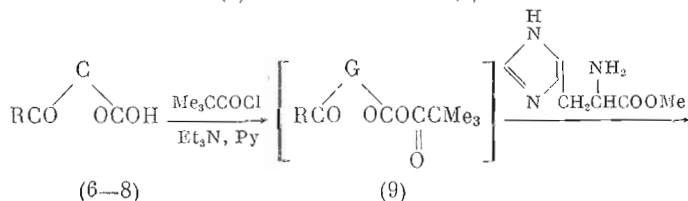
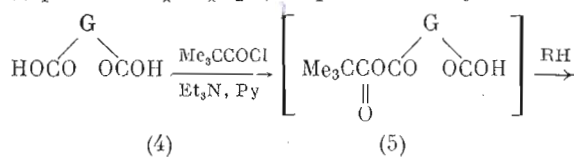
водного  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и добавляли к 0,13 г 6(7)-дигексадецилглицеропрогогемина IX (8), активированного по свободной карбоксильной группе пивалоилхлоридом как описано ранее (см. получение производного (7)). Реакционную массу перемешивали 4 ч при  $20^\circ\text{C}$ , выделение и очистку проводили как описано выше. Выход 0,05 г (38%).  $R_f$  0,78 (хлороформ — метанол, 9 : 1). ИК-спектр (вазелиновое масло); 1735, 1660, 1530  $\text{cm}^{-1}$ .

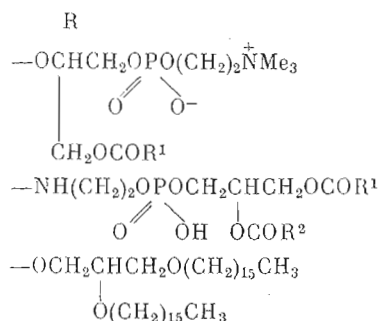
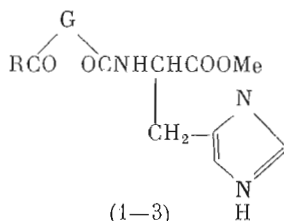
6(7)-(Фосфатидилэтаноламино)-7(6)-(метиловый эфир  $N^\alpha$ -гистидино)-прогогемин IX (2). Соединение (7) (0,2 г) растворяли в 10 мл безводного пиридина (перемешивание 5 мин при  $20^\circ\text{C}$ ). Далее добавляли 0,1 г свежеприготовленного метилового эфира гистидина в 2 мл безводного  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , перемешивали 4 ч при  $20^\circ\text{C}$ , затем выливали в 100 мл 5%  $\text{HCl}$ , экстрагировали хлороформом, экстракт промывали водой до нейтральной реакции и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке ( $2 \times 25$  см) с 25 г силикагеля. Вещество элюировали системой хлороформ — метанол 20 : 1, скорость элюирования 2 мл/мин. Выход 0,07 г (32%).  $R_f$  0,74 (хлороформ — метанол, 10 : 1). ИК-спектр (вазелиновое масло): 1730, 1610, 600  $\text{cm}^{-1}$ .

6(7) - [1-Ацил-3-(триметиламмониетилфосфо) - *sn*-глицеро-2]-7(6)-(метиловый эфир  $N^\alpha$ -гистидино)прогогемин IX (1). Соединение (6) (0,1 г) растворяли в 5 мл безводного пиридина (перемешивание 5 мин при  $20^\circ\text{C}$ ), добавляли 0,12 мл триэтиламина, охлаждали до  $-10 \div -15^\circ\text{C}$  и добавляли 0,06 мл пивалоилхлорида, перемешивали 40 мин. Затем добавляли 0,05 г свежеприготовленного метилового эфира гистидина в 2 мл безводного  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , перемешивали 4 ч при  $20^\circ\text{C}$ , выливали в 100 мл 5%  $\text{HCl}$ , экстрагировали хлороформом; экстракт промывали водой и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке ( $1,5 \times 25$  см) с 20 г силикагеля. Вещество элюировали системой хлороформ — метанол, 20 : 1, скорость элюирования 2 мл/мин. Выход 0,06 г (53%).  $R_f$  0,75 (хлороформ — метанол, 10 : 1). ИК-спектр (вазелиновое масло): 1731, 1668, 900, 600  $\text{cm}^{-1}$ .

