

УДК 546.02+546.05+547.898

С.В.Вакаров, М.В.Куперман, В.Б.Ковальская, О.А.Варзацкий

ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ КЛАТРОХЕЛАТОВ Fe(II) И ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ КАРБОКСИГРУППЫ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С АЛЬБУМИНОМ *

Функционализацией карбоксигрупп серии изомерных карбоксиарилсульфидзамещенных клатрохелатов Fe(II) синтезированы их производные, содержащие карбоксиамидные и карбоксиметильные группы, индивидуальность и строение полученных соединений подтверждены методами ТСХ, ЯМР и масс-спектрометрии. Изучено взаимодействие полученных соединений с бычьим сывороточным альбумином (БСА) методом тушения собственной флуоресценции белка. Установлено, что модификация карбоксигрупп с образованием неионизируемых сложноэфирных и амидных групп приводит к уменьшению эффективности этих соединений как тушителей на порядок и к изменению характера влияния пространственного расположения заместителей на тушение собственной люминесценции БСА.

Ключевые слова: клатрохелаты, функционализация карбоксигруппы, биологическая активность, сывороточные альбумины, тушение флуоресценции .

ВВЕДЕНИЕ. Для карбоксиарилсульфид-замещенных клатрохелатов Fe(II) (см. схему на с. 117) обнаружены различные виды биологической активности: показаны их антифибриллогенные свойства [1] и способность ингибировать транскрипцию T7 РНК-полимеразы [2], связывание с сывороточными альбуминами [3]. Предполагается, что молекулы клатрохелатов способны образовывать комплексы с глобулярными белками за счет "топологического связывания" — включения объемных молекул клатрохелата в соответствующие по геометрии гидрофобные полости белка. В таких случаях образованный комплекс может дополнительно стабилизироваться вследствие кулоновских взаимодействий или образования водородных связей между функциональными заместителями в клатрохелатах и аминокислотными остатками белка. Изучение взаимодействия макроциклических клеточных соединений, в частности, клатрохелатов с транспортными белками — сывороточными альбуминами, и влияния на него природы и пространственного расположения функциональных групп актуально в плане создания новых типов биологически активных веществ и принципов их конструирования, а также выяснения путей их транспорта и детоксикации в организме. Ранее установлено, что в присутствии карбоксиарил-

сульфид-замещенных клатрохелатов происходит тушение собственной люминесценции сывороточных альбуминов. Вероятно, клатрохелаты могут связываться с несколькими сайтами белковой молекулы, а тушение триптофанового флуорофора может проходить по двум механизмам — изменения конформации молекулы белка или переноса энергии с триптофана на клатрохелат [3]. Мы считаем, что на эффективность и селективность связывания клатрохелатов в различных сайтах белка влияют группы, способные к ионизации или образованию водородных связей, а также их пространственное расположение.

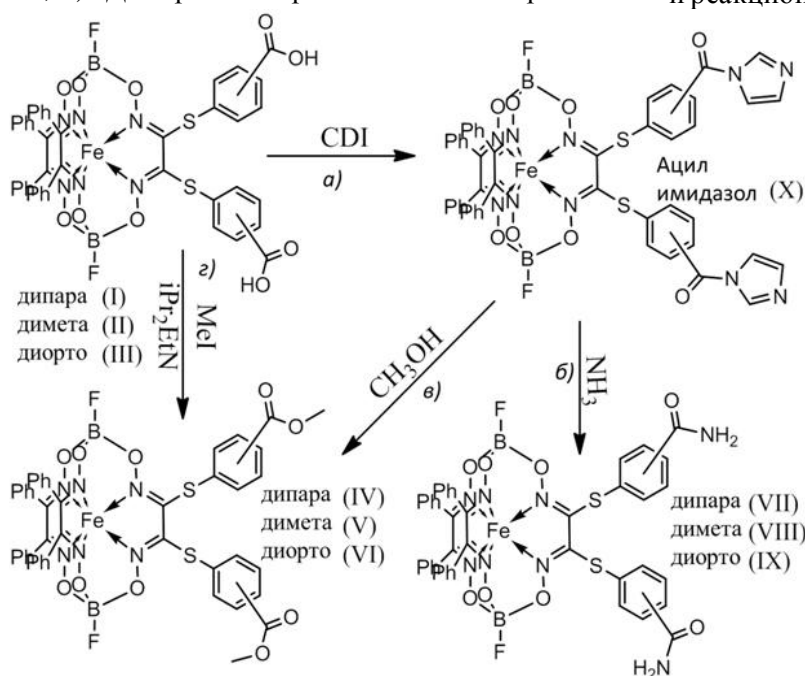
Для изучения влияния заряда молекулы клатрохелата, пространственного расположения карбонильной группы и ее способности образовывать водородные связи на взаимодействие с альбумином нами были синтезированы три серии клатрохелатов функционализированных изомерными карбоксиарилсульфидными заместителями, содержащими карбокси-, карбоксиметил- и карбоксиамидные группы. Взаимодействие полученных соединений с бычьим сывороточным альбумином (БСА) было охарактеризовано методом тушения собственной люминесценции белка. Синтез этих соединений также представляет интерес для изучения реакций функционализации клатрохелатов, определения их спектральных свойств

