

А. К. Мельник, Н. В. Самусь, О. М. Хільчевський, Л. В. Бабій, В. В. Трачевський, член-кореспондент НАН України **А. І. Вовк**, академік НАН України **В. П. Кухар**

Нітроксильні бірадикали на платформі адамантану

Синтезовано біс(1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпіперидиніл-4-ові) ефіри адамантан-1,3-дикарбонової і 5,7-диметиладамантан-1,3-дикарбонової кислот (бірадикали 1 й 2 відповідно). Результати дослідження бірадикалів методом електронного парамагнітного резонансу свідчать про те, що сполука 2 на відміну від сполуки 1 ефективно зв'язується ліпосомами. Проаналізовано значення констант надтонкої взаємодії та часу кореляції обертальної дифузії стабільного бірадикала 2 у ліпосомах, утворених лецитином, в інтервалі температур від $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Припускається, що стабільний бірадикал 2 може бути застосований як спіновий зонд для дослідження біологічних мембран.

Відомо, що похідні адамантану можуть взаємодіяти з природними і модельними мембранними структурами, а ряд таких сполук, як ремантадин, адапромін, амантадин і глудантан, є перспективними лікарськими засобами для профілактики вірусних інфекцій та лікування деяких захворювань [1–3]. Встановлено, що біологічно активні адамантанові похідні здатні облаштовуватись у біологічні мембрани, взаємодіючи як з інтегрованими білками, так і з ліпідним бішаром [2].

Синтез і дослідження стабільних нітроксильних радикалів на платформі адамантану спрямовані на пошук ефективних спінових зондів [4, 5] та нових антиоксидантів [6, 7]. Визначальними для властивостей подібних сполук можуть бути ліпофільність адамантильного фрагмента і його взаємодія з природними біологічними мембранами [8], а також реакційна здатність нітроксильного замісника відносно реакційних форм кисню [9, 10]. Спектри електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) стабільних радикалів дозволяють отримати значний об'єм інформації про можливі місця інтеграції зонда, рухливість мембран, особливості фазових переходів, а також ліпід-білкові взаємодії [11, 12]. Так, 1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпіперидиніл-4-овий ефір адамантил-1-оцтової кислоти було застосовано нами раніше як парамагнітний зонд при дослідженні хлоропластів і субхлоропластних систем [4]. Стабільні нітроксильні радикали на платформі адамантану були також ефективними антиоксидантами [6], у тому числі інгібіторами окиснення лінолевого спирту в присутності ліпоксигенази [7].

Мета роботи авторів даного повідомлення — синтез бірадикальних біс(1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпіперидиніл-4-ових) ефірів адамантан-1,3-дикарбонової (**1**) і 5,7-диметиладамантан-1,3-дикарбонової (**2**) кислот та дослідження їх властивостей як потенційних спінових зондів при взаємодії з ліпосомами. Слід відзначити, що наявність двох парамагнітних фрагментів у структурі цих сполук дозволяє отримати точніші уявлення про локалізацію спін-міченої молекули, в тому числі за рахунок вірогідності “проміжних” станів, коли нітроксильні групи однієї молекули можуть знаходитись у різному оточенні. З іншого боку, у випадку достатньої віддаленості радикальних фрагментів бірадикала і відсутності обмінної взаємодії між неспареними електронами підвищується чутливість методу.

