

Структура комплексов фосфатидилхолин— пиридин и фосфатидилхолин—пиразол: результаты конформационного анализа

Р. С. Насибуллин, Д. И. Косарева, М. А. Серебренник, Л. В. Спирихин

Башкирский государственный медицинский институт
Ул. Ленина, 3, Уфа, 450000, Башкортостан, Республика

Методами квантовой химии и спектроскопии ЯМР-¹³C исследованы структуры комплексов фосфатидилхолин—пиридин и фосфатидилхолин—пиразол в CDCl₃. Обнаружены четыре места локализации молекулы гетероцикла на холиновой группе фосфатидилхолина (ФХ). Показано, что наиболее устойчивым является комплекс, в котором молекула пиридина или пиразола располагается вблизи фрагмента NCH₂ полярной группы ФХ.

Введение. Азотосодержащие биологически активные препараты являются объектом многолетних исследований [1—3]. В предыдущих работах [4—8], проведенных методами квантовой химии и ЯМР-спектроскопии, изучено влияние пиразола и пиридина, входящих в состав многих лекарственных препаратов, на фосфолипиды клеточных мембран. Показано образование трех типов комплексов каждого из указанных гетероциклических соединений с молекулой фосфатидилхолина (ФХ) (рис. 1, а), в том числе образование комплекса посредством π -системы молекул пиразола и пиридина с холиновой группой ФХ (комплекс II типа). В настоящей работе, предпринятой в рамках исследования молекулярного механизма взаимодействия биологически активных молекул с фосфолипидами, приведены результаты анализа структуры комплексов молекулы ФХ с участием π -систем молекул пиразола и пиридина.

Материалы и методы. При проведении эксперимента в работе применяли ФХ, выделенный из куриных яиц, по методу, описанному в работе [9]. Чистоту ФХ проверяли методом тонкослойной хроматографии. Растворители использовали с индексом ЧДА.

В опытах величину pH раствора поддерживали постоянной и равной 7,1, контролируя ее с по-

мощью прибора OP-165\3 («МOM», Венгрия), обеспечивающего точность измерений 0,01. Как показано в работе [10], при таком значении pH зависимость химического сдвига (ХС) от влияния среды является наиболее слабо выраженной. Спектры ЯМР ФХ и комплекса ФХ—пиридин в CDCl₃ при температуре 30 °С снимали на спектрометре AM-300 («Bruker», ФРГ) с рабочей частотой ¹³C 75 МГц на 64 К точек для максимального разрешения. Концентрации ФХ брали равными 0,005 М, что заведомо ниже концентрации мицеллообразования. Комплекс изолированной молекулы ФХ существует при 0,005 М и ниже. В областях с большей концентрацией ФХ сигналы в спектре вследствие мицеллообразования уширяются, и точность измерения ХС уменьшается. С точностью 0,2 °С поддерживали температуру в датчике. Цифровой метод измерения сдвигов дает возможность определить значения ХС с относительной точностью до 0,001 м. д. Полученные статистические данные по нескольким экспериментам позволяют сделать вывод о том, что точность измерений ХС не менее 0,005 м. д. Заранее снятый спектр раствора DS-Na служил точкой отсчета ХС на ¹³C, где нуль устанавливается по сигналу DS-Na. Все эксперименты проведены под аргоновой защитой.

Необходимая малая концентрация ФХ с учетом естественного регулирования изотопов ¹³C делает эксперименты ЯМР на этих ядрах очень