Бислойные везикулы со встроенными соединениями (1–3, 6–8) готовили следующим образом: смесь растворов 20 мг фосфатидилхолина в бензоле и 2 мг производного гемина в хлороформе (весовое соотношение липид — производное гемина 10 : 1) упаривали в вакууме досуха. После добавления 2 мл воды образец встряхивали 10 мин и полученную грубую дисперсию обрабатывали 10 мин ультразвуком на приборе УЗДН-1 (частота 44 кГц) при  $5^\circ\text{C}$ . Липидную дисперсию затем центрифугировали при 8000 g и использовали для спектральных исследований. Количество встроенных соединений определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность в области полосы Соре фосфолипидных дисперсий, растворенных в смеси хлороформ — метанол, 2 : 1, с применением калибровочных графиков для соединений (1–3, 6–8). Для восстановления производных гемина из ферриформы в ферроформу использовали избыток дитионита натрия. Оксигенацию исследуемых соединений, встроенных в бислойную фосфолипидную мембрану, осуществляли кратковременным барботированием кислорода. Дезоксигенацию комплексов проводили вакуумированием или продувкой аргоном или азотом.

Весовую концентрацию фосфатидилхолина в везикулярном растворе находили по содержание фосфора, определяемому по методу [14]



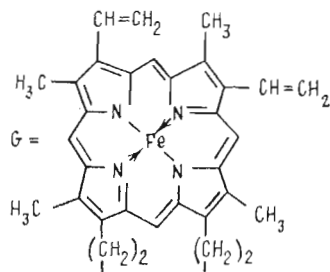


R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> — углеводородные радикалы

Соединения  
(1,6)

(2,7)

(3,8)



### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hasegawa E., Matsushita Y., Kaneda M., Eshima K., Tsuchida E. // J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1984. № 6. P. 1147-1151.
- Tsuchida E., Nishide H., Yuasa M., Hasegawa E., Matsushita Y., Eshima K. // J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1985. № 2. P. 275-278.
- Hasegawa E., Eshima K., Matsushita Y., Nishide H., Tsuchida E. // Biochim. et biophys. acta. 1986. V. 862. № 2. P. 235-242.
- Yuasa M., Tani Y., Nishide H., Tsuchida E. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 900. № 1. P. 160-162.
- Ушакова И. П., Василенко И. А., Радигин В. А., Молокоедов А. С., Серебренникова Г. А., Филиппович Е. И., Евстигнеева Р. П. // Биоорг. химия. 1979. Т. 5. № 10. С. 1550-1557.
- Eshima K., Yuasa M., Nishide H., Tsuchida E. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1982. № 14. P. 793-798.
- Tsuchida E., Nishide H., Sekine M., Yamagishi A. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 734. № 2. P. 274-278.
- Ana J. // Lipid Res. 1979. V. 20. № 7. P. 817-824.
- Hermetter A., Paltauf F. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 762. № 3. P. 444-450.
- Аникин М. В., Ушакова И. П., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Ден. статья 2-7/5932 от 27.08.87.
- Cannon J. B., Kuo F.-S., Pasternak R. F., Wong N. M., Muller-Eberhard U. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 16. P. 3715-3721.
- Momenteau M., Rougee M., Lock B. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 71. № 1. P. 63-76.
- Dawson R. W. // Biochem. J. 1963. V. 88. № 3. P. 414-423.
- Bartlett G. R. // J. Biol. Chem. 1959. V. 234. № 3. P. 466.

Поступила в редакцию  
30.XII.1988

### PREPARATION OF LIPOSOMAL FORMS OF HEMIN HYDROPHOBIC DERIVATIVES

USHAKOVA I. P., SEREBRENNIKOVA G. A., NIKANOROVA E. A.,  
EVSTIGNEEVA R. P.

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

The synthesis of hemin-lipid compounds is described. The compounds obtained are composed of phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine, dihexadecylglycerol fragments and carry a covalently bound histidine methyl ester. The incorporation of the compounds synthesized into the phospholipid bilayer was studied, and reversible oxygen binding by the reduced hemin systems was demonstrated.