* Работа выполнена при финансовой поддержке УНТЦ, грант 5972.

и дальнейшего изучения их биоактивности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ. Для синтеза целевых соединений использовали карбоксиарилсульфиддизамещенные клатрохелаты (схема, I, II, III), полученные согласно методике, представленной в работе [4]. Применяли реактивы и растворители (CDI, ДМСО, метанол, соляная и уксусная кислоты) фирмы Sigma-Aldrich Co., ДМСО дополнительно осушали молекулярными ситами 4А. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре фирмы Bruker (400Mhz). Оптическое поглощение определяли на спектрофотометре Spectord M40. Флуоресцентные измерения проводили при комнатной температуре флуоресцентным спектрофотометром Cary Eclipse (Varian) в кварцевых кюветах (1x1 см).

Ниже приведена схема синтеза карбоксиамид- и карбоксиметилсульфиддизамещенных клатрохелатов Fe(II). Функционализация карбоксигруппы в амидную группу была проведена в 2 стадии (схема, а, б) с образованием промежуточного активного амида X при реакции исходных клатрохелатов I, II, III с CDI и последующим его взаимодействием с аммиаком. Карбоксиметиларилсульфиддизамещенные клатрохелаты IV, V, VI были получены алкилированием исходных клатрохелатов иодметаном в присутствии этилдиизопропиламина в качестве основания (схема, з). Дипара IV карбоксиметил клатрохелат



также был синтезирован реакцией активированного амида X с метанолом (схема, в).

Карбоксиметилсульфиддизамещенные клатрохелаты Fe(II) (IV, V, VI). В 5 мл сухого ДМФА растворяли при перемешивании 0.5 г (0.49 ммоль) клатрохелата (I, II, III) в атмосфере аргона, добавляли 400 мкл (4.17 ммоль) этилдиизопропиламина, 0.5 г молекулярных сит 4А. Через 10 мин добавляли 400 мкл метилиодида (1.24 ммоль) и реакцию смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Прохождение реакции контролировали по ТСХ-пластинке с силикагелем в элюенте — ДХМ : гексан (2:1). После окончания реакции смесь выливали в раствор 0.5 г хлорида калия в 3 %-м растворе уксусной кислоты в воде (40 мл). Образовавшуюся суспензию фильтровали, промывали водой, смесью вода—ИПС 1:1 и небольшим количеством ИПС и гексаном. Осадок высушивали на воздухе, потом в вакууме при 80 °С. Полученный мелкокристаллический коричнево-красный порошок — вещество, хорошо растворимое в метиленхлориде, этилацетате, плохо в ИПС, практически не растворяется в воде и гексане.

Карбоксиамидарилсульфиддизамещенные клатрохелаты Fe(II) (VII, VIII, IX). Навеску 1 г (1 экв, 1 ммоль) исходного клатрохелата растворяли в 5 мл ДМФА в атмосфере инертного газа. При перемешивании прибавляли 0.486 г (3 экв, 3 ммоль) CDI и реакцию смесь подогрели до 40 °С. При этой температуре смесь перемешивали до прекращения выделения газа. После охлаждения до 20 °С через реакцию смесь пропускали 0.22 л (10 экв, 10 ммоль) аммиака в течение 10 мин и оставляли при перемешивании еще на 30 мин, затем выливали в 25 мл 2 %-й соляной кислоты. Образовавшийся осадок фильтровали, переосаждали из ДМСО смесью ИПС : циклогексан (1:4). Осадок фильтровали, сушили и получали коричнево-красные кристаллы.