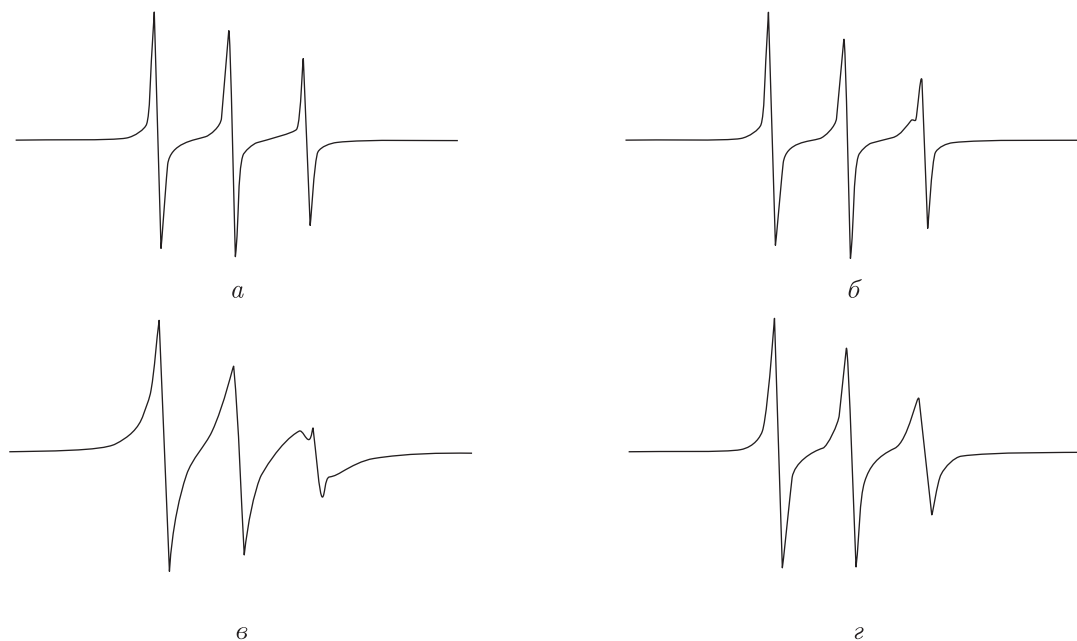
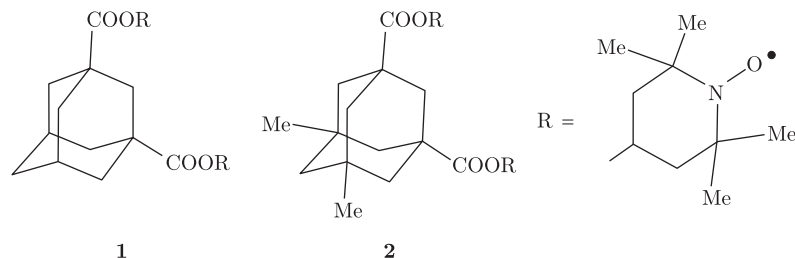


Рис. 1. Двокомпонентні спектри бірадикалів **1** (а, б) й **2** (в, г) у системі, що містила ліпосоми при 282 К (а, в) і 327 К (б, г)

Спін-мічені похідні **1** й **2** було синтезовано взаємодією 4-гідрокси-2,2,6,6-тетраметилпіперидин-1-оксиду (4-гідрокси-ТЕМРО) з хлороангідрідами відповідних кислот у бензолі в присутності триетиламіну:



Спектри ЕПР адамантильних нітросильних бірадикалів **1** й **2** у водно-спиртових розчинах із різним співвідношенням компонентів розчинника є класичними триплетами. Інтенсивність окремих ліній спектрів не змінювалась з часом, їх співвідношення залишалось постійним у межах варіювання концентрації радикалів від 0,05 ммоль/л до 1 ммоль/л.

Спектральні характеристики радикалів **1** й **2** у модельній системі, що містила ліпосоми з яєчного лецитину, є суперпозиціями двох спектрів, які характеризуються різними значеннями часу кореляції обертальної дифузії, один з яких відповідає водному, а інший — ліпідному оточенню (рис. 1). Подібний вигляд спектрів спостерігався також при зв'язуванні парамагнітних монозаміщених похідних адамантану з тилакоїдними мембранами хлоропластів [4]. Відсутність широкої компоненти в спектрах спінового зонда **2**, що була наявна у випадку самоагрегації у водному середовищі, свідчить про характер інкорпорації молекул зонда в ліпосоми, а саме про те, що їх абсолютна більшість знаходиться в ліпідній фазі, що унеможливує сильну обмінну взаємодію радикальних фрагментів.

