

На правах рукописи

МЕЗЕНЦЕВА АННА АЛЕКСАНДРОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ И
СПЕКТРАЛЬНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ПРИРОДНЫХ
ХЛОРИНОВ И БАКТЕРИОХЛОРИНОВ**

02.00.10 - Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

МОСКВА-2008

Работа выполнена на кафедрах Химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского и Информационных технологий государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Миронов Андрей Федорович

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Томилова Лариса Годвиговна

доктор биологических наук, кандидат физико-математических наук, профессор
Поройков Владимир Васильевич

Ведущая организация: Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится “ 30 ” июня 2008 года в 15 часов в аудитории М-119 на заседании Диссертационного совета Д 212.120.01 при Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова по адресу: 119571, г. Москва, проспект Вернадского, д. 86.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова (119571, г. Москва, проспект Вернадского, д. 86.)

Автореферат размещен на сайте МИТХТ им. М.В. Ломоносова www.mitht.ru и разослан “ ” мая 2008 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук,
старший научный сотрудник

А. И. Лютик

Общая характеристика работы*

Актуальность работы определяется возможностью применения исследуемых структур в качестве фотосенсибилизаторов (ФС) при фотодинамической терапии (ФДТ) рака. Важной характеристикой ФС является наличие у них интенсивных полос поглощения в красной либо, что еще предпочтительнее, в ближней инфракрасной областях спектра, поскольку свет с подобной длиной волны меньше рассеивается в тканях и позволяет проводить лечение глубоко расположенных и пигментированных опухолей, в частности меланомы. В связи с этим разработка ФС с подобными спектральными характеристиками является важным этапом в повышении эффективности ФДТ рака.

В последние годы интенсивный поиск препаратов проводится на основе природных хлоринов и бактериохлоринов. Первые имеют интенсивную полосу поглощения в области 660 нм, а вторые - 770 нм. Для них также характерна низкая токсичность, доступные источники сырья и надежные способы выделения.

В тоже время эти природные пигменты и, в частности, наиболее распространенные среди них хлорофилл *a* и бактериохлорофилл *a* являются сравнительно неустойчивыми соединениями, плохо растворимыми в воде, в связи с чем усилия исследователей в последние годы направлены на модификацию данных соединений. Так, удаление центрального атома металла и фитольного остатка и включение в основной тетрапиррольный макроцикл дополнительного ангидридного или циклоимидного фрагментов позволяет не только повысить стабильность разрабатываемых ФС, но и существенно улучшить их спектральные характеристики.

Одним из перспективных подходов при направленной модификации ФС является компьютерное прогнозирование положения длинноволновых

* В руководстве работой и подготовке её к защите активное участие принимала д.т.н., профессор Бурляева Елена Валерьевна.

максимумов поглощения с помощью квантово-механических методов. Методы построения прогнозов на основе гипотез о взаимосвязи структуры молекулы соединения и его свойств разрабатываются на протяжении последних десятилетий на стыке исследований в области химической технологии и прикладной математики.

Однако, большинство существующих методов прогнозирования количественных зависимостей «структура-свойство» не учитывают тот факт, что молекулы исследуемых соединений могут являться конформационно - гибкими. В этом случае зависимость «структура –свойство» оказывается неоднозначной – одному соединению, характеризующемуся некоторой величиной активности, соответствует несколько различных значений одного и того же параметра, полученных для различных конформеров этого соединения. В последнее время предложен ряд методов, направленных на формирование и анализ неоднозначных зависимостей «структура –свойство». При этом методы отбора конформеров, параметры которых будут учитываться при формировании зависимостей «структура – активность», разработаны не достаточно хорошо.

Представленная работа является частью фундаментальных научных исследований, проводимых на кафедре Химии и технологии биологически активных соединений МИТХТ им. М.В. Ломоносова в рамках темы № 1Б-4-355 «Разработка химических и биотехнологических методов модификации биологически активных соединений с целью моделирования жизненно важных процессов в природе и создания новых лекарственных препаратов», при поддержке гранта президента по поддержке ведущих научных школ № НШ-2013.2003.3

Целью работы является исследование зависимости структура – спектральные свойства производных хлорофилла *a* и бактериохлорофилла *a* с дополнительными экзоциклами для направленного поиска новых

фотосенсибилизаторов с интенсивным поглощением в ближней ИК области спектра.

