



УДК 547.392.52.057

**СИНТЕЗ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ КУМАРИН-3-КАРБОНОВОЙ
КИСЛОТЫ КАК ХИМИЧЕСКИХ ДЕТЕКТОРОВ ОБРАЗОВАНИЯ
ГИДРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ**© 1997 г. В. В. Безуглов[#], Дж. Э. Бияглоу*, Е. М. Маневич*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;* Отдел радиационной онкологии медицинского центра Пенсильванского университета,
Филадельфия, США

Поступило в редакцию 09.12.96 г.

Описан синтез новых амидов и эфиров кумарин-3-карбоновой кислоты с фосфатидилэтаноламином, цетиламином, холестерином и ацетоксиметанолом. Показано, что при их взаимодействии с гидроксильными радикалами, генерируемыми химически или путем γ -облучения, образуются интенсивно флуоресцирующие продукты гидроксирования, что позволяет использовать указанные производные для детектирования гидроксильных радикалов в биологических системах.

Ключевые слова: гидроксильные радикалы; кумарин, производные; γ -облучение; флуоресценция.

Высокореакционноспособные гидроксильные радикалы (ГР), являющиеся одной из форм активированного кислорода, играют важную роль в образовании продуктов свободнорадикального окисления биомолекул в клетке, и в первую очередь полиненасыщенных липидов [1]. Надежное детектирование ГР необходимо как для установления самого факта свободнорадикального окисления, так и для выяснения механизма этого процесса в биологических системах. Один из наиболее чувствительных методов обнаружения ГР основан на измерении флуоресценции продуктов гидроксирования ими ароматических соединений [2], образующихся при реакциях последних с ГР. В качестве химического детектора ГР успешно используют кумарин [3, 4] и кумарин-3-карбоновую кислоту (3-ССА) [5, 6], однако из-за распределения между липидной и водной фазами их трудно локализовать в определенном исследуемом месте биологической системы – в клеточной мембране, цитозоле и др. [4]. Эта проблема может быть решена с помощью гидрофобных встраиваемых в мембрану аналогов 3-ССА или производных 3-ССА, проникающих через клеточную мембрану и биогидролизируемых внутри клеток. В настоящем сообщении мы описываем синтез новых эфиров и амидов 3-ССА, пригодных для использования в качестве детекторов ГР в биомембране или цитозоле.

Сокращения: ГР – гидроксильные радикалы, 3-ССА – кумарин-3-карбоновая кислота, PE – фосфатидилэтаноламин, CE – цетиламин, АОМ – ацетоксиметил, CL – холестерил, 7-НСС – 7-гидроксикумарин-3-карбоновая кислота.

[#] Автор для переписки (факс: (095)335-71-03, электронная почта: vvbez@ibch.siobc.ras.ru).

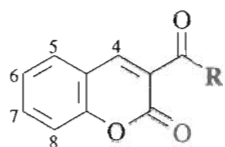
В качестве производного, проникающего через клеточную мембрану и ферментативно гидролизуемого в цитоплазме, мы выбрали ацетоксиметилэфир 3-ССА (3-ССА-АОМ). Подобные эфиры часто применяют для направленного транспорта флуоресцентных зондов в цитоплазму (см., например, [7]). 3-ССА-АОМ получали обработкой раствора 3-ССА в ацетоне 2 экв. ацетоксиметилхлорида в присутствии триэтиламина и диметиламинопиридина в течение 9 сут при комнатной температуре. Продукт выделяли кристаллизацией из метанола. Индивидуальный 3-ССА-АОМ получен с выходом 30%, R_f 0.62 (бензол–ацетон, 5 : 1 – система А), т. пл. 136–138°C. Масс-спектр*, m/z (I, %): 262 (28), $[M]^+$, 173 (100), $[C_{10}H_5O_3]^+$. ЯМР-спектр, δ : 3.83 (3H, с, H_b), 4.90 (2H, с, H_a), 7.34–7.40 (2H, м, H₆, H₇), 7.63–7.69 (2H, м, H₅, H₈), 8.65 (1H, с, H₄).

Липофильные производные 3-ССА синтезировали через промежуточный хлорангидрид, который был приготовлен кипячением в течение 1.5 ч раствора 3-ССА в бензоле с избытком хлористого тионила с последующим упариванием реакционной смеси в вакууме и использовался без дополнительной очистки.

