



УДК 547.95 : 547.462.2

© 1993 М. А. Саблина, И. П. Ушакова,
Е. В. Дементьева, А. А. Дергоусов*, Г. А. Серебрянникова

СИНТЕЗ АНАЛОГОВ ФАКТОРА АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

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

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Синтезированы структурные аналоги липидного биорегулятора, фактора активации тромбоцитов: *rac*-1-октадецил-2-аллилглицеро-3-фосфохолин и *rac*-1-октадецил-2-аллил-1-тиоглицеро-3-фосфохолин. Установлено, что полученные соединения в концентрациях 10^{-5} – 10^{-7} М не вызывают агрегации тромбоцитов и не являются антагонистами фактора активации тромбоцитов.

В последние годы среди фосфолипидов с простой эфирной связью выявлен регулятор широкого спектра действия, фактор активации тромбоцитов (ФАТ), *sn*-1-алкил-2-ацетилглицеро-3-фосфохолин [1, 2], и приведены данные о существовании ряда липидных биорегуляторов, структурно родственных ФАТ [3, 4]. Это стимулировало широкое развитие за рубежом фундаментальных и прикладных исследований по изучению липидной регуляции клеток и физиологических процессов организма. ФАТ выступает как сильно действующий медиатор многих биологических процессов: стимулирует дегрануляцию и агрегацию тромбоцитов и нейтрофилов, увеличивает проницаемость кровеносных сосудов, является модулятором внутриклеточной сигнализации и иммуностимулятором [5].

ФАТ играет важную роль в ряде физиологических и патологических реакций организма, таких, как воспалительные процессы, анафилактический шок, аллергия, гипотензия, ишемическая болезнь сердца и др. [6].

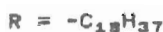
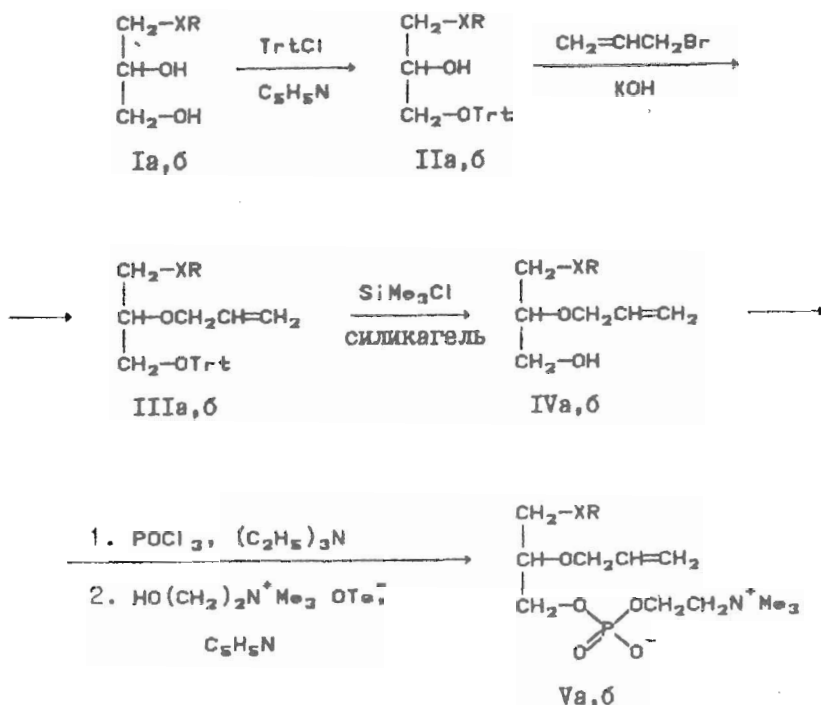
ФАТ специфически связывается с рядом белков: альбумином, кислым α_1 -гликопротеином, С-реактивным белком и др. Его комплекс с С-реактивным белком не обладает тромбоцитактивирующим действием, но является сильным иммуномодулятором [7].

В настоящее время интенсивно развивается направление по синтезу модифицированных форм ФАТ с целью поиска терапевтических агентов, таких, как агонисты и антагонисты ФАТ [8].

Модификация молекулы ФАТ осуществляется по различным участкам, в частности путем замены ацетоксигруппы при C_2 на короткоцепочечные неметаболизируемые группировки, например алкоксильные [9], а также путем замены кислорода на серу при C_1 [10].