© Р. С. НАСИБУЛЛИН, Д. И. КОСАРЕВА, М. А. СЕРЕБРЕННИК,
Л. В. СПИРИХИН, 2002

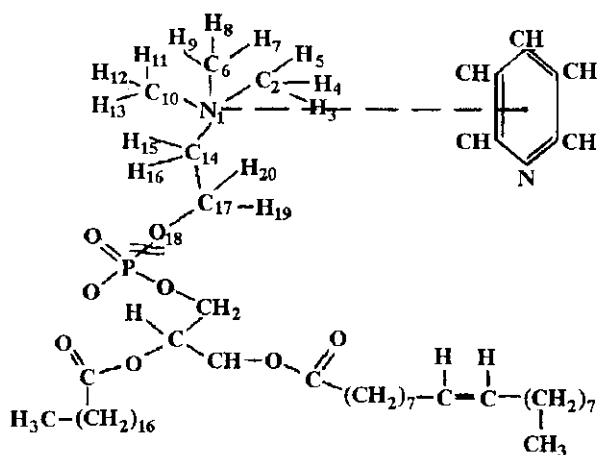


Рис. 1. Структура комплекса II типа фосфатидилхолин—пиридин (комплекс фосфатидилхолин—пиразол — аналогично): а — молекула фосфатидилхолина; б — молекула пиридина

трудоемкими. Поэтому экспериментальным работам предшествовали квантово-химические расчеты, выполненные полумпирическими методами CNDO и MNDO [11]. Предварительные расчеты проводили с помощью метода молекулярной механики. Все расчеты выполнены в вакуумном приближении.

Результаты и обсуждение. Структура комплекса II типа представлена на рис. 1. Исходное расстояние между плоскостью кольца гетероцикла и атомом N полярной группы составляло 3 Å. При многократных расчетах это значение не превышало 6 Å, что подтверждает существование указанного комплекса. Методы CNDO и MNDO систематически завышают это расстояние и оно может быть скорректировано по методу, предложенному в работе [3].

Проведенные квантово-химические исследования показали, что положение молекул гетероцикла сбоку от полярной группы ФХ является наиболее вероятным. Об этом свидетельствует сравнительный анализ энергий комплексообразования при различных положениях гетероцикла относительно холиновой группы молекулы ФХ. В связи с этим мы провели исследование возможной структуры этих комплексов для определения точек локализации молекул пиразола и пиридина на холиновой группе ФХ. Для этого применили процедуру пошагового вращения (величина шага 2^0) гетероцикли-

ческих молекул вокруг связи N-C молекулы ФХ. По результатам расчетов, проведенных методами MNDO и CNDO, в каждом случае представлены графики изменения электронной энергии в зависимости от угла поворота гетероцикла вокруг холиновой группы ФХ. Поскольку графики, полученные методами MNDO и CNDO, идентичны, в данном сообщении мы приводим только результаты расчетов методом MNDO. Рис. 2 иллюстрирует изменение электронной энергии комплекса ФХ—пиридин. Аналогичный график получен для комплекса с пиразолом. Необходимо учесть, что на форму потенциального барьера некоторое влияние оказывает величина градиента. Окончательные данные получены нами при значении градиента, не превышающем $0,01^0$, как в работе [12].

Расчеты показали существование четырех наиболее устойчивых структур комплексов ФХ—пиразол и ФХ—пиридин во всем диапазоне вращения молекул гетероцикла вокруг полярной группы, соответствующих следующим углам поворота пиридинового (пиразольного) кольца:

- 1) $\alpha = 54^0$ ($\alpha = 56^0$) — минимум 1;
- 2) $\alpha = 162^0$ ($\alpha = 159^0$) — минимум 2;
- 3) $\alpha = 265^0$ ($\alpha = 254^0$) — минимум 3;
- 4) $\alpha = 331^0$ ($\alpha = 292^0$) — минимум 4.