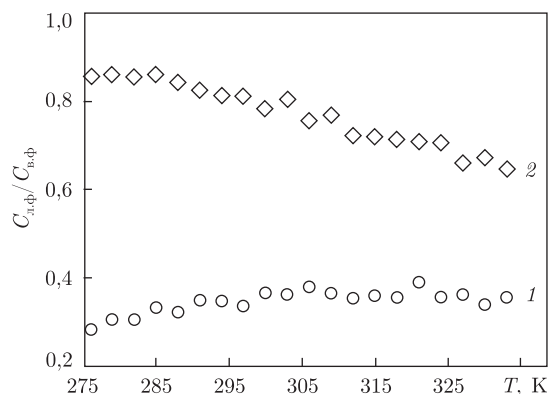


Рис. 2. Температурні залежності коефіцієнта розподілу для радикалів **1** (1) й **2** (2) між ліпідною та водною фазами в системі, що містила ліпосоми

Кількісні співвідношення вкладів індивідуальних складових двокомпонентних спектрів було візуалізовано за допомогою внесення в суспензію ліпосом, де знаходився бірадикал, фериціаніду калію (концентрація 0,5 моль/л). При цьому відбувалося зникнення сигналу ЕПР радикала у водному розчині, але залишалися сигнали зонда, що був інкорпорований в ліпосому. Вид спектрів свідчив про те, що обидва фрагменти бірадикала **2** можуть бути орієнтовані симетрично (у напрямі до поверхні мембранних структур). За допомогою цього підходу нами було проаналізовано співвідношення інтенсивностей сигналів спінових зондів у ліпідній та водній фазах. Температурні залежності коефіцієнта розподілу парамагнітних сполук між ліпідною та водною фазами $C_{л.ф.}/C_{в.ф.}$, отриманими після подвійного інтегрування різницевих спектрів радикалів **1** й **2**, демонструє рис. 2. Ці дані свідчать про значно більші значення $C_{л.ф.}/C_{в.ф.}$ при використанні радикала **2** завдяки наявності 5,7-диметил-адамантильного фрагмента в його структурі.

Залежність ізотропної константи надтонкої взаємодії від параметра гідрофільності було використано для характеристики полярності оточення спінового зонда **2**, іммобілізованого ліпосомами. Індекс гідрофільності розраховували за відомою формулою [13]:

$$H = \frac{\rho' M_{H_2O}}{\rho} \left(\frac{x N_{OH}}{M} + \frac{1-x}{M_{H_2O}} \right),$$

де ρ' — густина розчину; x — вагова фракція розчинника з молекулярною масою M ; N_{OH} — кількість гідроксильних груп у молекулі розчинника. Густина води при 25 °С та її молекулярна маса задаються відповідно як ρ й M_{H_2O} . Розчини адамантильного бірадикала **2** були підготовлені в серії сумішей етанол — вода та етанол — діоксан — вода, згідно з методикою, описаною в роботах [13, 14]. Середні значення кількох вимірювань з використанням бірадикала **2** представлені на рис. 3, а. Лінійною апроксимацією наведеної залежності є рівняння $A_0 = 15,511 + 1,689H$ з коефіцієнтом кореляції 0,997. Використовуючи це рівняння та значення анізотропних констант НТВ (A_0), ефективну молярну концентрацію води в досліджуваній системі можна визначити таким чином:

$$[H_2O] = \left(\frac{A_0 - 15,511}{1,689} \right) \cdot 55,345.$$

Температурна залежність локальної концентрації води (рис. 3, б) є наближеною до лінійної та демонструє істотне зменшення (більш ніж у 2 рази) вмісту води в області локалізації