Научная новизна

1. Изучена зависимость структура – спектральные свойства для производных хлорофилла *a* и бактериохлорофилла *a* с дополнительными циклами при пирроле «С» основного макроцикла.
2. Разработана методика расчета положения длинноволновой полосы Q в спектрах поглощения с учетом конформационной гибкости молекул исследуемых соединений.
3. Предложены критерии отбора конформеров, соответствующих возбужденному состоянию молекул производных хлорофилла и бактериохлорофилла.
4. Выполненные расчеты производных бактериохлорофилла *a* с дополнительным экзоциклом показали, что отсутствие гетероатома в последнем приводит к гипсохромному смещению полосы Q, а введение атома серы – к батохромному сдвигу, величина которого возрастает по мере повышения валентности гетероатома.

Практическая ценность работы

Разработанная методика позволяет рассчитывать значения полосы Q в спектрах поглощения хлоринов и бактериохлоринов с различными дополнительными циклами при пирроле «С» основного макроцикла. Перспективность данного подхода подтверждена хорошей сходимостью рассчитанных значений полосы Q с экспериментальными данными (относительный разброс составляет 0.25%). Выполнен сравнительный анализ теплот образования производных бактериохлорофилла *a*, позволивший выявить наиболее устойчивые структуры. Результаты работы могут быть использованы для направленного поиска новых фотосенсибилизаторов с интенсивным поглощением в ближней ИК области спектра.

Апробация работы

Материалы работы были доложены на IV Съезде фотобиологов России (г. Саратов), на I научно-технической конференции молодых ученых МИТХТ им. М.В. Ломоносова «Наукоемкие химические технологии», на выставке НТТМ-2006 (г. Москва, работа получила диплом «За творческий подход при создании научного проекта»), на XV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (работа заняла 2-е место на конкурсе молодых ученых секции «Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств»). По материалам диссертации опубликовано 7 работ: 2 статьи и 5 тезисов.

Объем и структура работы

Работа состоит из введения и 3 глав – литературного обзора по сущности метода фотодинамической терапии рака и свойствам фотосенсибилизаторов, анализу и модификации процедуры прогнозирования спектральных свойств производных хлорина и бактериохлорина, экспериментальной части и обсуждения результатов. Работа выполнена на 95 листах, список литературы включает 142 ссылки, в работе 29 иллюстраций и 13 таблиц.

Содержание работы

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и основные задачи исследования.

В первой главе рассмотрены проблемы применения производных хлорина и бактериохлорина в качестве фотосенсибилизаторов (ФС) при фотодинамической терапии (ФДТ) рака. В основе ФДТ лежит селективное накопление ФС в раковых клетках с последующим облучением опухоли светом определенной длины волны. Возбужденные молекулы ФС вступают во взаимодействие с кислородом, в результате чего образуется синглетный

кислород и высокореакционноспособные радикалы, которые разрушают раковую клетку.

К сожалению, используемые в настоящее время сенсibilизаторы обладают определенными недостатками, среди которых можно отметить неоднородный химический состав, низкую селективность накопления в опухоли, выраженную кожную токсичность, ограничение по глубине некроза, связанное с рассеиванием света, высокую стоимость препаратов. В связи с этим, поиск новых высокоэффективных ФС является весьма актуальной задачей для успешного развития фотодинамической терапии.

В литературном обзоре рассматриваются сенсibilизаторы первого и второго поколения на основе порфиринов и хлоринов, соответственно, используемые в настоящее время в медицинской практике. Отмечено, что важной характеристикой ФС является наличие у них интенсивной полосы поглощения в красной и ближней инфракрасной областях спектра, поскольку свет с подобной длиной волны меньше рассеивается в тканях и эффективность ФДТ при лечении глубокозалегающих и окрашенных опухолей повышается. Модификация фотосенсibilизаторов позволяет улучшить их растворимость в полярных растворителях и спектральные характеристики. Например, введение атома азота в дополнительный экзоцикл и окисление периферийной винильной группы до ацетильной и формильной приводят к батохромному сдвигу полос поглощения. Для улучшения растворимости в полярных растворителях и воде в молекулу ФС вводят дополнительные карбоксильные и гидроксильные группы.

В разделе «Спектральные свойства порфиринов» описываются особенности электронных спектров поглощения (ЭСП) этого класса соединений, а также влияние заместителей и дополнительных циклов на положение максимума поглощения. В целом, введение заместителей в мезо-положения порфиринового макроцикла, а также дополнительных напряженных циклов приводит к батохромному сдвигу полосы Q.

