

Взаимодействие пиридина с клеточным фосфатидилхолином в D₂O

Р. С. Насибуллин, М. Х. Зелеев, Л. В. Спирихин, Д. И. Косарева

Башкирский государственный медицинский институт
450000, Уфа, ул. Ленина, 3, Башкортостан

Методом спектроскопии ЯМР на ядрах ¹³C обнаружено взаимодействие в D₂O пиридина с фосфатидилхолином — фосфолипидом клеточных мембран. Структура комплекса установлена полупирическим квантово-химическим методом MNDO вследствие многократного варьирования взаимного расположения молекул-партнеров. Показано, что характерной его чертой является взаимодействие гетероцикла пиридина с холиновой группой молекулы фосфатидилхолина посредством π-электронов.

Введение. Молекула пиридина (рис. 1, а) является действующим ядром обширного класса биологически активных веществ, таких как хинин, морфин, кодеин и другие, использующихся в медицине и сельском хозяйстве. Хотя пиридину и его производным посвящено значительное количество как экспериментальных, так и расчетно-теоретических работ, тем не менее, молекулярные механизмы биологического действия этой группы препаратов остаются еще до конца невыясненными [1, 2].

Известно, что пиридин и его замещенные производные, например, ксантин, имидазол, анабазин, никотин и др. образуют разнообразные комплексы с биологическими молекулами [3, 4]. Наиболее долгоживущие из них, как правило, формируются либо за счет образования водородной связи типа N...H-O, либо с участием ионной пары N⁺ H...O⁻ [2, 5—7]. Однако анализ биологического действия многочисленных соединений, содержащих пиридиновые гетероциклы, показывает, что лишь названные выше типы связей не могут объяснить все разнообразные виды воздействия этой группы соединений. Изучение молекулярных механизмов влияния биологически активных соединений пиридина и его производных на структуру и функции биологических мембран требует учета всех возможных схем комплексообразования как специфических, так и неспецифических.

Ранее при исследовании действия пиразола и его производных на клеточные фосфолипиды нами было показано образование комплекса между пиразольным гетероциклом и холиновой группой молекулы фосфатидилхолина (рис. 1, б) посредством π-электронов гетероцикла и высказано предположение о том, что такой тип взаимодействия является вполне возможным и для других сопряженных гетероциклических соединений [8].

В настоящей работе методами квантовой химии и спектроскопии ЯМР на ядрах ¹³C изучено взаимодействие пиридина с клеточным фосфатидилхолином в D₂O.

Материалы и методы. В работе использовали фосфатидилхолин, выделенный из куриных яиц по методу, предложенному в работе [9]. Очистку проводили колоночной хроматографией, как рекомендовано в работе [10]. Чистоту препарата проверяли тонкослойной хроматографией. Растворители использовали с индексом ЧДА. Растворы готовили с 0,1 М концентрацией пиридина и разными концентрациями фосфолипида. В ходе эксперимента концентрация пиридина оставалась неизменной и составляла 0,01 М. Расчеты концентрации проводили известным методом [11]. Плато кривой титрования пиридина фосфатидилхолином не достигалось по следующей причине. В областях с большей концентрацией фосфатидилхолина сигналы в спектре уширяются вследствие мицеллообразования, и точность измерений химического сдвига (ХС) уменьшается, а в областях малых концентраций