Для получения эфира 3-ССА с холестерином (3-ССА-CL) раствор последнего в хлороформе обрабатывали 48 ч 1 экв. хлорангидрида 3-ССА при комнатной температуре. Продукт реакции выделяли колоночной хроматографией** и кристаллизовали из ацетона. Выход 43%, R_f 0.85 (А),

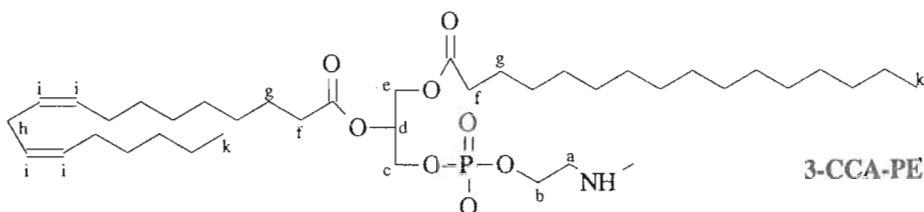
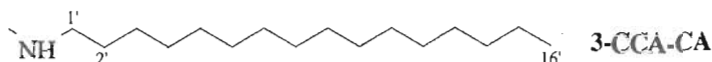
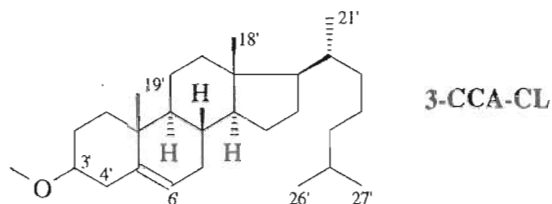
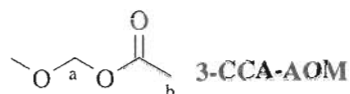
* Электронный удар, энергия ионизации электронов 70 эВ.

** Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле Kieselgel G-60 (Merck, Германия) в хлороформе или градиентной системе хлороформ–метанол.



R =

ОН 3-ССА



т. пл. 221–235°C. Масс-спектр*, m/z : 558 (M), 368 ($C_{27}H_{44}$ – холестадиен), 173 ($C_{10}H_{16}O_2$). ЯМР-спектр, δ : 0.7 (3H, с, H18'), 0.88 (6H, д, H26', H27'), 0.93 (3H, д, H21'), 1.07 (3H, с, H19'), 0.7–1.95 (26H, м, H холестерийна), 2.5 (2H, д, H4'), 4.61 (1H, м, H3'), 5.44 (1H, м, H6'), 7.31–7.40 (2H, м, H6, H7), 7.60–7.68 (2H, м, H5, H8), 8.50 (1H, с, H4).

Цетиламид 3-ССА (3-ССА-СА) получали обработкой раствора СА и триэтиламина в хлороформе 1 экв. хлорангидрида 3-ССА (1 ч, комнатная температура). Продукт реакции очищали колоночной хроматографией и кристаллизовали из ацетона. Выход 73%, R_f 0.79 (А), т. пл. 106–107°C. Масс-спектр, m/z : 413 (M), 173 ($C_{10}H_{16}O_2$). ЯМР-спектр, δ : 0.90 (3H, т, H16'), 1.19–1.44 (26H, м, H3'–H15'), 1.64 (2H, м, H2'), 3.46 (2H, м, H1'), 7.36–7.44 (2H, м, H6, H7), 7.64–7.74 (2H, м, H5, H8), 8.81 (1H, уш. т, NH), 8.93 (1H, с, H4).

Для получения амида 3-ССА с природным L- α -фосфатидилэтаноломином (из яичного желтка; Sigma, США) раствор последнего в хлороформе обрабатывали 30 мин хлорангидридом 3-ССА в присутствии триэтиламина в атмосфере аргона при 0°C. Продукт реакции очищали колоночной хроматографией и переводили в Na-соль. Выход 85%, R_f 0.45 (хлороформ–метанол, 5 : 1). ЯМР-спектр, δ : 0.93 (6H, т, H_к), 1.15–1.40; 1.94–2.21 (м,

H_{алиф}), 1.57 (4H, м, H_г), 2.26 (4H, м, H_г), 2.78 (м, H_н), 3.70 (2H, дт, J 6 Гц, H_а), 4.0 (2H, м, J 7 Гц, H_б), 4.08 (2H, м, H_з), 4.33 (2H, м, H_з), 5.20 (1H, м, H_д), 5.36 (м, H_д), 7.33 (2H, м, H6, H7), 7.60–7.68 (2H, м, H5, H8), 8.89 (1H, с, H4), 9.17 (1H, т, J 5 Гц, NH).