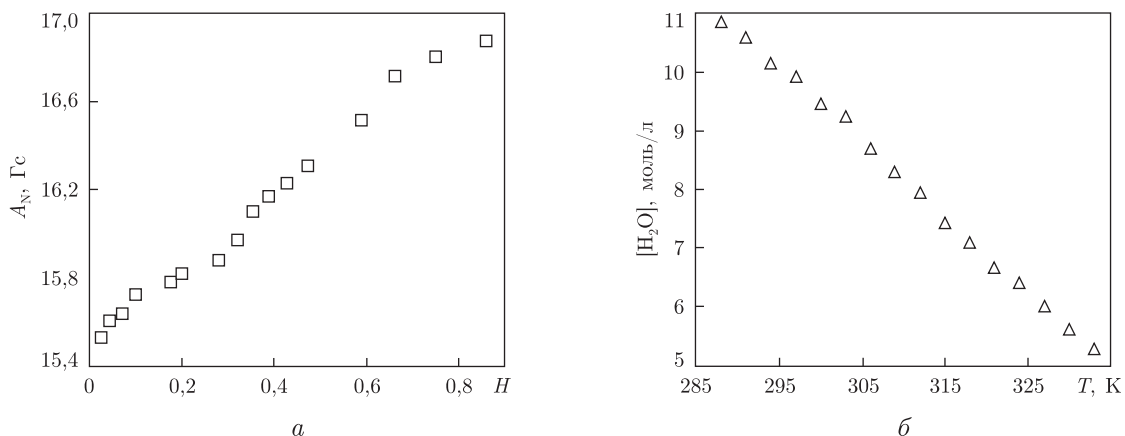


Рис. 3. Залежність константи надтонкої взаємодії радикала **2** від параметра гідрофільності для серій розчинів етанол — вода й етанол — діоксан (а) та залежність ефективної концентрації води в ліпідному оточенні імобілізованого ліпосомами бірадикала **2** від температури (б)

зонда при підвищенні температури від 288 К до 333 К. Цей ефект може бути пов'язаним з розташуванням спінового зонда в приповерхневій області ліпосом. Очевидно, ліпофільний фрагмент зонда фіксується в області вуглеводневих залишків мембранної структури, тоді як тетраметилпіперидин-N-оксильні фрагменти бірадикала розташовані в полярному регіоні, наближеному до гідратованих фосфоліпідних кінцевих груп. При підвищенні температури частина молекул зонда просувається глибше, і концентрація води навколо них зменшується. З іншого боку, як свідчать попередні результати (див. рис. 2), відбувається зворотний процес переходу частини нітроксильних бірадикалів, розташованих у безпосередній близькості від межі розподілу (де кількість оточуючих молекул води найбільша), у водне середовище (де вони не рееструються в присутності фериціаніду).

Рухливість бірадикала **2** у модельному мембранному оточенні можна схарактеризувати за допомогою часу кореляції оберտальної дифузії ($\tau_{\text{еф}}$). Значення $\tau_{\text{еф}}$ для інтегрованого в ліпосому бірадикала **2** розраховували за формулою [15]:

$$\tau_{\text{еф}} = 6,5 \cdot 10^{-10} \Delta I_0 \left(\left(\frac{I_0}{I_{-1}} \right)^{1/2} + \left(\frac{I_0}{I_1} \right)^{1/2} - 2 \right),$$

де I_0 , I_{-1} , I_1 — інтенсивність відповідно центральної, високопольної та низькопольної ліній; ΔI_0 — ширина центральної лінії. Ця формула дає достатньо добру апроксимацію для ізотропного обертання радикала в широкому діапазоні часу, що відповідає частково уповільненому обертанням. Дослідження рухливості молекул спінового зонда **2** проводили в діапазоні температур від 264 К до 321 К. Значення $\tau_{\text{еф}}$ для радикала **2** у ліпідному оточенні після підвищення температури зменшується з $1,8 \cdot 10^{-9}$ с до $0,2 \cdot 10^{-9}$ с. Температурні залежності часу кореляції обертальної дифузії побудовано в координатах Ареніуса (рис. 4), згідно з рівнянням:

$$\nu = \frac{1}{\tau_{\text{еф}}} = \frac{kT}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^\#}{R}\right) \exp\left(\frac{-\Delta H^\#}{RT}\right).$$