Анализ межатомных расстояний от атомов гетероцикла до тяжелых атомов ФХ показал, что каждому минимуму соответствует положение молекулы пиридина (пиразола) вблизи одного из углеродных атомов полярной группы C_2 , C_6 , C_{10} или C_{14} , причем возле каждого C-атома гетероцикл локализуется только в одном минимуме. Вследст-

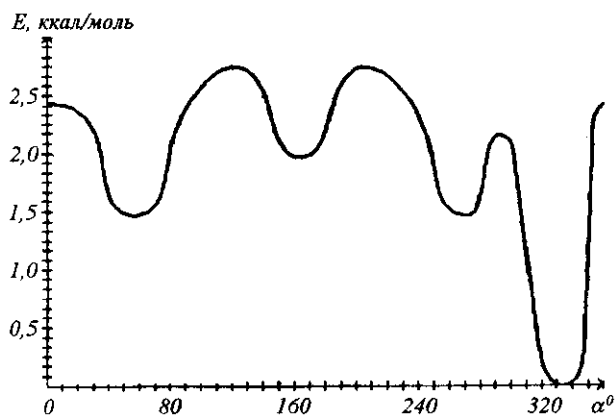


Рис. 2. Зависимость электронной энергии комплекса фосфатидилхолин — пиридин, E, от угла поворота молекулы пиридина вокруг полярной группы молекулы фосфатидилхолина α^0

Структурные параметры комплексов фосфатидилхолина с пиридином и пиразолом в минимумах 1 и 4 (длины связей даны в Å, углов — в градусах), рассчитанные методом MNDO в вакуумном приближении

Параметр	Комплекс фосфатидилхолин—пиридин		Комплекс фосфатидилхолин—пиразол	
	Минимум 1: $\alpha = 54^\circ$	Минимум 4: $\alpha = 331^\circ$	Минимум 1: $\alpha = 56^\circ$	Минимум 4: $\alpha = 292^\circ$
C ₂ -N ₁	1,554	1,554	1,559	1,559
C ₆ -N ₁	1,549	1,549	1,548	1,548
C ₁₀ -N ₁	1,550	1,550	1,550	1,550
C ₁₄ -N ₁	1,625	1,625	1,623	1,622
C ₁₇ -C ₁₄	1,543	1,543	1,543	1,543
O ₁₈ -C ₁₇	1,394	1,394	1,394	1,392
P ₂₁ -O ₁₈	1,593	1,588	1,590	1,590
O ₂₂ -P ₂₁	1,637	1,636	1,635	1,637
O ₂₃ -P ₂₁	1,588	1,588	1,586	1,586
O ₂₅ -P ₂₁	2,537	2,537	2,548	2,547
C ₆ -N ₁ -H ₂	107,8	107,7	107,8	107,8
C ₁₀ -N ₁ -H ₂	107,6	107,9	108,0	107,8
C ₁₄ -N ₁ -H ₂	108,2	108,0	107,6	108,1
C ₁₇ -C ₁₄ -N ₁	116,8	116,7	117,6	117,5
O ₁₈ -C ₁₇ -C ₁₄	108,5	111,4	109,4	110,0
P ₂₁ -O ₁₈ -C ₁₇	136,1	139,7	136,3	138,4
O ₂₂ -P ₂₁ -O ₁₈	106,6	107,1	106,3	106,4
O ₂₃ -P ₂₁ -O ₁₈	101,0	100,9	101,0	101,0
O ₂₅ -P ₂₁ -O ₁₈	95,6	96,4	97,0	97,5
C ₆ -N ₁ -H ₂ -H ₃	58,8	58,4	65,4	59,8
C ₁₀ -N ₁ -H ₂ -H ₃	301,6	301,1	308,0	302,7
C ₁₄ -N ₁ -H ₂ -H ₃	180,1	179,7	186,8	181,4
C ₁₇ -C ₁₄ -N ₁ -H ₂	180,0	179,7	183,3	181,9
O ₁₈ -C ₁₇ -C ₁₄ -O ₁₅	300,8	300,2	296,6	282,3
P ₂₁ -O ₁₈ -C ₁₇ -C ₁₄	194,8	275,4	185,8	153,9
O ₂₂ -P ₂₁ -O ₁₈ -C ₁₇	348,3	348,9	350,6	350,8
O ₂₃ -P ₂₁ -O ₁₈ -C ₁₇	239,5	240,0	241,0	241,6
O ₂₅ -P ₂₁ -O ₁₈ -C ₁₇	324,2	324,6	326,0	326,0