n-Карбоксиметилсульфиддизамещенный клатрохелат Fe(II). Навеску 1 г (1 экв, 1 ммоль) исходного клатрохелата растворяли в 5 мл ДМФА в атмосфере инертного газа. При перемешивании прибавляли 0.486 г (3 экв, 3 ммоль) CDI и реакцию смесь подогрели до 40 °С. При этой темпе-

Т а б л и ц а 1

Выходы, коэффициенты удерживания и спектральные свойства полученных соединений

Соединение	Выход, %	Rf (Гекс.:ДХМ=2:1)	Rf (ДХМ:ИПС=95:5)	¹ H ЯМР-спектр (растворитель — ДМСО-d ₆)
I	—	0	0.2	7.2–7.23 (д, 4H), 7.34 (м, 20H), 7.83–7.85 (д, 4H)
II	—	0	0.35	7.3 (м, 22H), 7.49–7.52–7.54 (т, 4H), 7.76–7.79(с, 2H)
III	—	0	0.1	6.82–6.85 (д, 2H), 7.35 (м, 22H), 7.48–7.51–7.54 (т, 2H), 7.94–7.96(д, 2H)
IV	83 ^a , 48 ^b	0.3	1	3.81 (с, 6H), 7.22–7.24 (д, 4H), 7.36 (с, 20H), 7.82–7.85 (д, 4H)
V	81	0.25	1	3.75 (с, 6H), 7.33 (м, 22H), 7.45 (с, 2H), 7.50–7.52 (д, 2H), 7.71–7.73 (д, 2H)
VI	85	0.2	1	3.80 (с, 6H), 6.85–6.90 (д, 2H), 7.38 (м, 22H), 7.49–7.51–7.54 (т, 2H), 7.88–7.91 (д, 2H)
VII	64	0	0.4	7.26–7.28 (д, 4H), 7.39 (м, 20H), 7.85–7.87 (д, 4H), 8.04 (с, 2H)
VIII	52	0	0.5	7.34 (м, 22H), 7.53 (2H), 7.64 (с, 1H), 7.78 (т, 2H), 8.04 (с, 2H)
IX	57	0	0.35	6.82–6.83 (д, 2H), 7.28–7.30–7.32 (т, 2H), 7.41 (м, 20H), 7.60 (с, 2H), 7.70–7.71 (д, 2H), 8.08 (с, 2H)

П р и м е ч а н и я. Rf — коэффициент удерживания; ^a реакция алкилирования иодметаном, ^b реакцией ацилимидазола с метанолом.

ратуре смесь перемешивали до прекращения выделения газа. После охлаждения до 20 °С 1 ч в реакционную смесь добавляли 0.4 мл метанола (10 экв, 10 ммоль) и оставляли при перемешивании еще на 30 мин, после чего выливали в 25 мл 2 %-й соляной кислоты. Полученную суспензию фильтровали, промывали водой, смесью вода–ИПС 1:1 и небольшим количеством ИПС и гексаном. Образовавшийся кристаллический осадок пересаждали из ДХМ гексаном, промывали водой и смесью вода–ИПС 1:1, затем высушивали на воздухе и в вакууме при 80 °С. Получили мелкокристаллический коричнево-красный порошок.

Спектры флуоресценции растворов БСА в буфере были получены до и после добавления растворенного в ДМСО клатрохелата. Для эксперимента использовали бычий сывороточный альбумин фирмы Sigma-Aldrich Co. в концентрации 0.2 г/л (3 мкМ), растворенный в буферном растворе Tris–HCl (C=0.05 М, pH 7.9). Стоковые растворы клатрохелатов (C=2 мМ) в ДМСО были добавлены в аликвотах 2, 5, 10, 15, 25 мкл (что соответствует 2, 5, 10, 15, 25 мкМ концентрации в рабочем растворе) к раствору белка. Длина волны возбуждения флуоресценции БСА 280 нм, сигнал регистрировался на длине волны максимума флуоресцентного пика.