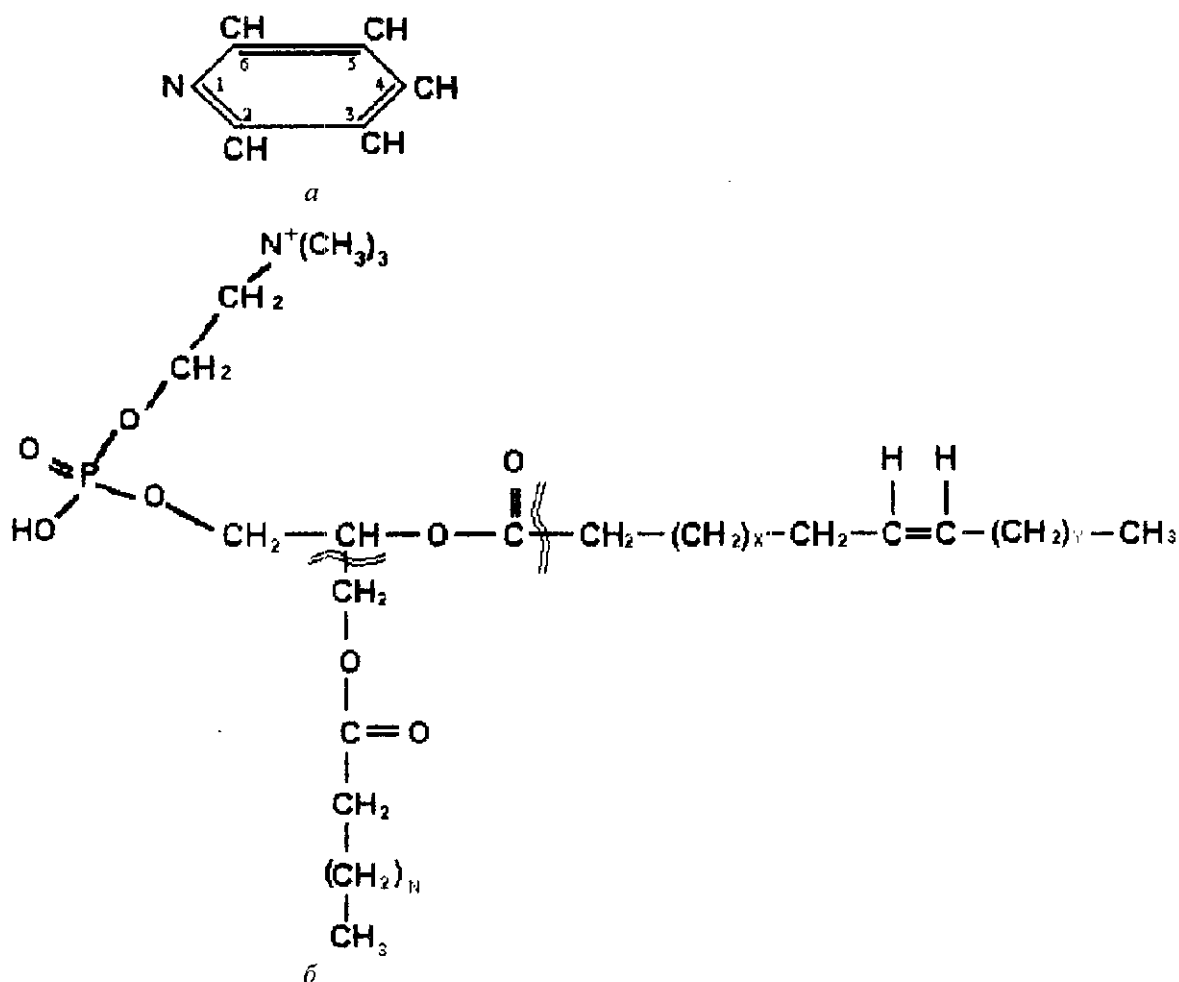


Рис. 1. Структура фосфатидилхолина и пиридина: а — молекула пиридина; б — молекула фосфатидилхолина

(меньше 0,01 М) время накопления сигнала становится неразумно большим. По этой причине и выбрана та область, которая достаточна для фиксации образования комплекса фосфатидилхолина с пиридином. Значение рD среды поддерживалось постоянным и равным 7,1. Как показано в работе [12], зависимость ХС в области рD = 7 на спектре ЯМР ^{13}C является слабовыраженной. Значение рD контролировали прибором ОР-165/3 («МОН», Венгрия) с точностью измерения 0,01. В данной системе рD изменялось на величину не более 0,05. Специальными экспериментами добавлением HCl рD изменяли на 0,1 и наблюдали изменение ХС сигналов ЯМР ^{13}C . При этом варьирование значения ХС составляло не более 0,001 м. д. Цифровой

метод измерения ХС позволяет получать величины ХС до 0,001 м. д. На основании усреднения полученных данных по нескольким экспериментам можно сделать вывод о том, что точность измерения ХС не хуже 0,005 м. д. Поэтому измерение разности ХС ЯМР ^{13}C чистого пиридина и пиридина, связанного с фосфатидилхолином, является достаточно надежным. Поскольку концентрация фосфатидилхолина в эксперименте в 10—40 раз больше, чем пиридина, то изменения ХС углеродных атомов самого фосфатидилхолина исчезающе малы из-за усреднения сигнала комплекса и свободного, поэтому наблюдение за ними не велось.