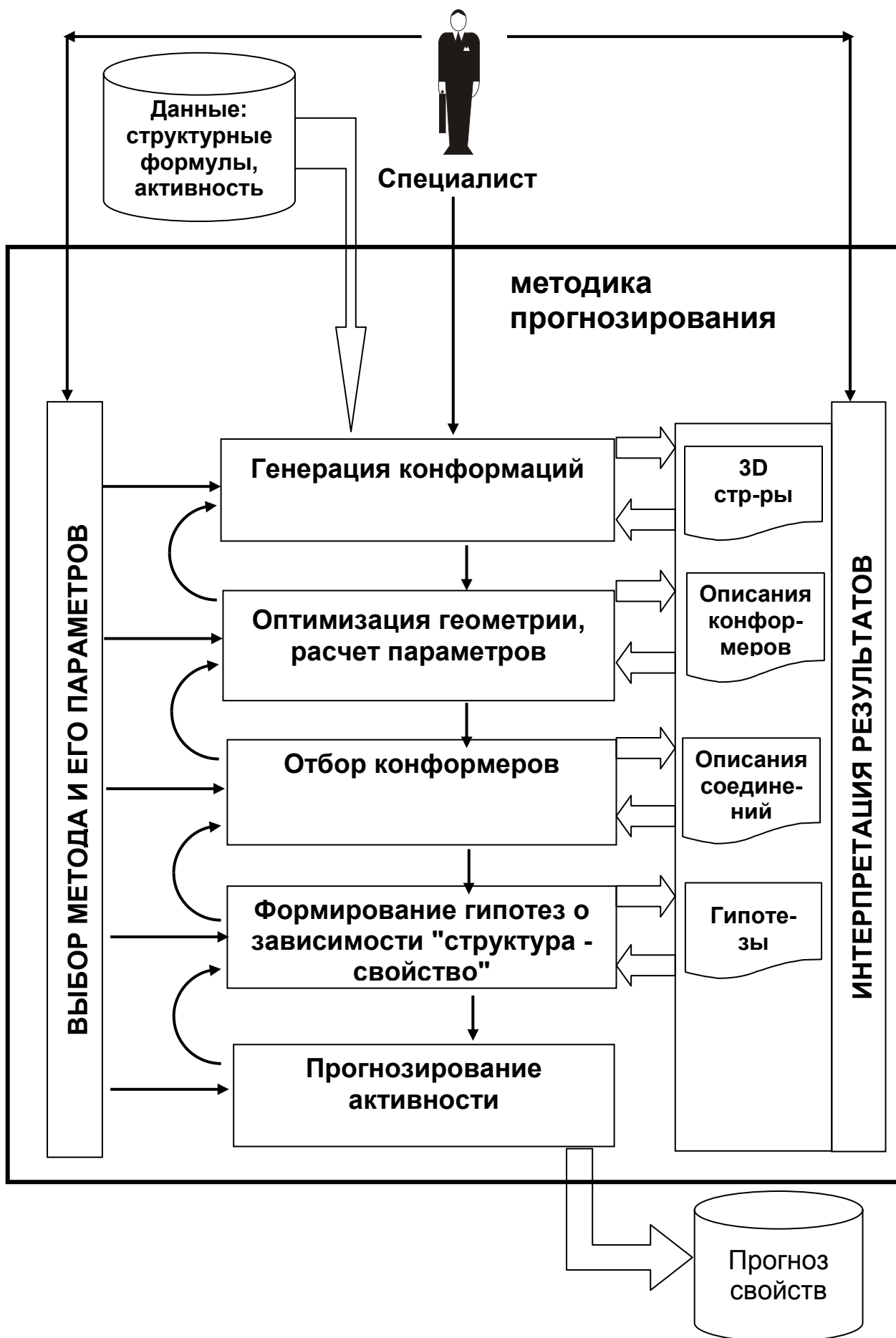


Рис. 1. Методика прогнозирования свойств конформационно-гибких соединений.

Во второй главе выполнен анализ обобщенной методики прогнозирования свойств органических соединений на основе квантово-химических параметров молекул. Показано, что эта процедура носит итеративный характер – по результатам выполнения каждого её этапа возможен возврат к одному из предыдущих этапов. Рассмотрены особенности этой методики применительно к конформационно-гибким соединениям. Выявлено 5 основных этапов прогнозирования: генерация конформаций, расчет параметров, отбор конформеров, построение гипотез и формирование прогнозов (рис.1).

Далее для каждого этапа проанализированы и выбраны методы, применимые для производных хлорина и бактериохлорина.

Для генерации конформаций производных хлорина и бактериохлорина предложено использовать метод систематического поиска. При этом предполагается, что ядро молекулы имеет плоскую структуру.