Виходячи з цих даних, було розраховано енергетичні характеристики обертання зонда — ентальпію активації та ентропію активації [12] для двох температурних діапазонів —

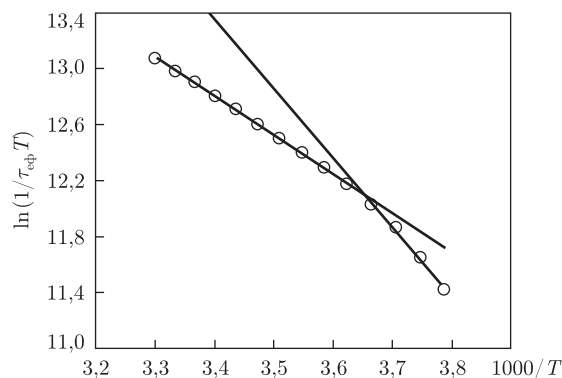


Рис. 4. Лінеаризація температурних залежностей часу кореляції обертальної дифузії сполуки **2**, інкорпорованої у ліпосоми, в координатах Ареніуса

вище і нижче $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Їх уявні значення становлять відповідно 23,25 й 41,38 кДж/моль ($\Delta H^{\#}$) та 12,00 й 54,25 Дж/(моль \cdot К) ($\Delta S^{\#}$). Очевидно, термодинамічні характеристики нітросильного радикала в ліпосомах відбивають його властивості в мембранному оточенні у приповерхневій області поблизу “голів” ліпідних молекул, які містять певну частину молекул води і змінюють свій стан залежно від температури. Значення $\Delta H^{\#}$ й $\Delta S^{\#}$ (у позитивному діапазоні температур) узгоджуються зі значеннями активаційних параметрів спінових міток у деяких білкових системах і можуть порівнюватись з властивостями нітросильних радикалів у жорстких полімерних системах [12]. При цьому також важливим може бути вплив бірадикала **2** на функції інтегрованих у мембрану білків, який спостерігається при закріпленні відомих біологічно активних похідних адамантану в процесі реалізації їх біологічної дії [2].

Таким чином, нами синтезовано і досліджено *bis*(1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпіперидиніл-4-овий) ефір 5,7-диметиладамантан-1,3-дикарбонової кислоти, що ефективно зв’язується ліпосомами. Нітросильний бірадикал з ліпофільним адамантильним фрагментом здатний легко закріплюватись в ліпідному бішарі модельної мембрани з локалізацією нітросильного фрагмента на межі розподілу між ліпідною і водною фазами. Запропонована сполука може бути використана як спіновий зонд для характеристики оточення на зовнішньому боці мембранної структури.

Експериментальна частина. В процесі роботи використовували 4-гідрокси-ТЕМРО (Sigma). Хлороангідриди адамантан-1,3-дикарбонової та 5,7-диметиладамантан-1,3-дикарбонової кислот були синтезовані взаємодією відповідних кислот з хлористим тіонілом.

***Bis*(1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпіперидиніл-4-овий) ефір адамантан-1,3-дикарбонової кислоти.** До розчину 0,104 г (0,398 ммоль) хлороангідриду адамантан-1,3-дикарбонової кислоти в 4 мл сухого бензолу додавали 0,2 мл триетиламіну (1,441 ммоль), 0,15 г (0,871 ммоль) 4-гідрокси-2,2,6,6-тетраметилпіперидиніл-1-оксилу та кип’ятили впродовж 5 год. Реакційну суміш промивали водою, розчином соди та сушили над сульфатом натрію. Після цього розчинник випарювали, а продукт розчиняли в гексані та пропускали через колонку з силікагелем.

Вихід 0,16 г (77%). ІЧ-спектр (ν , cm^{-1}) 1732 (C=O). Знайдено, %: С 67,87; Н 9,11; N 5,01. $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_6\text{N}_2$. Обраховано, %: С 67,64; Н 9,08; N 5,26.