Спектры ЯМР ^{13}C пиридина, фосфатидилхолина и их смеси в D_2O сняты при температуре 30 °С

на спектрометре AM-300 («Bruker», ФРГ) с рабочей частотой для ядер ^{13}C 75 МГц. Температуру образца поддерживали с точностью 0,2 °С. Внутренним стандартом для отсчета ХС служил раствор DSS в D_2O , где нуль устанавливали по сигналу DSS. Число накоплений 20000.

Расчетную часть работы проводили в два этапа. Для выполнения квантово-химических расчетов использован метод MNDO [13] и программа из фонда программ по квантовой химии ИХКиГ РАН (Новосибирск). Вначале предварительный поиск глобального минимума на гиперповерхности потенциальной энергии комплекса осуществляли методом молекулярной механики [14]. Далее пространственную структуру комплекса и его электронное строение уточняли полумпирическим квантово-химическим методом MNDO в режиме оптимизации всех структур [13, 15, 16].

На рис. 2 приведено строение комплекса пиридин — фосфатидилхолин после оптимизации геометрии.

Результаты и обсуждение. Результаты расчетов показывают, что для комплекса характерно

изменение свойств π -оболочки гетероцикла. Поэтому экспериментально существование таких комплексов можно обнаружить по квадрупольному резонансу на атоме азота молекулы пиридина, как описано в работах [17, 18].

Другой способ, дающий возможность подтвердить наличие комплекса, связан с изменениями электронной плотности на атомах углерода гетероцикла. Как видно из табл. 1, при образовании π -комплекса электронная плотность на атомах C_2 и C_6 увеличивается, на C_3 , C_5 — практически остается неизменной, а на C_4 — уменьшается. На рис. 3 приведены ЯМР ^{13}C спектры пиридина в D_2O .

Экспериментальные данные, представленные в табл. 2 и на рис. 3, показывают, что при увеличении в растворе соотношения пиридин:фосфатидилхолин от 1:1 до 1:4 соответственно ХС сигналов ЯМР ^{13}C молекулы пиридина во 2-м и 3-м положениях уменьшается, а в положении 4 — увеличивается. Уменьшение разности химических сдвигов означает, что экранирование с этих положений частично снимается, а увеличение связано с притоком зарядов в эти положения, то есть ХС в