Целью следующего этапа являлась оптимизация геометрии пространственных структур молекул исследуемых соединений и расчет их квантово-химических параметров. Показано, что для реализации этой задачи на персональном компьютере предпочтительными являются полуэмпирические методы, в частности, метод PM3, так как он параметризован для расчета органических молекул, содержащих элементы из главных подгрупп 1 и 2 групп периодической системы. Из литературных источников известно, что этот метод показывает наиболее близкое соответствие расчетных и экспериментальных значений максимумов поглощения исследуемых структур.

Для изучения электронных спектров поглощения молекул, содержащих системы сопряженных π -связей, использован полуэмпирический метод ZINDO/S с учетом конфигурационного взаимодействия.

Среди программ, обеспечивающих расчет квантово-химических параметров молекулы, рассмотрены HyperChem, GAUSSIAN и MOPAC. В

качестве основного инструмента для расчета выбрана программа HyperChem, поскольку она позволяет рассчитывать электронные спектры поглощения.

На третьем этапе процедуры прогнозирования, как правило, отбираются энергетически приемлемые конформеры исследуемых молекул. Однако, в ряде случаев, специалист-химик накладывает дополнительные ограничения на набор конформеров, основанные на имеющихся сведениях о механизме проявления исследуемых свойств. В работе показано, что при изучении спектральных характеристик эти ограничения связаны с необходимостью учета параметров возбужденного состояния молекулы.

При построении гипотез о взаимосвязи между структурой молекулы и свойствами соединения обычно используются статистические методы. Однако применение этих методов для анализа неоднозначных зависимостей сопряжено с определенными трудностями. Для конформационно-гибких соединений часто используют методы, основанные на математической логике, в частности, методы интервального анализа.

Метод построения гипотез определяет структуру гипотезы и формирование прогноза интересующего исследователя свойства. Как правило, такой прогноз имеет либо качественный характер (отвечает на вопрос, обладает ли исследуемое соединение требуемым свойством), либо интервальный (позволяет оценить интервал возможных численных значений свойства).

В третьей главе предложенная процедура прогнозирования применена для определения спектральных свойств природных хлоринов и бактериохлоринов. Установление таких взаимосвязей позволит отбирать среди еще не исследованных структур наиболее перспективные фотосенсибилизаторы для последующего их синтеза.

С целью проверки применимости полуэмпирических методов расчетов производных бактериохлорина на первом этапе работы была выполнена оптимизация возможных структур исследуемых соединений. В качестве

примера была рассмотрена реакция бактериопурпурина с гидразин-гидратом, в ходе которой возможно образование двух изомеров 1а и 1б (рис. 2).

В табл.1 приведены расчетные значения теплот образования структур 1а и 1б. Эти данные показывают, что образование структуры 1а является более вероятным, поскольку ему соответствует наименьшая энергия. Аналогичным образом было показано, что структура 2а также является наиболее вероятной по сравнению с 2б (рис. 2).