***Bis*(1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпіперидиніл-4-овий) ефір 5,7-диметиладамантан-1,3-дикарбонової кислоти.** До розчину 0,115 г (0,398 ммоль) хлороангідри-

ду 5,7-диметиладамантан-1,3-дикарбонової кислоти в 4 мл сухого бензолу додавали 0,2 мл триетиламіну (1,441 ммоль), 0,15 г (0,871 ммоль) 4-гідрокси-2,2,6,6-тетраметилпіперидиніл-1-оксиду та кип'ятили впродовж 5 год. Суміш промивали водою, розчином соди та сушили над сульфатом натрію. Після цього розчинник випарювали, а продукт очищали на колонці з силікагелем.

Вихід 0,158 г (71%). ІЧ-спектр (ν , cm^{-1}) 1728 (C=O). Знайдено, %: С 68,53; Н 9,68; N 4,79. $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_6\text{N}_2$. Обраховано, %: С 68,54; Н 9,35; N 5,00.

Приготування водних суспензій ліпосом здійснювали за такою методикою. До наважки яєчного лецитину (0,050 г) додавали 1 мл 0,1 моль/л *трис*-НСІ буфера (рН 7,8). Гетерогенну систему витримували під впливом ультразвукового дезінтегратора Techpan UD-11 впродовж 2 хв з частотою ($22 \pm 0,165$) кГц у кавітаційному режимі. Для попередження перегрівання кварцову комірку з суспензією ліпосом поміщали в льодову баню. Розчини нітроксильних бірадикалів **1** й **2** додавали безпосередньо перед проведенням спектральних досліджень.

ЕПР дослідження проводили на ЕПР спектрометрі Bruker Elexsys E 580 X-діапазону (9 ГГц). При цьому підготовлені зразки поміщали в капіляри з внутрішнім діаметром 0,8 мм, які розташовували в стандартних кварцових ампулах Norrell S EPR 250S. Для калібрування приладу записували спектри стандартних зразків з відомими значеннями g-фактора $\text{Mn}^{2+}/\text{MgO}$ (3 й 4 лінії) та ДФПГ.

Параметри експерименту становили: частота і потужність мікрохвильового випромінювання — 9,847 ГГц і 2 мВ відповідно; частота модуляції — 100 кГц; інтенсивність модуляції — від 1 Гс до 2 Гс залежно від температури; діапазон сканування — 100 Гс з напруженістю магнітного поля в центрі 3518 Гс; постійна часу — 40 мс; час розгортки — 60 с; число сканувань — 4. Для температурних досліджень використовували температурну приставку BVT3000, що входить до комплексу приладу, кожне наступне значення температури встановлювали впродовж не менше 3 хв.

1. Cady S. D., Wang J., Wu Y. et al. Specific binding of adamantane drugs and direction of their polar amines in the pore of the influenza M2 transmembrane domain in lipid bilayers and dodecylphosphocholine micelles determined by NMR spectroscopy // J. Am. Chem. Soc. – 2011. – **133**. – P. 4274–4284.
2. Rosenberg M. R., Casarotto M. G. Coexistence of two adamantane binding sites in the influenza A M2 ion channel // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2010. – **107**. – P. 13866–13871.
3. Lamoureux G., Artavia G. Use of the adamantane structure in medicinal chemistry // Curr. Med. Chem. – 2010. – **17**. – P. 2967–2978.
4. Kochubey S. M., Vovk A. I., Bondarenko O. Yu. et al. Heterogeneity of thylakoid membranes studied by EPR spin probe // Biochemistry (Moscow). – 2007. – **72**. – P. 558–564.
5. Gamliel A., Afri M., Frimer A. A. Determining radical penetration of lipid bilayers with new lipophilic spin traps // Free Radical Biol. Med. – 2008. – **44**. – P. 1394–1405.
6. Skolimowski J., Kochman A., Gebicka L. et al. Synthesis and antioxidant activity evaluation of novel antiparkinsonian agents, aminoadamantane derivatives of nitroxyl free radical // Bioorg. Med. Chem. – 2003. – **11**. – P. 3529–3539.
7. Вовк А. И., Харченко О. В., Харитоненко А. И. и др. Гидрофобные нитроксильные радикалы – ингибиторы окисления линолевого спирта 5-липоксигеназой // Биоорг. химия. – 2004. – **30**. – С. 436–441.
8. Morse P. D., Luszczakoski-Nesbitt D. M., Clarkson R. B. Adamantyl nitroxide: a spin label for probing membrane surfaces // Chem. Phys. Lipids. – 1982. – **31**. – P. 257–273.
9. Soule B. P., Hyodo F., Matsumoto K. et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds // Free Radical Biol. Med. – 2007. – **42**. – P. 1632–1650.
10. Cimato A. N., Piehl L. L., Facorro G. B. et al. Antioxidant effects of water- and lipid-soluble nitroxide radicals in liposomes // Ibid. – 2004. – **37**. – P. 2042. – 2051.