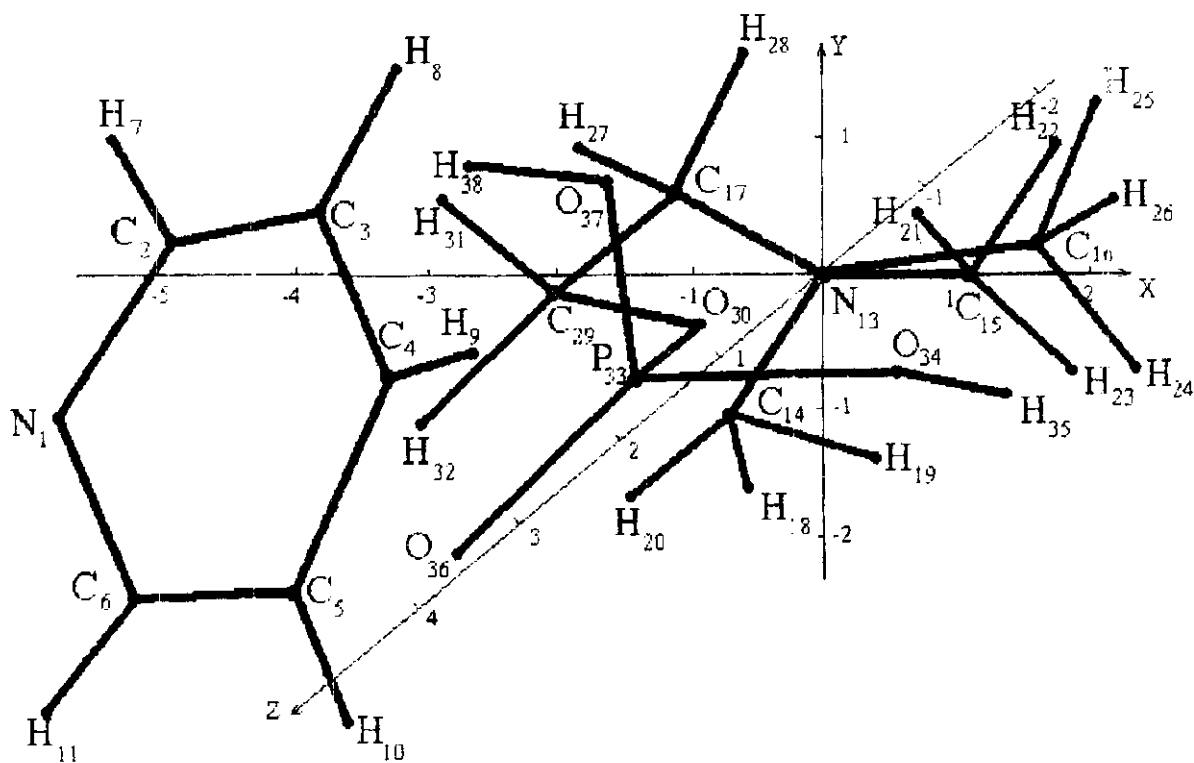


Рис. 2. Строение комплекса пиридин — фосфатидилхолин после оптимизации

Таблица 1
Электронная плотность (а. е. м.) на атомах свободного пиридина и пиридина в комплексе с фосфатидилхолином

Атом	Свободный пиридин	Связанный пиридин
N ₁	5,231	5,232
C ₂ , C ₆	3,957	3,961
C ₃ , C ₅	4,121	4,122
C ₄	4,016	4,000

Таблица 2
Разность ХС сигналов ЯМР ¹³C (м. д.) пиридина при изменении концентрации фосфатидилхолин:пиридин

Концентрация смеси 0,01 М пиридина с 0,1 М фосфатидилхолином	δC ₂ — δC ₃	δC ₂ — δC ₄	δC ₄ — δC ₃
1:0	24,024	10,775	13,309
0:0,5	23,853	10,337	13,401
1:1	23,603	10,085	13,518
1:2	23,432	9,916	13,536
1:4	23,247	9,689	13,551

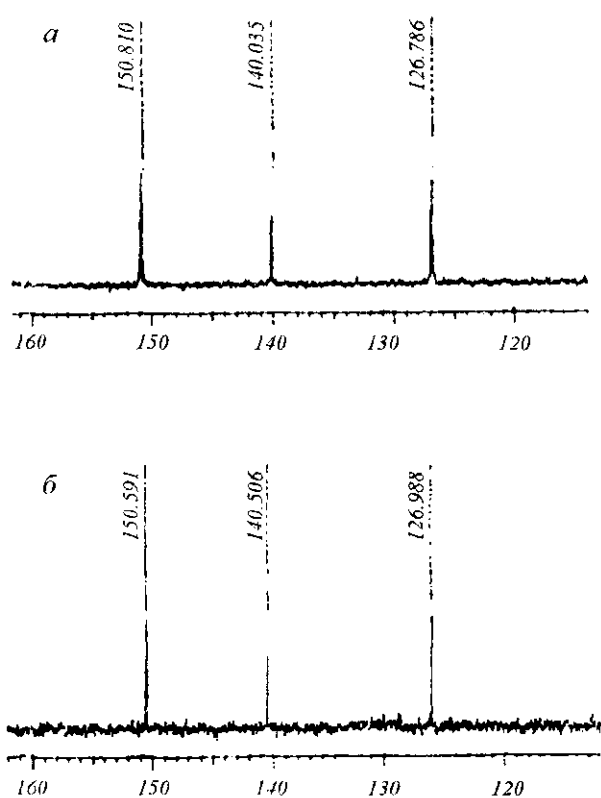


Рис. 3. Химический сдвиг сигналов ЯМР ¹³C: а — 0,01 М пиридин в D₂O; б — 0,01 М пиридин в D₂O с 0,1 М фосфатидилхолином в D₂O в соотношении 1:4

спектрах ЯМР ¹³C углеродных атомов пиридина изменяются симбатно с изменениями электронной плотности, полученной в расчетах для комплексно связанного пиридина по π-системе.