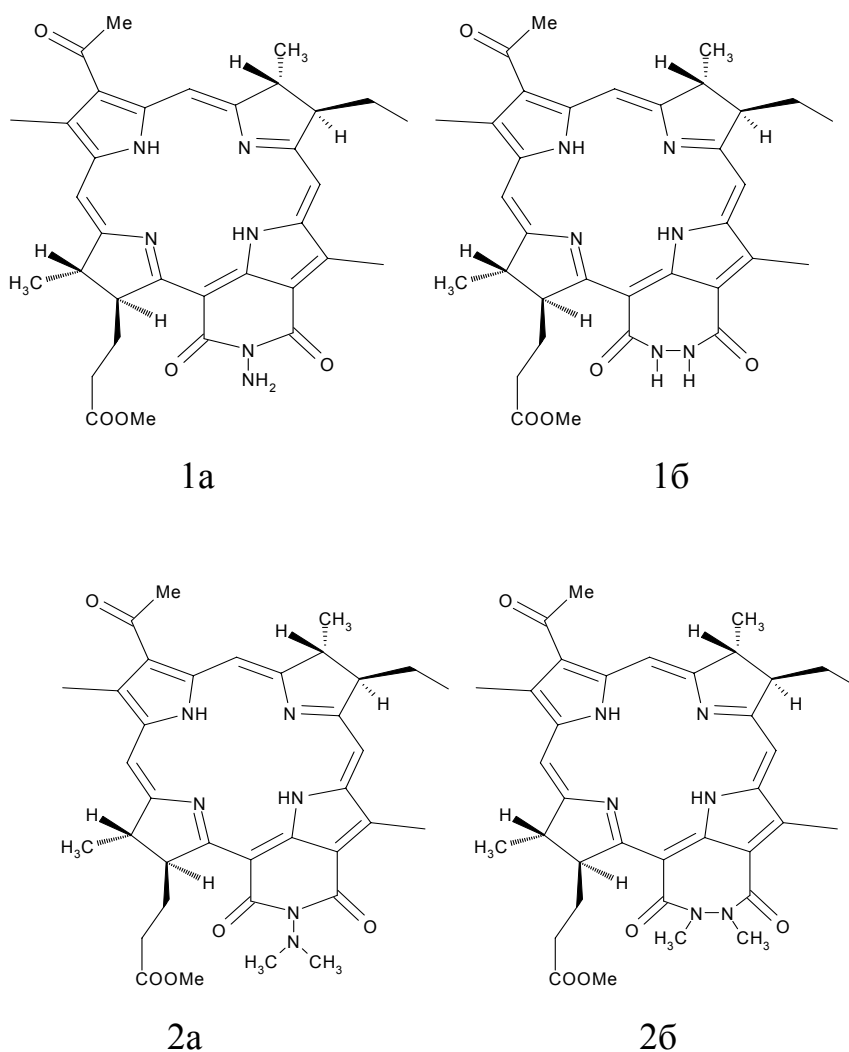


Рис. 2. Исследуемые структуры.

Действительно, изучение спектров ^1H -ЯМР показало, что при конденсации бактериопурпурина с гидразин-гидратом образуется лишь соединение 1а, а при его обработке иодистым метилом циклоимид 2а.

Таблица 1. Рассчитанные значения теплот образования.

Структура	Теплота образования, ккал/моль	
	Минимальная	Максимальная
1a	50.72	55.86
1б	57.51	63.48
2a	63.98	65.72
2б	73.18	76.89

Для решения основной задачи – прогнозирования значений длин волн максимумов поглощения фотосенсибилизаторов предложено рассчитывать электронные спектры с помощью параметризованного метода ZINDO/S на основе оптимизированной структуры молекулы.

Первоначально при прогнозировании использовались все энергетически приемлемые конформеры. Исследовались производные хлорофилла *a* 3 а-д (рис.3) и бактериохлорофилла *a* 4 а-д, которые в настоящее время интенсивно изучаются с целью создания новых эффективных ФС для ФДТ рака.

Полученные результаты, как видно из табл. 2, близки к экспериментальным величинам длин волн максимума поглощения. Сходимость носит монотонный характер – если расчетное значение длины волны максимума поглощения для одного соединения больше, чем для другого, то экспериментальное значение максимума поглощения первого соединения также будет превышать максимум поглощения второго соединения (рис.4). Таким образом, показано, что рассчитанные этим методом значения длин волн максимума поглощения можно использовать для отбора наиболее перспективных соединений для ФДТ рака.

Таблица 2. Рассчитанные и экспериментальные значения полосы Q хлоринов и бактериохлоринов.

Структура	Минимальная теплота образования, ккал/моль	Длина волны, нм (эксперимент.)	Длина волны, нм (расчетная)	Относительный разброс (ОР), %
3а	-78.54	666	680	2.10
3б	-87.52	698	687	1.58
3в	-46.43	709	698	1.55
3г	-57.95	711	698	1,83
3д	-46.19	718	718	0.00
4а	-73.40	810	803	0.86
4б	-73.83	814	813	0.12
4в	-62.03	830	822	0.96
4г	-43.98	834.5	834	0.06
4д	-156.50	818	817	0.12