Все полученные производные имели в УФ-спектрах максимум, обусловленный кумариновым хромофором, – при λ 280–285 (плечо при 330–335 нм). Спектры флуоресценции амидов и эфиров 3-ССА

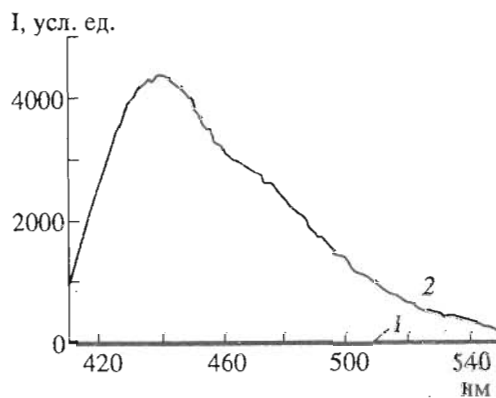


Рис. 1. Спектры флуоресценции 6 мкМ раствора 3-ССА-СL в 20 мМ фосфатном буфере, рН 7.40, при 37°C, до (1) и после (2) γ -облучения дозой 10 Гр; $\lambda_{возб}$ 395 нм.

* Здесь и далее – масс-спектрометрия с плазменной десорбцией, индуцированной ^{252}Cf .

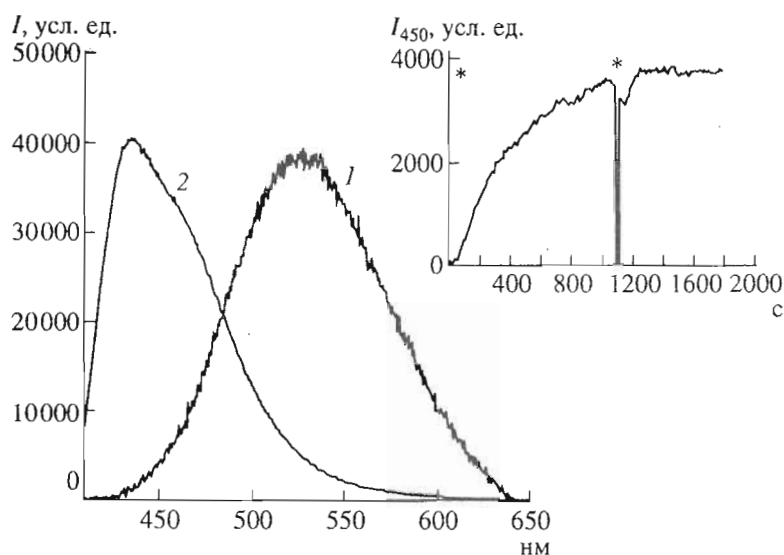


Рис. 2. Спектры флуоресценции продукта гидроксилирования 0.1 мМ раствора 3-ССА-АОМ в 25 мМ боратном буфере, рН 9.0, под действием 1 мМ аскорбиновой кислоты и 10 мкМ сульфата меди (1) и 40 нМ 7-НСС (2), $\lambda_{\text{возб}}$ 395 нм. На вставке показана кинетика гидроксилирования 3-ССА-АОМ в тех же условиях. В моменты времени, обозначенные звездочкой, к смеси, содержащей 3-ССА-АОМ и аскорбиновую кислоту в боратном буфере, прибавляли раствор сульфата меди (конечная концентрация 10 мкМ).

были малоинтенсивны и имели широкий максимум испускания при λ 400–440 нм ($\lambda_{\text{возб}}$ 335 нм).

При реакции кумариновых производных с ГР, генерируемыми как химически системой Cu^{2+} –аскорбат (см. рис. 1), так и при γ -облучении растворов (см. рис. 2), образовывались интенсивно флуоресцирующие продукты, представляющие собой, по-видимому, соответствующие производные 7-гидроксикумарина, который имеет сдвинутые в длинноволновую область спектры поглощения и испускания по сравнению с 3-ССА. Об образовании производных 7-НСС в указанных реакциях свиде-

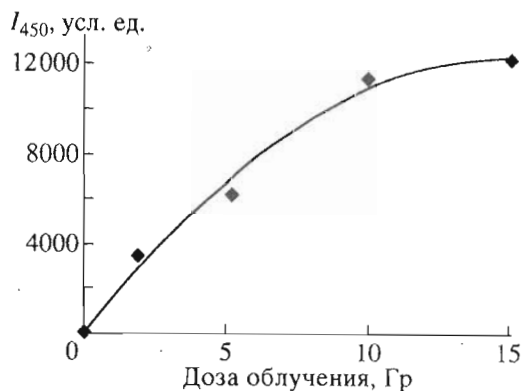


Рис. 3. Зависимость от дозы γ -облучения интенсивности флуоресценции фосфолипидных везикул, полученных обработкой ультразвуком смеси, содержащей 1.6 мМ фосфатидилхолин, 0.4 мМ сфингомиелин и 20 мкМ 3-ССА-РЕ, 20 мМ фосфатный буфер, рН 7.4; $\lambda_{\text{возб}}$ 395.