11. *Frkanec R., Noethig-Laslo V., Vranesic B. et al.* A spin labelling study of immunomodulating peptidoglycan monomer and adamantyltripeptides entrapped into liposomes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – **1611.** – P. 187–196.
12. *Lozinsky E., Febbraio F., Shames A.I. et al.* Heterogeneity in the structural dynamics of *Sulfolobus solfataricus* Я-glycosidase revealed by electron paramagnetic resonance and frequency domain fluorometry // *Protein Sci.* – 2002. – **11.** – P. 2535–2544.
13. *Peric M., Alves M., Bales B.* Precision parameters from spin-probe studies of membranes using a partitioning technique. Application to two model membrane vesicles // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – **1669.** – P. 116–124.
14. *Alves M., Peric M.* An EPR study of the interfacial properties of phosphatidylcholine vesicles with different lipid chain lengths // *Biophys. Chem.* – 2006. – **122.** – P. 66–73.
15. *Kivelson D.* Theory of ESR linewidths of free radicals // *J. Chem. Phys.* – 1960. – **33.** – P. 1094–1106.

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії

НАН України, Київ

Інститут сорбції та проблем ендоекології

НАН України, Київ

Технічний центр НАН України, Київ

Надійшло до редакції 01.11.2011

А. К. Мельник, Н. В. Самусь, А. М. Хильчевский, Л. В. Бабий, В. В. Трачевский, член-корреспондент НАН України **А. И. Вовк,** академик НАН України **В. П. Кухарь**

Нитроксильные бирадикалы на платформе адамантана

Синтезированы бис(1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-4-овые) эфиры адамантан-1,3-дикарбоновой и 5,7-диметиладамантан-1,3-дикарбоновой кислот (бирадикалы 1 и 2 соответственно). Результаты исследования бирадикалов методом электронного парамагнитного резонанса свидетельствуют о том, что соединение 2 в отличие от соединения 1 эффективно связывается липосомами. Проанализированы значения констант сверхтонкого взаимодействия и времени корреляции вращательной диффузии стабильного бирадикала 2 в липосомах, образованных лецитином, в интервале температур от $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Предполагается, что стабильный бирадикал 2 может быть использован в качестве спинового зонда для исследования биологических мембран.

A. K. Melnyk, N. V. Samus, O. M. Khilchevsky, L. V. Babii, V. V. Trachevskii, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **A. I. Vovk,** Academician of the NAS of Ukraine **V. P. Kukhar**

Nitroxyl biradicals on adamantane platform

Bis(1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl) esters of adamantane-1,3-dicarboxylic and 5,7-dimethyladamantane-1,3-dicarboxylic acids (biradicals 1 and 2, respectively) are synthesized. The results of electron paramagnetic resonance studies of the biradicals suggest that compound 2 unlike compound 1 effectively binds to liposomes. The values of hyperfine coupling constants and rotational correlation time of stable biradical 2 in lecithin liposomes in the temperature range from $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ are analyzed. Stable biradical 2 is assumed to be applicable as a spin probe for studies of biological membranes.