Расчитанные числа заполнения атомных состояний для пиридина представлены в табл. 3. Их анализ показывает, что комплекс образуется за счет кулоновского взаимодействия, связанного с переносом заряда (≈ 0,2 e) на холиновую группу. Расстояние между атомом азота холиновой группы и плоскостью кольца пиридина равно 5,338 Å. Угол, образуемый перпендикуляром, опущенным от азота холиновой группы к плоскости пиридинового кольца, и связью N₁₃-C₁₄, и торсионный угол, образуемый этой же линией и связями N₁₃-C₁₄ и N₁₃-C₁₇, составляют 149,3 и 186,2° соответственно (см. рис. 2). Энергия межмолекулярного взаимодействия в комплексе пиридин — фосфатидилхолин равна 32,07 кДж/моль. Метод MNDO систематически завышает длины связей в подобных комплексах. Эта систематическая ошибка может быть оценена методом, предложенным в работе [18]. Приведенные расчетные данные получены в приближении, когда влияние молекул воды и соседних молекул фосфатидилхолина не учитывается.

Таким образом, анализ спектров ЯМР на ядрах ¹³C, расчетных значений движения зарядов и электронных плотностей на атомах пиридина при переходе из свободного в связанное с фосфатидилхоли-

Таблица 3
Электронное строение свободного пиридина и пиридина в комплексе с фосфатидилхолином

Атом Величина	Свободный пиридин	Связанный пиридин	Атом Величина	Свободный пиридин	Связанный пиридин
N_1			C_4		
S	-0,0011	-0,0029	S	-0,0002	0,0074
p_x	0,1537	-0,5748	p_x	-0,0280	0,0064
p_y	0,3434	0,2807	p_y	0,0173	0,0295
p_z	-0,0000	0,5699	p_z	0,0000	-0,0286
Σ	-0,2315	1,0040	Σ	-0,0109	0,0147
C_2			C_5		
S	0,2194	0,2120	S	-0,0888	-0,1156
p_x	-0,4139	-0,0032	p_x	0,0655	-0,0011
p_y	-0,1732	-0,4293	p_y	0,0020	-0,0655
p_z	0,0000	-0,0807	p_z	0,0000	0,0205
Σ	-0,3677	-0,3012	Σ	-0,0253	-0,1617
C_3			C_6		
S	0,0895	0,0847	S	-0,2182	-0,2093
p_x	0,0319	-0,0206	p_x	0,0415	0,1290
p_y	-0,0571	0,0044	p_y	0,4445	-0,2535
p_z	0,0000	0,0677	p_z	-0,0000	-0,3756
Σ	0,0643	0,1362	Σ	0,1848	-0,7094

Примечание. Для свободного и связанного пиридина соответственно $q = 0,9046$ и $3,0758$ е; $E = 120,2700$ и $-334,0100$ кДж/моль.

ном состоянии и энергии комплексообразования свидетельствует о том, что взаимодействие пиридина с фосфатидилхолином осуществляется в основном через π -систему пиридина и холиновую группу фосфатидилхолина.

Р. С. Насибуллин, М. Х. Зелеев, Л. В. Спирихин, Д. И. Косарева

Взаємодія піридину з клітинним фосфатидилхоліном у D_2O

Резюме

Методом спектроскопії ЯМР на ядрах ^{13}C виявлено взаємодію в D_2O піримідину з фосфатидилхоліном — фосфоліпідом клітинних мембран. Структуру комплексу встановлено шляхом багаторазових змін взаємного просторового розміщення молекул-партнерів напівемпіричним квантовохімічним методом MNDO. Показано, що характерною його рисою є взаємодія гетероциклу піридину з холиною групою молекули фосфатидилхоліну через π -електрони.