тельствует совпадение спектров флуоресценции гидроксилированных 3-ССА-СА, 3-ССА-РЕ и 3-ССА-СЛ со спектром флуоресценции стандарта 7-НСС (возбуждение при 360 и 395 нм, испускание при 450 нм; см. также [8]). В то же время спектр флуоресценции гидроксилированного производного 3-САА-АОМ отличался сильным длинноволновым сдвигом максимума испускания (рис. 2). Этот факт обусловлен, вероятно, влиянием ацетоксиметильной группы. Медленный гидролиз эфира в щелочных условиях (рН 9.0) приводит к образованию продукта, не отличимого по флуоресценции от 7-НСС.

Инкубация 3-ССА-АОМ с лизатом клеток HL-60 (1 ч, 37°C) и последующее его γ -облучение вызвало образование 7-НСС (данные не иллюстрированы). Этот эксперимент подтвердил гидролиз 3-ССА-АОМ в цитозоле с образованием удерживаемой в нем 3-ССА, показателем гидроксилирования которой служила флуоресценция 7-НСС. В настоящее время проводится дальнейшая работа с клетками.

Синтезированные нами производные 3-ССА могут использоваться как детекторы ГР в различных системах. Так, при γ -облучении липосом, содержащих 3-ССА-РЕ, было зарегистрировано образование ГР, количество которых возрастало с увеличением дозы облучения (см. рис. 3). Присутствие ГР оценивали по интенсивности флуоресценции продукта гидроксилирования 3-ССА-РЕ.

Таким образом, нами получены новые производные 3-ССА, обладающие способностью детектировать образование ГР в биологических и искусственных системах.

Авторы выражают благодарность проф. В. Инглантеру (W. Englander), д-ру Л. Мэйну (L. Maune) (Biochemistry & Biophysics Dep., Medical School, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA) и Э.В. Бочарову (ИБХ РАН) за помощь в получении и интерпретации ЯМР-спектров, а также Ю.П. Козьмину (ИБХ РАН) за помощь в получении масс-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kagan V.E. Lipid Peroxidation in Biomembranes. Boca Raton: CRC Press, 1988. 181 p.
2. Kaur H., Halliwell B. // Methods of Enzymology. V. 233. Oxygen radicals in Biological systems. Part C / Ed. L. Packer. San Diego: Acad. Press, 1994. P. 67–82.
3. Ashawa S.C., Kini U.R., Madhvanath U. // Int. J. Appl. Rad. Isotops. 1979. V. 30. P. 7–10.
4. Collins A.K., Makrigiorgos G.M., Svensson G.K. // Med. Phys. 1994. V. 21. P. 1741–1747.
5. Kennedy S.H., Manevich Y., Biaglow J.E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. V. 212. P. 118–125.
6. Biaglow J.E., Held K.D., Manevich Y., Kachur A., Tuttle S., Uckun F. // Rad. Res. 1996. V. 145. P. 554–562.
7. Gylfe E. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1055. P. 82–86.
8. Manevich Y., Held K., Biaglow J.E. // Rad. Res. 1997. In press.

Synthesis of Novel Coumarin-3-Carboxylic Acid Derivatives As Chemical Detectors of Hydroxyl Radicals in Biological Systems

V. V. Bezuglov*, J. E. Biaglow**, and Y. Manevich**

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

** Department of Radiation Oncology, Medical School, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA

Abstract—Synthesis of new coumarin-3-carboxylic acid amides and esters with phosphatidylethanolamine, cetylamine, cholesterol, and acetoxymethanol was described. When interacting with hydroxyl radicals generated by chemical methods or by γ -irradiation, these compounds formed intensely fluorescent hydroxylation products and can be used for a site-specific detection of hydroxyl radicals in biological systems.

Key words: hydroxyl radicals, coumarin derivatives, γ -irradiation, fluorescence.