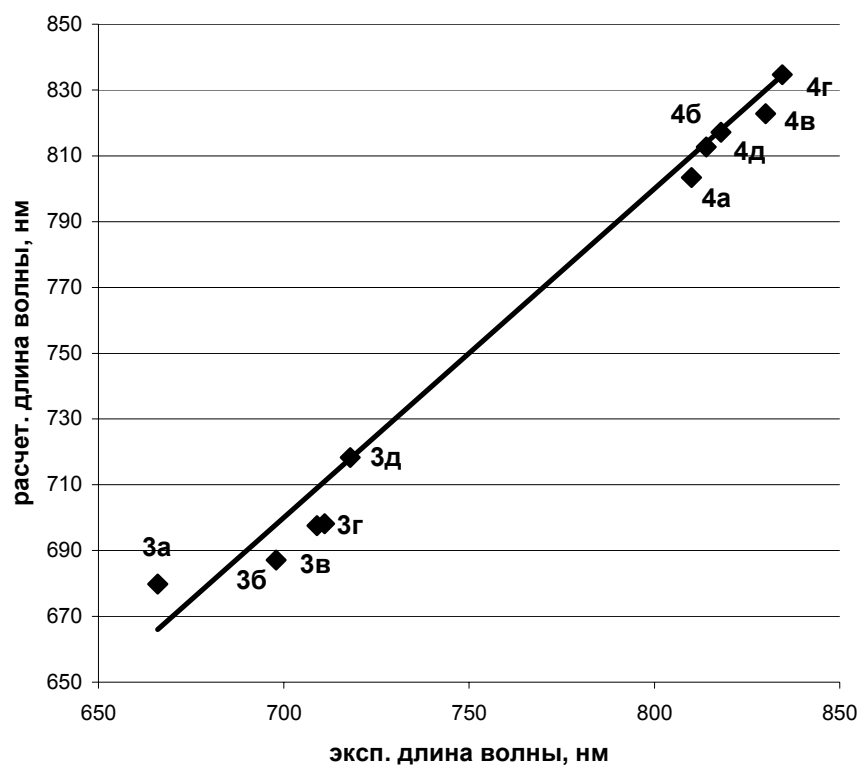
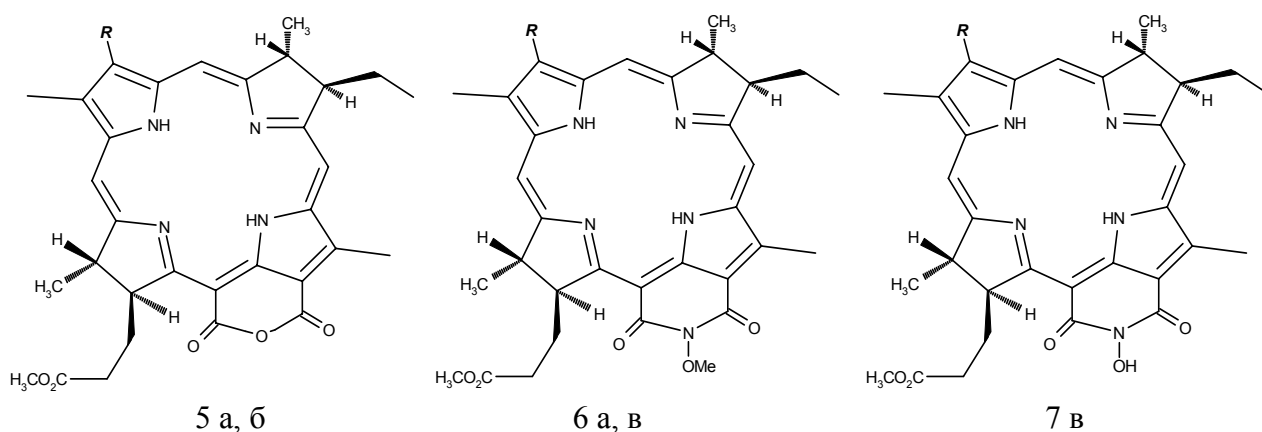


Рис. 4. Сходимость экспериментальных и расчетных значений длин волн максимумов поглощения.

Для увеличения точности необходимо формировать прогнозы с учетом дополнительных критериев, используемых при отборе конформеров. В качестве такого критерия было предложено использовать разность между энергиями верхней занятой молекулярной орбитали (ВЗМО) и нижней вакантной молекулярной орбитали (НВМО).

При формировании критерия использовались следующие производные бактериохлорофилла *a* – бактериопурпурины (4д, 5а, 5б), *N*-метоксициклоимиды (6а, в) и *N*-гидроксициклоимид (7в) бактериохлорина *p* (рис.5).

Результаты расчетов показали, что, в зависимости от разности энергий (ΔE) ВЗМО и НВМО, энергетически приемлемые конформеры могут быть разбиты на 2 группы. В соответствии с теорией электромагнитного излучения, при поглощении кванта света молекула переходит в электронно-возбужденное состояние с высоким уровнем энергии. Мы предположили, что за характерный для данного соединения спектр поглощения будут отвечать конформеры с наибольшим значением ΔE (для краткости, как принято в SAR, будем называть такие конформеры «активными»).



$R = \text{CH}=\text{CH}_2$ (а), $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ (б), $\text{C}(\text{CH}_3)=\text{NOH}$ (в).

Рис. 5. Исследуемые производные бактериохлоринов.

В табл.3 представлены основные характеристики как всех энергетически приемлемых конформеров, так и «активных» конформеров.

Таблица 3. Результаты квантово-химических расчетов.