Увеличение концентрации клатрохелата ве-

дет к повышению оптической плотности на длине волны возбуждения и эмиссии, что уменьшает интенсивность флуоресценции белка ввиду “эффекта внутреннего фильтра” и реабсорбции. Чтобы избежать ошибок в интерпретации спектров, данные эффекты были учтены. Интенсивности флуоресцентных спектров были откорректированы согласно следующему уравнению [5]:

$$I_{\text{cor}} = I_{\text{obs}} \cdot 10^{(D_{\text{ex}} + D_{\text{em}})/2},$$

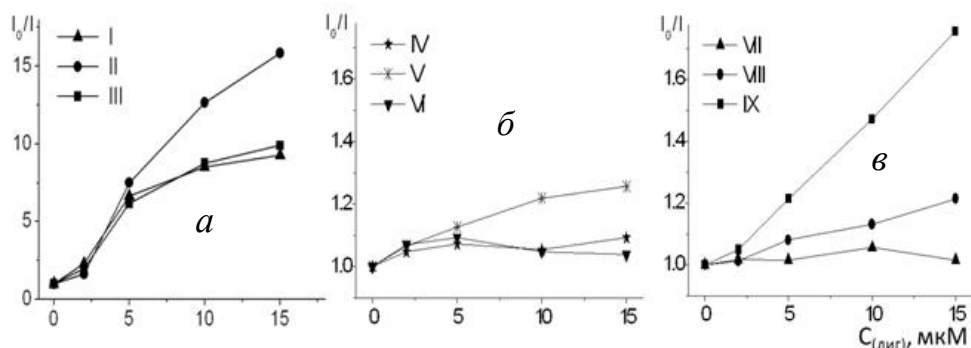
где I_{cor} и I_{obs} — соответственно откорректированные и наблюдаемые интенсивности, а D_{ex} и D_{em} — оптическая плотность исследуемых растворов на длинах волн возбуждения и эмиссии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ. N,N-карбодиимидазол может применяться для активации карбоксигруппы заместителей в клатрохелатных комплексах и превращения их в амидные или сложноэфирные группы с выходами 45–65 % (табл. 1). Взаимодействие клатрохелатного остова с CD или образующимися ацилимидазолами не наблюдается, однако в ходе реакции появляются несколько побочных продуктов (исходный дикарбоксиклатрохелат, образующийся при реакции ацилимидазола с влагой, соединения с частично модифицированными карбоксигруппами, очистка от которых представляет собой хроматографическое разделение либо пересаживание). Алкилиро-

вание карбоксигруппы заместителей иодметаном позволяет получить целевые продукты с высокими выходами практически без побочных продуктов (табл. 1).

Для определения влияния модификации карбоксигруппы на связывание с белком была изучена зависимость собственной люминесценции БСА от возрастающей концентрации карбоксиклатрохелатов и их карбметокси и амидных производных. Результаты измерений в координатах Штерна–Фольмера представлены на графиках (рисунок), относительные значения тушения люминесцентного сигнала белка (I_0/I) для всех клатрохелатов при концентрации 15 мМ (соотношении белок:клатрохелат 1:5) приведены в табл. 2. Согласно полученным результатам, наиболее интенсивными тушителями являются соединения, содержащие карбоксигруппы, насыщение тушения наблюдается при соотношении 3–5 молекул клатрохелата на молекулу белка. Для этих соединений зависимость интенсивности люминесценции от концентрации тушителя изменяется немонотонно и нелинейно, что может быть связано с различной интенсивностью тушения двух флуорофоров (триптофанов) БСА при образовании комплексов различного состава (то есть при связывании разного количества молекул клатрохелата с молекулой альбумина). Пространственное расположение карбоксильной группы влияет на связывание с белком: так, максимальное тушение люминесценции наблюдается для мета-изомера (до 16 раз). Гашение флуоресценции триптофана может происходить за счет: 1) изменения окружения флуорофора при конформационных изменениях глобулы белка, которые вызваны взаимодействием с молекулами клатрохелата (это возможно и при связывании клатрохелата на некотором расстоянии от триптофанов), и/или 2) переноса энергии с триптофана на клатрохелат (в этом случае молекулы металлокомплекса должны располагаться в непосредственной близости от триптофана) [3].

Производные с амидными или сложноэфир-



Графики тушения собственной люминесценции БСА карбокси- (а), карбоксиметил- (б) и карбоксиамид- (в) арилсульфиддизамещенными клатрохелатами Fe(II).