В настоящем сообщении нами описан синтез подобных аналогов ФАТ (схема): *rac*-1-октадецил-2-аллилглицеро-3-фосфохолина (Va) и *rac*-1-октадецил-2-аллил-1-тиоглицеро-3-фосфохолина (Vб).

Исходные *rac*-1-октадецилглицерин (Ia) [11] и *rac*-1-октадецил-1-тиоглицерин (Iб) [12] вводили в реакцию тритилирования с целью защиты первичной ОН-группы. Промежуточные тритильные производные (IIa, б) переводили в калиевые соли кипячением с едким кали в среде бензола или толуола с азетропной отгонкой воды и эти соли вводили в реакцию с аллилбромидом. Последующее



удаление тритильной защитной группировки достигалось действием триметилхлорсилана на силикагеле [13].

Полученные *rac*-1-октадецил-2-аллилглицерин (IVa) и *rac*-1-октадецил-2-аллил-1-тиоглицерин (IVб) переводили в соответствующие фосфатидилхолины (Va, б) последовательным взаимодействием с хлороксидом фосфора и тозилатом холина в присутствии пиридина и триэтиламина в хлороформе [14].

Индивидуальность и структуру всех синтезированных соединений подтверждали данные ТСХ, ИК-, ¹H-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии; спектры ³¹P-ЯМР фосфолипидов (Va, б) показали наличие единичных пиков. Данные элементного анализа соответствовали расчетным.

Фосфолипиды (Va) и (Vб) были изучены в отношении их способности вызывать агрегацию тромбоцитов человека или ингибировать этот процесс в богатой тромбоцитами плазме (БТП). Установлено, что в концентрациях 10⁻⁵–10⁻⁷ М они не вызывали агрегации тромбоцитов в данном тесте. Предварительное добавление к БТП как (Va), так и (Vб) в концентрациях 10⁻⁵–10⁻⁷ М не блокировало агрегацию тромбоцитов, вызываемую ФАТ в концентрации 10⁻⁶ М.

Экспериментальная часть

ИК-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu UR-435 (Япония) в виде пасты в вазелиновом масле для кристаллических веществ и в тонкой пленке — для маслообразных. Спектры ЯМР регистрировали на импульсном фурье-спек-

рометре Bruker MSL-200 (ФРГ). Спектры ^1H -ЯМР записывали в дейтерохлороформе или его смеси с дейтерометанолом и D_2O (1:1:0,15). Рабочая частота 200 МГц, внутренний стандарт — тетраметилсилан, приведены значения химических сдвигов (δ , м. д.) и КССВ (J , Гц). Спектры ^{31}P -ЯМР снимали в смеси $\text{CDCl}_3 - \text{CD}_3\text{OD} - \text{D}_2\text{O}$ (1:1:0,15^{*)}, рабочая частота 81 МГц. Масс-спектры сняты на времяпрелетном масс-спектрометре МСБХ с ионизацией осколками деления калифорния-252. ТСХ проводили на силуфоле UV-254 (Kavaliar, ЧСФР) в системах: хлороформ (А), гексан — эфир, 2:1 (Б), гексан — эфир, 1:1 (В), хлороформ — метанол — вода, 65:25:4 (Г); вещества обнаруживали прокаливанием или обработкой раствором перманганата калия (в случае соединений с аллильной группой) и молибденовым синим (в случае фосфолипидов). Хроматографическую очистку соединений проводили на силикагеле L 40/100 мкм (Chemapol, ЧСФР).

БТП получали центрифугированием (200g, 15 мин) донорской крови, стабилизированной 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Агрегацию тромбоцитов определяли по методу Борна [15] при 37° С с помощью агрегометра Thromlite (СП «Биохиммак», Россия), длина волны зондирующего излучения 660 нм. Рабочие растворы исследуемых соединений в этаноле (10 мг/мл) разбавляли до необходимой концентрации 0,9% раствором хлорида натрия и затем добавляли в БТП. Концентрация этанола в БТП в процессе исследования не превышала 0,1%.