вие обнаруженной симметричности комплексов (незначительная асимметрия графика вызвана влиянием PO₄-группы) на атомах углерода метильных групп (C₂, C₆, C₁₀) для трех минимумов, которым соответствуют положения колец вблизи этих атомов, ниже приведены подробные данные только по одному из них, а именно — по минимуму 1. В этом случае расстояние от центра кольца до атома C₂ холиновой группы составляет 5,2 Å. В комплексе с пиразолом следующим ближайшим к центру кольца является атом C₁₀ полярной группы. То есть,

если посмотреть на полярную группу сверху, то молекула пиридина в этом случае располагается между атомами C₂ и C₆ (рис. 3, кольцо 1). В таблице (столбцы « $\alpha = 54^\circ$ » и « $\alpha = 56^\circ$ ») приведены структурные параметры комплексов ФХ—пиридин и ФХ—пиразол для случая локализации кольца на атоме C₂ полярной группы.

При анализе межатомных расстояний получены интересные результаты, показывающие, что в точке $\alpha = 331$ (292) центр молекулы гетероцикла располагается ближе к связи N₁C₁₄, чем к C-ато-

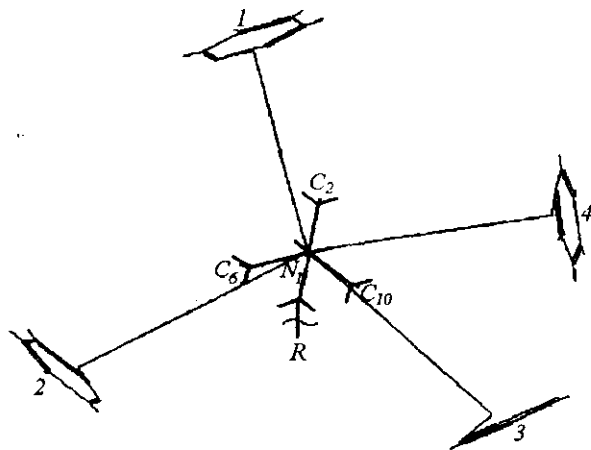


Рис. 3. Расположение молекулы пиридина в четырех минимумах (вид сверху на полярную группу молекулы фосфатидилхолина)

мам метильных групп. С другой стороны, в этой точке все атомы гетероцикла находятся существенно ближе к атомам N_1 и C_{14} , чем в других минимумах. Структурные параметры комплексов в этой точке также приведены в таблице (столбцы « $\alpha = 331$ » и « $\alpha = 292$ »).

При сравнении значений структурных параметров у тяжелых атомов ФХ во всех четырех минимумах в комплексе с пиридином оказалось, что в минимуме 4 меняются значения торсионных углов у атома P_{21} в среднем на 81° по сравнению с другими минимумами. Это приводит к тому, что участок молекулы ФХ, содержащий PO_4 -группу, несколько скручивается в направлении местоположения молекулы пиридина. Об этом свидетельствует и анализ межатомных расстояний между каждым из атомов пиразольного кольца и тяжелыми атомами углеводородной цепочки (O_{18} , P_{21} , O_{25} , C_{26}), согласно которому в точке минимума 4 эти расстояния минимальны. Аналогичные результаты показал структурный анализ комплекса ФХ—пирозол, где PO_4 -группа также приближается к полярной группе ФХ за счет изменения торсионных углов у атомов O_{18} (в среднем на 14°), P_{21} (в среднем на 30°) и C_{26} (в среднем на 14°) по сравнению со структурой комплекса в минимуме 1. В точке минимума 4 происходит перенос определенной доли заряда электрона, по-видимому, на атомы гетероцикла, так как атомы PO_4 -группы в этом случае теряют определенную долю заряда (в комплексе с пиридином она составляет $0,012 e$, с пиразолом — $0,015 e$). На основании этого можно сделать предположение, что в точке минимума 4 в

формировании комплекса PO_4 -группа принимает более активное участие.