Т а б л и ц а 2

Значения тушения собственной люминесценции БСА клатрохелатами, содержащими карбоксигруппы (А), сложноэфирные (Б) и амидные (В) группы

Изомерия	А	I_0/I	Б	I_0/I	В	I_0/I
Дипара	I	9.26	IV	1.05	VII	1.01
Димета	II	15.8 5	V	1.25	VIII	1.21
Диорто	III	9.90	VI	1.09	IX	1.76

ными группами значительно слабее влияют на интенсивность флуоресценции БСА (рисунок, табл. 2), в этом случае интенсивность тушения не превышает 1.8 раз для карбамид- и менее чем 1.3 для карбметокси производных. Мы считаем, что разница во влиянии дикарбоксизамещенных клатрохелатов и их производных на флуоресценцию молекулы альбумина указывает на ключевую роль анионных групп (соответственно электростатического взаимодействия) для формирования стабильного комплекса белок–клатрохелат. При этом пространственное расположение анионных центров (карбоксигрупп) ответственно за более тонкие различия в структуре комплекса белок–клатрохелат, которые приводят к разнице в интенсивности тушения люминесценции белка изомерными клатрохелатами. По нашему мнению, наличие в молекуле белка нескольких разных центров (сайтов) связывания лиганда определяет возможность “выбора” лигандом предпочтительного сайта связывания в зависимости от тонких структурных эффектов, определяемых пространственным расположением карбоксигрупп. В свою очередь, предпочтительность связывания ли-

ганда в различных сайтах белка определяет разницу тушения триптофановой люминесценции в зависимости от реализованного в образовавшемся комплексе механизма тушения и расстояния между флуорофором и тушителем. Для неспособных к ионизации комплексов, содержащих карбоксиамид- и карбоксиэфирные группы, происходит значительное уменьшение тушения собственной люминесценции белка, что свидетельствует о гораздо более слабом связывании в комплексе незаряженный клатрохелат—белок. Различия в интенсивности гашения люминесценции для серии эфиров незначительно, но их поведение симбатно серии клатрохелатов с карбоксигруппами (табл. 2). Для серии амидов, которые способны к образованию направленных водородных связей (к специфическим взаимодействиям гость—хозяин), наблюдается существенная разница в интенсивности тушения люминесценции различными изомерами. Максимальная интенсивность тушения — у орто-изомера, который в приведенном интервале концентраций в 1.4—1.8 раза сильнее гасит люминесценцию белка, чем мета- и пара-изомеры.

РЕЗЮМЕ. Функціоналізацією карбоксигруп серії карбоксиарилсульфіддизаміщених клатрохелатів Fe(II) синтезовано сполуки, в яких карбоксигрупа замінена на амідну чи естерну групи. Описано методику їх отримання. Будову і чистоту одержаних сполук підтверджено методами ТШХ та ЯМР-спектроскопії. Вивчено взаємодію цих сполук з бічним сироватковим альбуміном методом тушіння власної флуоресценції

Институт общей и неорганической химии
им. В.И.Вернадского НАН Украины, Киев
Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

білка. Встановлено, що клатрохелати, в яких карбоксигрупа заміщена на естерну чи амідну групи, на порядок слабкіше впливають на флуоресцентні властивості сироваткового альбуміну.

Ключові слова: клатрохелати, функціоналізація карбоксигрупи, біологічна активність, сироваткові альбуміни, тушіння флуоресценції.

SUMMARY. By the functionalization of carboxy group of carboxyarylsulfidsubstituted clathrochelates Fe (II) their derivatives containing amide or ester groups has been obtained. The methods of synthesis are described; the identity and purity of the obtained compounds has been proved by TLC. The interaction of the obtained compounds with bovin serum albumin was studied by the fluorescent spectroscopie. It has been found that clathrochelates containing ester or amide groups instead of carboxygroups have noticeably weaker impact (up to 15 times) on the fluorescent properties of bovine serum albumin.

Keywords: clathrochelates, functionalization of carboxy-groupe, biological activity, serum albumin quenching of fluorescence.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kovalska V.B., Losytskyy M.Yu., Varzatskii O.A. // Bioorg. Med. Chem. -2014. -**22**. -P. 1883—1888.
2. Novikov V.V., Varzatskii O.A., Negrutka V.V. et al. // J. Inorg. Biochem. -2013. -**124**. -P. 42—45.
3. Losytskyy M.Yu., Kovalska V.B., Varzatskii O.A. et al. // J. Fluoresc. -2013. -**23**. -P. 889—895.
4. Belaya I.G., Zelinskii G.E., Belov A.S. et al. // Polyhedron. -2012. -**40**. -P. 32—39.
5. Sur S.S., Rabbani L.D., Libman L., Breslow E. // Biochemistry. -1979. -**18**. -P. 1026.

Поступила 21.12.2015