rac-1-Октадецил-3-третилглицерин (IIa). К раствору 13,0 г (90 ммоль) *rac-1-октадецилглицерина* (Ia) в 40 мл безводного хлороформа и 3 мл безводного пиридина добавляли при охлаждении до 7° С 2,5 г (90 ммоль) третилхлорида и перемешивали 4 ч при 7° С. К реакционной смеси приливали 40 мл хлороформа и отделенную органическую фазу промывали 1% HCl (100 мл), а затем водой (3×100 мл) до pH 7. Хлороформный раствор сушили безводным Na_2SO_4 , растворитель удаляли в вакууме. Остаток перекристаллизовывали из гептана и хроматографировали на колонке с силикагелем (30×250 мм). Вещество элюировали смесью толуол — эфир (9:1). Фракции, содержащие вещество, упаривали, остаток сушили в вакууме (130 Па, 60° С, 4 ч). Выход 4,5 г (89%). R_f 0,49 (А). ИК-спектр (в вазелиновом масле, cm^{-1}): 3600 (ср, O—H), 3100—3050 (сл, C—H, аром.), 2900, 2840 (с, C—H, насыщ.), 1600 (ср, C=C, аром.), 1490 (с, C=C, аром.), 1470, 1440 (с, C—H, насыщ.), 1380 (ср, C—H, насыщ.), 1110 (с, C—O—C), 1060 (с, C—O, CH—OH), 750, 700 (ср, C—H, аром.), 710 (ср, C—H, насыщ.), 670, 630 (ср, внеплоск, C—H, аром.).

rac-1-Октадецил-3-третил-1-тиоглицерин (IIб) получали в результате взаимодействия 1,0 г (2,77 ммоль) *rac-1-октадецил-1-тиоглицерина* (Iб) с 0,75 г (2,77 ммоль) третилхлорида в хлороформе (10 мл) с пиридином (0,8 мл) в условиях предыдущего опыта. Выход 2 г. R_f 0,72 (А). Соединение (IIб) вводили в реакцию алкилирования без дополнительной очистки.

rac-1-Октадецил-2-аллил-3-третилглицерин (IIIa). К раствору 6,4 г (10,8 ммоль) третилэпокси производного (IIa) в 50 мл толуола добавляли 1,2 г (21 ммоль) пористообразного едкого кали и кипятили 5 ч при интенсивном перемешивании с азеотропной отгонкой воды. Затем добавляли 7,0 мл (79 ммоль) аллилбромид, перемешивали 3 ч при 80° С, после охлаждения растворитель удаляли в вакууме. Остаток растворяли в 100 мл эфира, промывали водой (3×100 мл) до pH 7, органический слой сушили безводным Na_2SO_4 , растворитель упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (40×200 мм), вещество элюировали смесью гексан — эфир (5:1). Полученное вещество высушивали (130 Па, 60° С, 4 ч). Выход 5,3 г (77%). R_f 0,57 (Б). ИК-спектр (пленка, cm^{-1}): 3100—3050 (сл, C—H, аром.), 2900, 2840 (с, C—H, насыщ.), 1640 (сл, C=C, —CH—CH₂), 1600 (ср, C=C, аром.), 1490 (с, C=C, аром.),

* Соотношения растворителей здесь и далее объемные.

1470, 1445 (с, С—Н, насыщ.), 1100 (с, С—О—С), 920 (ср, С—Н, —СН=СН₂), 760, 740, 700 (с, внеплоск. С—Н, аром.), 630 (ср, внеплоск. С—Н, аром.), ¹Н-ЯМР-спектр (СDCl₃): 0,88 (т, J 5, 3Н, —СН₂СН₃), 1,25 (уш. с, 3ОН, —(СН₂)₁₅—), 1,5 (квинт, J 7, 2Н, —ОСН₂СН₂—), 3,17, (д, J 5, 2Н, —СН₂ОСН₂—), 3,37 (т, J 7, 2Н, —СН₂ОСН₂—), 3,48 (дд, J 10, 6, 1Н, —СН₂ОТрт), 3,54 (дд, J 10, 6, 1Н, —СН₂ОТрт), 3,62 (дтд, J 6, 5, 4,5, 1Н, >СНО—), 4,04 (ддт, J 14, 6, 2, 1Н, —ОСН₂СН=СН₂), 4,11 (ддт, J 14, 6, 2, 1Н, —ОСН₂СН=СН₂), 5,1 (ддт, J 10,5, 2, 2, 1Н, —СН=СН₂), 5,24 (ддт, J 17, 2, 2, 1Н, —СН=СН₂), 5,88 (ддт, J 17, 10,5, 6, 1Н, —СН=СН₂), 7,1—7,47 (м, 15Н, —С₆Н₅).