Согласно картине распределения электронной энергии, минимум 4 — самый глубокий, поэтому ему должно соответствовать самое устойчивое состояние исследуемых комплексов. Таким образом, конформационное состояние комплексов, которым соответствует точка локализации исследуемых молекул вблизи N_1C_{14} -связи, является самым устойчивым и, как показал конформационный анализ, активное участие в этом принимает PO_4 -группа молекулы ФХ.

Осуществлена экспериментальная проверка расчетных результатов. При введении в раствор ФХ $0,005 M$ пиридина в спектре ЯМР- ^{13}C обнаружены заметные изменения химических сдвигов только для метильных групп, связанных с атомом азота, и одной метиленовой группы, также связанной с атомом азота, остальные изменения незначительны [13, 14]. Спектральная линия (рис. 4), соответствующая $N(CH_3)_3$ -группе, смещается в сторону слабого поля на $0,016$ м. д. Смещение линии, соответствующей NCH_2 , также в сторону слабого поля составляет $0,021$ м. д. Эти результаты

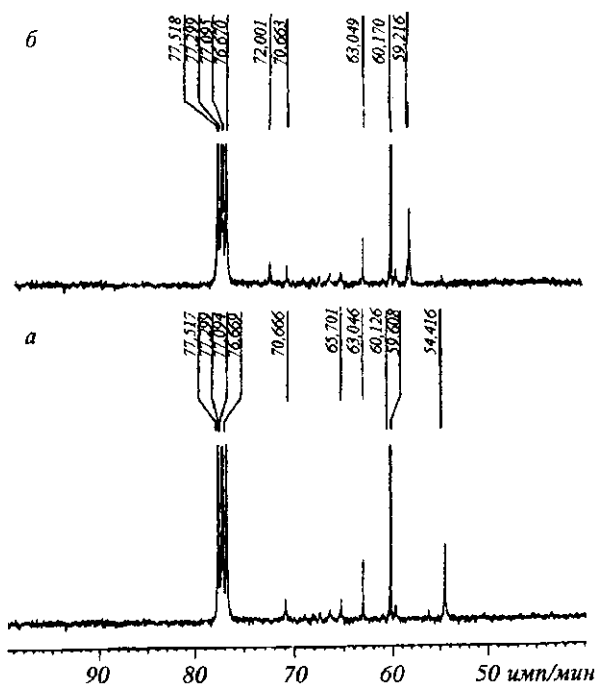


Рис. 4. Спектры ЯМР- ^{13}C комплексов фосфатидилхолин—пиридин в $CDCl_3$: а — $0,005 M$ фосфатидилхолина; б — $0,005 M$ фосфатидилхолина и $0,01 M$ пиридина

согласуются с расчетными данными об изменении концентрации заряда на С-атомах. Близкие результаты получаются в подобном эксперименте и для пиразола.

Выводы. Конформационные исследования структуры комплексов II типа ФХ—пиразол и ФХ—пиридин, проведенные методами квантовой химии и спектроскопии ЯМР-¹³С, обнаружили наличие четырех мест локализации молекул гетероцикла на холиновой группе молекулы ФХ, три из которых располагаются на ее метильных группах, а четвертая точка — вблизи NCH₂-связи. Структура комплекса, соответствующая четвертому положению, является самой устойчивой.

R. S. Nasibullin, D. I. Kosareva, M. A. Serebrinik, L. V. Spirikhin
Study on the structure of phosphatidylcholine-pyrazole and phosphatidylcholine-pyridine complexes

Summary

The structure of phosphatidylcholine-pyrazole and phosphatidylcholine-pyridine complexes were studied using the quantum chemistry and ¹³C-NMR spectroscopy methods. Four sites of the heterocyclic molecule localization in the choline group of phosphatidylcholine (PC) were detected. The complex containing the biologically active molecule located near the NCH₂ fragment of PC polar group was shown to be the most stable.