Структура	4д	5а	5б	6а	6в	7в
Общее количество конформеров	81	243	81	81	27	27
Количество «активных» конформеров	40	139	36	25	16	16
Теплота обр. для «активных» конформеров, ккал/моль	От -156.50 до -151.26	От -101.35 до -97.09	От -170.13 до -166.39	От -78.12 до -74.09	От -82.86 до -77.55	От -82.86 до -77.55
ΔE (ВЗМО-НВМО), эВ, для всех конформеров.	5.57-5.77	5.43-6.19	5.58-6.19	5.59-6.15	5.59-5.77	5.59-5.77
ΔE (ВЗМО-НВМО), эВ, для «активных» конформеров	5.63-5.77	6.10-6.19	6.14-6.19	5.81-6.15	5.62-5.77	5.62-5.77
Длина волны, нм (эксперимент.)	818	783	775	799.5	805	812
Длина волны, нм (расчетная)	817	782	778	796	804	812
Относительный разброс (ОР), %	0.12	0.13	0.39	0.44	0.12	0.00

Как видно из табл. 3, использование дополнительного критерия отбора конформеров позволяет существенно повысить точность полученных прогнозов: значение среднего относительного разброса составляет 0.25 %, при этом разница между экспериментальным и расчетным значением максимума поглощения не превышает 3.5 нм.

Как и в предыдущем исследовании, сходимость между расчетными и экспериментальными максимумами поглощения носит монотонный характер (рис. 6).

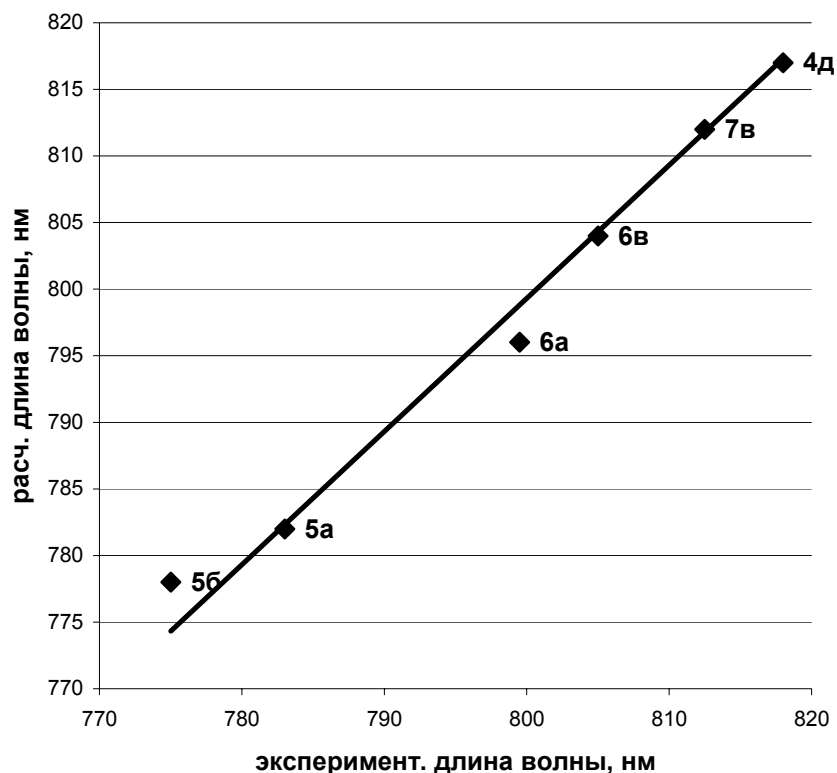


Рис. 6. Сходимость экспериментальных и расчетных значений длин волн максимумов поглощения

Предложенный критерий был использован для предсказания спектральных характеристик еще не синтезированных соединений - производных бактериохлорина, имеющих в дополнительном экзоцикле вместо кислорода либо атом углерода, либо атом серы разной валентности (рис. 7).

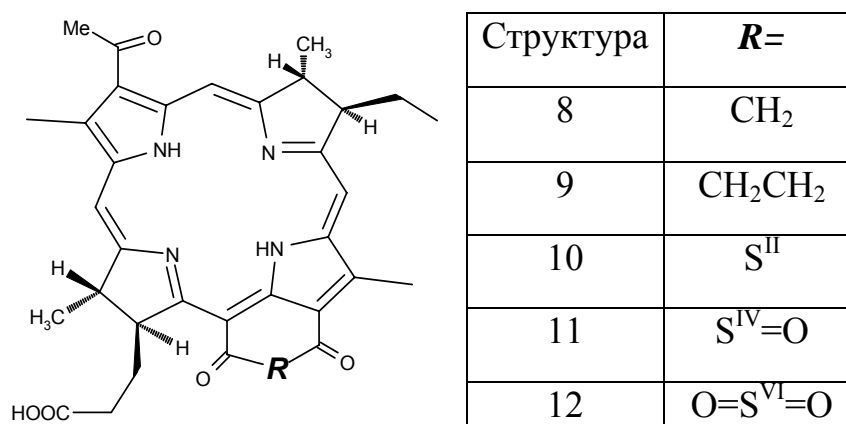


Рис.7. Исследуемые структуры.