гас-1-Октадецил-2-аллил-3-тритил-1-тиоглицерин (IIIб). К раствору 2 г эфира (IIIб) в 20 мл бензола добавляли 0,4 г (7 ммоль) порошкообразного едкого кали и кипятили 3 ч в токе азота при интенсивном перемешивании с азеотропной отгонкой воды. Затем добавляли 1,9 мл (16 ммоль) аллилбромид и перемешивали 3 ч в токе азота при 80° С. После охлаждения реакционной смеси растворитель упаривали в вакууме, остаток растворяли в 50 мл эфира, промывали водой (3×50 мл) до рН 7, органический слой сушили безводным Na₂SO₄, растворитель удаляли в вакууме. Остаток высушивали (130 Па, 20° С, 6 ч). Выход 2 г. R_f 0,8 (А). Вещество подвергали детритилированию без дополнительной очистки.

гас-1-Октадецил-2-аллилглицерин (IVа). К раствору 2,2 г (3,6 ммоль) соединения (IIIа) в 40 мл безводного хлороформа добавляли при перемешивании 6 г активированного (110° С, 8 ч) силикагеля L 40/100 мкм, затем постепенно приливали раствор 2 мл (20 ммоль) триметилхлорсилана в 20 мл безводного хлороформа и перемешивали 1 ч при 20° С. К реакционной смеси добавляли 60 мл смеси пиридин — вода (1 : 2), перемешивали 1 ч, затем фильтровали, промывали 1% HCl (80 мл) и водой (3×80 мл) до рН 7. Остаток после удаления растворителя кристаллизовали из гексана и хроматографировали на колонке с силикагелем (20×250 мм). Вещество элюировали смесью бензол — эфир, 9 : 1. Полученное вещество высушивали (130 Па, 60° С, 4 ч). Выход 0,9 г (70%). R_f 0,31 (Б). ИК-спектр (пленка, см⁻¹): 3400 (ср, О—Н), 2900, 2840 (с, С—Н, насыщ.), 1640 (сл, С=C, —СН=СН₂), 1470 (с, С—Н, насыщ.), 1100 (с, С—О—С), 1060 (с, С—О, СН—ОН), 920 (ср, С—Н, —СН=СН₂), 720 (ср, С—Н, насыщ.), ¹Н-ЯМР-спектр (СDCl₃): 0,89 (т, J 6,5, 3Н, —СН₂СН₃), 1,24 (уш. с, 3ОН, —(СН₂)₁₅—), 1,56 (квинт, J 6,5, 2Н, —ОСН₂СН₂—), 2,13 (м, 1Н, —СН₂ОН), 3,42 (т, J 6,5, 2Н, —СН₂ОСН₂—), 3,4—3,8 (м, 5Н, —ОСН₂СНСН₂О—), 4,08 (ддт, J 12, 5,5, 1,5, 1Н, —ОСН₂СН=СН₂), 4,17 (ддт, J 12, 5,5, 1,5, 1Н, —ОСН₂СН=СН₂), 5,17 (ддт, J 10, 1,5, 1,5, 1Н, —СН=СН₂), 5,26 (ддт, J 16, 1,5, 1,5, 1Н, —СН=СН₂), 5,92 (ддт, J 16, 10, 5,5, 1Н, —СН=СН₂).