R. S. Nasibullin, M. H. Zeleev, L. V. Spirikhin, D. I. Kosareva

Phosphatidylcholine-pyridine complex

Summary

By methods ^{13}C NMR spectroscopy the interaction of the pyridine

with phosphatidylcholine, which is phospholipid of cell membranes, was discovered. The structure of complex was determined by semi-empirical quantum chemistry method MNDO using multiple variation of disposition of the molecule-partners. It was shown, that interaction of pyridine heterocycle with choline group of the phosphatidylcholine molecule by means of π -electrons is characteristic of this complex.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Alan R. Comprehensive heterocyclic chemistry.—New York: Pergamon press, 1984.—Vol. 2, pt 2.—P. 99—394.
2. Голубев В. Н. Механизмы взаимодействия пестицидов с липидным бислоем клеточных мембран // Успехи химии.—1993.—62, № 7.—С. 726—732.
3. Желтовский Н. В., Самойленко С. А., Коломиец И. Н. и др. Исследование взаимодействия гипоксантина, ксангина и их метил- и гликозил-производных с карбоксильной группой аминокислот спектроскопическими методами // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 3.—С. 17—22.
4. Говорун Д. М., Кондратюк І. В., Желтовський М. В. Кислотно-лужні властивості молекулярного ксантину та його комплексотвірна здатність // Там же.—1994.—10, № 6.—С. 61—64.
5. Miyajima G., Sasaki Y., Suzuki M. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra in aromatic and heteroaromatic system. 2. On the chemical shifts of substituted pyridine derivatives // Chem. and Pharm. Bull.—1972.—20, N 3.—P. 429—437.

6. *Vogeli U., Von Philipsborn W.* ^{13}C and ^1H NMR spectroscopic studies, on the structure of N-methyl-3-pyridone and 3-hydroxypyridine // *Org. Magn. Reson.*—1973.—5, N 12.—P. 551—559.
7. *Исаева Г. А., Исаев П. П.* Квантово-химический анализ действия анестетиков на возбудимые биомембраны // *Журн. физ. химии.*—1992.—№ 4.—С. 999.
8. *Ремизов А. Б., Аппарова М. В., Насибуллин Р. С.* Взаимодействие фосфолипидов и пиразола // *Биол. мембраны.*—1991.—8, № 4.—С. 419—422.
9. *Dawson R. M. C.* On the mechanism of action of phospholipase A // *Biochem. J.*—1993.—88, N 3.—P. 414—423.
10. *Шапиро Ю. Е., Викторов А. В., Барсуков Л. И., Бергельсон Л. Д.* Парамагнитное гидрофильное зондирование фосфолипидных мембран методом ЯМР // *Биофизика мембран: Сб. статей.*—М.: Наука, 1981.—С. 22—32.
11. *Шретер В., Лаутеншлегер К. Х., Бибрак Х. и др.* *Химия: Справоч. изд. / Пер. с нем.*—М.: Химия, 1989.—С. 53—58.
12. *Breitmaier E., Spoehn K. H.* The pH-dependence of carbon-13 chemical shifts of six-membered nitrogen heteroaromatics // *Tetrahedron.*—1973.—29, N 8.—P. 1145—1152.
13. *Dewar M. J. C.* The molecular theory of organic chemistry.—New York: Mc Graw-Hill, 1969.
14. *Буркет У., Эллинджер Н. Л.* Молекулярная механика.—М.: Мир, 1986.
15. *Дашевский В. Г.* Конформационный анализ органических молекул.—М.: Химия, 1982.
16. *Симкин Б. Я., Глуховцев М. Н.* Сравнительная оценка квантово-химических методов расчета ароматических и антиароматических азотистых гетероциклов // *Химия гетероцикл. соединений.*—1989.—№ 12.—С. 1587—1603.
17. *Насибуллин Р. С., Спирихин Л. В., Пономарева В. А.* Образование комплексов молекулы пиразола с фосфолипидами // *Биофизика.*—1991.—36, № 4.—С. 594—598.
18. *Исаев А. Н., Шоркин П. П.* Взаимодействие через пространство и через валентную связь в аллильных соединениях, существующих в форме π -комплекса и σ -структуры // *Журн. физ. химии.*—1993.—67, № 3.—С. 514.
19. *Насибуллин Р. С., Пономарева В. А., Спирихин Л. В.* Комплекс фосфатидилхолина с пиразолом // *Биол. мембраны.*—1992.—9, № 3.—С. 308—311.

Поступила в редакцию 22.10.97