Р. С. Насибуллин, Д. И. Косарева, М. А. Серебреник,
Л. В. Спирихин

Структура комплексів фосфатидилхолін—пиридин і
фосфатидилхолін—пиразол: результати
конформаційного аналізу

Резюме

Методами квантової хімії і спектроскопії ЯМР на ядрах ¹³С досліджено структури комплексів фосфатидилхоліну з пиридином і пиразолом. Виявлено чотири місця локалізації молекули пиридину на холиновій групі молекули фосфатидилхоліну. Показано, що найбільшу стійкість має комплекс, у якому молекула пиридину чи пиразолу розміщується поблизу фрагмента NCH₂ полярної групи молекули фосфатидилхоліну.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Желтовский Н. В., Самойленко С. А., Коломиец И. Н., Кондратюк И. В., Степанюгин А. В. Исследование взаимодействия гипоксантина, ксантина и их метил- и глико-

зил-производных с карбоксильной группой аминокислот спектроскопическими методами // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 3.—С. 17—22.

2. Говорун Д. М., Кондратюк И. И., Желтовский М. В. Кислотно-лужні властивості молекулярного ксантину та його комплексотвірної здатності // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 6.—С. 61—64.
3. Насибуллин Р. С., Спирихин Л. В., Пономарева В. А. Образование комплексов молекулы пиразола с фосфолипидами // Биофизика.—1991.—36, № 4.—С. 594—598.
4. Ремизов А. Б., Алпарова М. В., Насибуллин Р. С. Взаимодействие фосфолипидов и пиразола // Биомембраны.—1991.—8, № 4.—С. 419—422.
5. Насибуллин Р. С., Ремизов А. Б., Алпарова М. В., Насыров Х. М. Образование водородной связи между молекулами пиразола и его производных и фосфолипидами клеточных мембран в растворах // Хим.-фарм. журн.—1991.—№ 12.—С. 15—16.
6. Насибуллин Р. С., Латыпова Р. Г., Троцкая В. С., Винокуров В. Г., Поздеев Н. М. Структура, дипольный момент и константы квадрупольной связи пиразола // Журн. структур. химии.—1974.—15, № 1.—С. 47—50.
7. Насибуллин Р. С., Серебреник М. А. Изменение конформационных свойств клеточных фосфолипидов под действием молекулы пиразола // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 2.—С. 108—112.
8. Насибуллин Р. С., Косарева Д. И. Влияние пиридина на конформационные свойства фосфолипидов клеточных мембран // Материалы конф. «Структура и динамика молекуляр. систем». —Йошкар-Ола, 1997.—Т. 3.—С. 45—48.
9. Dawson R. M. C. On the mechanism of action of phospholipase A // Biochem. J.—1963.—88, N 3.—P. 414—423.
10. Breitmaier E., Spohn K. H. The pH-dependence of carbon-13 chemical shifts of six-membered nitrogen heteroaromatics // Tetrahedron.—1973.—29, N 8.—P. 1145—1152.
11. Dewar M. J. C. The molecular theory of organic chemistry.—New York: Mc Graw-Hill, 1969.
12. Говорун Д. Н. Структурна ізомерія азотистих основ: розрахунок методом АМ1 // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 2.—С. 127—134.
13. Насибуллин Р. С., Султанова В. С., Загитов Г. Н., Зелеев М. Х. Влияние пиразола на конформационное состояние фосфолипидов клеточных мембран // Биофизика.—1993.—38, № 4.—С. 684—686.
14. Oldfield E., Chapman D. Carbon-13 pulse Fourier transform NMR of lecithins // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1971.—43, N 5.—P. 949—953.

УДК 539.193/194:577.33:543.422.25
Надійшла до редакції 25.07.01