гас-1-Октадецил-2-аллил-1-тиоглицерин (IVб) получали из 2 г соединения (IIIб) в условиях предыдущего опыта. Выход 0,8 г (72% на соединение (Iб)). R_f 0,34 (Б). ИК-спектр (в вазелиновом масле, см⁻¹): 3400 (ср, О—Н), 2900, 2840 (с, С—Н, насыщ.), 1640 (сл, С=C, —СН=СН₂), 1470 (с, С—Н, насыщ.), 1070 (с, С—О—С), 1040 (с, С—О, СН—ОН), 920 (ср, С—Н, —СН=СН₂), 710 (ср, С—Н, насыщ.). Масс-спектр: m/z 400 (M — 1). ¹Н-ЯМР-спектр (СDCl₃): 0,85 (т, J 8,5, 3Н, —СН₂СН₃), 1,25 (уш. с, 3ОН, —(СН₂)₁₅—), 1,58 (квинт, J 7,5, 2Н, —СН₂СН₂—), 2,04 (м, 1Н, —СН₂ОН), 2,53 (т, J 7,5, 2Н, —СН₂СН₂—), 2,6 (дд, J 13,5, 7, 1Н, —СН₂СН₂—), 2,72 (дд, J 13,5, 5, 1Н, —СН₂СН₂—), 3,55 (ддд, J 7, 5,5, 5, 3,5, 1Н, >СНО—), 3,62 (дд, J 11,5, 5,5, 1Н, —СН₂ОН), 3,79 (дд, J 11,5, 3,5, 1Н, —СН₂ОН), 4,05 (ддт, J 8, 6, 1,5, 1Н, —ОСН₂СН=СН₂), 4,16 (ддт, J 8, 6, 1,5, 1Н, —ОСН₂СН=СН₂), 5,19 (ддт, J 10,5, 1,5, 1,5, 1Н, —СН=СН₂), 5,28 (ддт, J 16, 1,5, 1,5, 1Н, —СН=СН₂), 5,92 (ддт, J 16, 10,5, 6, 1Н, —СН=СН₂).

гас-1-Октадецил-2-аллилглицеро-3-фосфохолин (Va). К раствору 0,2 г (1,42 ммоль) хлороксида фосфора в 5 мл безводного хлороформа прибавляли по каплям раствор 0,44 г (1,13 ммоль) дизамещенного глицерина (IVа) и 0,14 г (1,42 ммоль) триэтиламина в 20 мл безводного хлороформа. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при 20° С, добавляли 0,7 г (8,68 ммоль) безводного пиридина

и перемешивали еще 30 мин. Затем к реакционной массе прибавляли 0,68 г (2,47 ммоль) тозилата холина и перемешивали 4 ч при 20° С. Далее реакционную смесь разбавляли 20 мл хлороформа, промывали 3% NaHCO₃ (50 мл), 5% HCl (50 мл) и водой (3×50 мл) до pH 7. Остаток после удаления растворителя хроматографировали на колонке с силикагелем (20×250 мм), вещество элюировали смесью хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4. Выход 0,37 г (60%). R_f 0,27 (Г). Масс-спектр: m/z 550 (M—1). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃ — CD₃OD — D₂O (1 : 1 : 0,15)): 0,6 (т, J 7,5, 3H, —CH₂CH₃), 0,98 (уш. с, 30H, —(CH₂)₁₅—), 1,28 (квинт, J 7, 2H, —OCH₂CH₂—), 2,92 (с, 9H, —N(CH₃)₃), 3,16 (т, J 7, 2H, —CH₂OCH₂—), 3,21 (дд, J 10,5, 6, 1H, —CH₂OCH₂—), 3,3 (м, 2H, —OCH₂CH₂N), 3,31 (дд, J 10,5, 6, 1H, —CH₂OCH₂—), 3,42 (тт, J 6, 5,5, 1H, >CHO—), 3,58 (дд, J 11, 5,5, 1H, —CH₂O—P), 3,69 (дд, J 11, 5,5, 1H, —CH₂O—P), 3,84 (ддт, J 14, 6, 2, 1H, —OCH₂CH=CH₂), 3,9 (ддт, J 14, 6, 2, 1H, —OCH₂CH=CH₂), 3,92 (м, 2H, —OCH₂CH₂N), 4,87 (ддт, J 10,5, 2, 2, 1H, —CH=CH₂), 5,0 (ддт, J 18, 2, 2, 1H, —CH=CH₂), 5,63 (ддт, J 18, 10,5, 6, 1H, —CH=CH₂).