Из табл. 4 видно, что теплота образования производных бактериохлорина с шести- и семичленными дополнительными экзоциклами сравнительно мала, что говорит о возможности существования таких соединений. Максимум поглощения структуры 8 вероятно будет смещен в более длинноволновую область относительно соединения 9.

Таблица 4. Результаты квантово-химических расчетов.

Структура	Общее количество конформеров	Количество «активных» конформеров	Теплота образования для «активных» конформеров, ккал/моль	ΔE (ВЗМО-НВМО), эВ		Прогнозируемая длина волны, нм
				для всех конформеров	для «активных» конформеров	
8	27	22	От -116.02 до -113.58	5.83 - 5.97	5.88 - 5.97	759
9	27	20	От -117.57 до -113.77	5.93 - 6.04	5.94 - 6.04	728
10	27	12	От -91.98 до -90.26	5.65 - 5.76	5.71 - 5.76	781
11	27	22	От -109.34 до -107.27	5.68 - 5.80	5.71 - 5.80	799
12	27	12	От -139.60 до -137.04	5.69 - 5.81	5.73 - 5.81	819

Проведенные расчеты показали, можно ожидать батохромный сдвиг максимума поглощения с ростом валентности серы.

Выводы:

1. Исследована зависимость спектральных свойств производных хлорофилла *a* и бактериохлорофилла *a* от характера заместителей в пирроле «А» и наличия гетероатома в дополнительном экзоцикле при пирроле «С».

2. Разработана методика расчета положения полосы Q в электронных спектрах поглощения хлоринов и бактериохлоринов с дополнительными шестичленными циклами с учетом конформационной гибкости молекул.
3. Сходимость рассчитанных значений длин волн максимумов поглощения с экспериментально полученными величинами составляет 0.25%, что позволяет использовать методику для создания новых фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии рака.
4. Предложены критерии отбора конформеров, соответствующих возбужденному состоянию молекул производных хлорофилла а и бактериохлорофилла а.
5. Выполнен сравнительный анализ теплот образования изучаемых соединений, позволивший определить наиболее устойчивые структуры.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Мезенцева А.А., Миронова Н.А., Бурляева Е.В. Прогнозирование максимума поглощения производных бактериохлорина с учетом конформационной гибкости молекул // Вестник МИТХТ. - 2008. - Т.3, № 2. - С. 89-94.
2. Мезенцева А.А., Бурляева Е.В., Миронов А.Ф. Расчеты квантово-химических параметров производных хлорина с дополнительными циклами // Вестник МИТХТ. - 2006. - Т.1, № 4. - С. 50-54.
3. Миронов А.Ф., Бурляева Е.В., Мезенцева А.А. Расчеты квантово-химических параметров производных бактериохлорина с дополнительными циклами. // Тезисы IV Съезда фотобиологов России. - Саратов. - 2005. - С. 139-140.
4. Миронов А.Ф., Бурляева Е.В., Мезенцева А.А. Расчеты квантово-химических параметров производных хлорина и бактериохлорина. // Тезисы I научно-технической конференции молодых ученых МИТХТ им.

- М.В. Ломоносова «Научно-технические химические технологии». - Москва. – 2005. – С. 49-50.
5. Мезенцева А.А., Бурляева Е.В. Квантово-химические расчеты спектральных и термодинамических характеристик производных хлорина.//Тезисы докладов выставки НТТМ-2006. Москва. - 2006. - С. 65-66
 6. Мезенцева А.А., Бурляева Е.В., Миронов А.Ф. Прогнозирование спектральных характеристик производных бактериохлорина с помощью квантово-химических расчетов.//Тезисы докладов XI Международной научно-технической конференции «Научно-технические химические технологии-2006». - Самара. - 2006. – С. 49-50.
 7. Мезенцева А.А., Миронова Н.А., Бурляева Е.В. Определение термодинамических и спектральных характеристик бактериохлоринов с помощью квантово-механических методов.//Тезисы докладов XV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». - Москва. - 2008. - С. 409.

Подписано в печать _____ Формат 60x84/16. Бумага писчая.

Отпечатано на ризографе. Уч. изд. Листов 1.0. Тираж 100 экз.

Заказ № _____

Московская государственная академия тонкой химической технологии

им. М.В. Ломоносова

Издательско-полиграфический центр

119571, г. Москва, прос. Вернадского, 86