гас-1-Октадецил-2-аллил-1-тиоглицеро-3-фосфохолин (Vб). К раствору 0,15 г (0,98 ммоль) хлороксида фосфора в 3 мл безводного хлороформа прибавляли по каплям раствор 0,3 г (0,75 ммоль) соединения (IVб) и 0,1 г (1,4 ммоль) триэтиламина в 10 мл безводного хлороформа, перемешивали 30 мин при 20° С в токе азота. Затем добавляли 0,5 г (6,0 ммоль) безводного пиридина и перемешивали еще 30 мин. После этого добавляли 0,5 г (1,7 ммоль) тозилата холина и реакцию продолжали при перемешивании 3 ч при 20° С в токе азота. Обработку реакционной смеси и очистку соединения (Vб) проводили как описано для фосфолипида (Va). Выход 0,26 г (60%). R_f 0,41 (Г). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃ — CD₃OD — D₂O, 1 : 1 : 0,15): 0,55 (т, J 5, 3H, —CH₂CH₃), 1,0 (уш. с, 30H, —(CH₂)₁₅—), 1,25 (квинт, J 7,5, 2H, —SCH₂CH₂—), 2,25 (т, J 7,5, 2H, —CH₂SCH₂—), 2,34 (дд, J 14, 6, 1H, —CH₂SCH₂—), 2,43 (дд, J 14, 6, 1H, —CH₂SCH₂—), 2,9 (с, 9H, —N(CH₃)₃), 3,29 (м, 2H, —OCH₂CH₂N), 3,37 (тт, J 6, 5,5, 1H, >CHO—), 3,59 (ддт, J 11, 5,5, J_{p,n} 1, 1H, —CH₂O—P), 3,69 (ддд, J 11, 5,5, J_{p,n} 1, 1H, —CH₂O—P), 3,79 (ддт, J 12, 5,5, 2, 1H, —OCH₂CH=CH₂), 3,9 (ддт, J 12, 5,5, 2, 1H, —OCH₂CH=CH₂), 3,94 (м, 2H, —OCH₂CH₂N), 4,86 (ддт, J 10, 2, 2, 1H, —CH=CH₂), 4,98 (ддт, J 18, 2, 2, 1H, —CH=CH₂), 5,61 (ддт, J 18, 10, 5,5, 1H, —CH=CH₂).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hanahan D. // Ann. Rev. Biochem. 1986. V. 55. P. 483—509.
2. Гордеев К. Ю., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 12. С. 1589—1605.
3. Tokumura A., Kamiyashu K., Takauchi K., Tsukatamo H. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. V. 145. № 1. P. 415.
4. Nakayama R., Yasuda K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1988. V. 151. № 3. P. 1256.
5. Gogfroid J. J., Braquet P. // Trends Pharmacol. Sci. 1986. V. 7. № 9. P. 368—373.
6. Snyder F., Lee T. Ch., Blank M. L. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1989. V. 568. P. 35—43.
7. Randell E., Mookerjee S., Nagpurker A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1990. V. 167. № 2. P. 444—449.
8. Lamotte-Brasseur J., Dive G., Lamouri A., Heymans F., Godfroid J. J. // Biochim. et Biophys. Acta. 1991. V. 1085. № 1. P. 91—105.
9. Nosedá A., Berens M. E., Piantadosi C., Modest E. J. // Lipids. 1987. V. 22. № 11. P. 878—883.
10. Nosedá A., Godwin P. L., Modest E. J. // Biochim. et Biophys. Acta. 1988. V. 945. № 1. P. 92—100.
11. Palameta B., Kates M. // Biochemistry. 1966. V. 5. № 2. P. 618—625.
12. Ferrell W. J., Garces A., Desmyter E. A. // Chem. and Phys. Lipids. 1976. V. 16. № 3. P. 276—284.
13. Murdri M. P., Murdri R., Partha-Sarathy S., Guy C. A., Kumar V. V., Malwicz B. // Lipids. 1990. V. 25. № 10. P. 606—612.

14. Brokerhoff H., Ayengar N. K. N.//Lipids. 1979. V. 14. № 1. P. 88—89.
15. Born G. V. R.//Nature. 1962. V. 194. № 4832. P. 927—929.

Поступила в редакцию
23.VI.1992

После доработки
13.X.1992

M. A. Sablina, I. P. Ushakova, E. V. Dementyeva, A. A. Dergousov,
G. A. Serebrennikova*

SYNTHESIS OF ANALOGUES OF THE PLATELET ACTIVATING FACTOR

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

Novel structural analogues of the platelet activating factor (PAF), *rac*-1-octadecyl-2-allylglycero-3-phosphocholine and *rac*-1-octadecyl-2-allyl-1-thioglycero-3-phosphocholine, have been synthesized. The phospholipids obtained showed neither PAF-agonistic nor PAF-antagonistic activity at the concentration of 10^{-5} to 10^{-7} M.