

На правах рукописи

Грошева Валентина Ивановна

**ОСОБЕННОСТИ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ
ТЕТРАЦИКЛИНА
С ИОНАМИ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛОВ**

Специальность 03.00.02

Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва - 2006

Работа выполнена в Институте радиотехники и электроники РАН.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор Золин Владислав Фёдорович

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук,
профессор Петрова Галина Петровна

доктор физико-математических наук,
старший научный сотрудник
Нечипуренко Юрий Дмитриевич

Ведущая организация: Центр фотохимии РАН

Защита состоится «19» октября 2006 г. в 17.00 ч. на заседании
Специализированного Совета К 501.001.08 в Московском государственном
университете им. М.В. Ломоносова по адресу:

119992, ГСП-2, г.Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова,
физический факультет, аудитория № 519.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета
МГУ им. М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан «18» сентября 2006 г.

Ученый секретарь
Специализированного Совета К 501.001.08
при МГУ им. М.В.Ломоносова,
доктор физико-математических наук

Г.Б.Хомутов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Исследование **специфичности связывания ионов металлов с биоорганическими молекулами** является актуальным направлением современной биофизики и ряда смежных наук. Комплексные соединения ионов металлов являются непосредственными участниками целого ряда процессов, протекающих в живых организмах. Они играют центральную роль в переносе кислорода и углекислого газа, участвуют в процессе электронного транспорта в хлоропластах и в митохондриях, в ферментативном катализе и во множестве других процессов. Присутствие катионов металлов в водной фазе влияет на физико-химические свойства, фазовое состояние биомембран и их компонент, сказывается на регуляции работы ферментов. Научное обоснование селективности связывания ионов металлов с биологическими молекулами важно для более глубокого понимания закономерностей организации живой материи, разгадки молекулярных механизмов процессов самосборки, самоорганизации и самовоспроизведения структур, характерных для разнообразных биосистем. С другой стороны, результаты исследования селективности связывания биоорганических молекул с ионами металлов в перспективе могли бы быть использованы для разработки чувствительных биосенсоров.

Особый научный и практический интерес представляет исследование **молекулярных механизмов действия лекарственных препаратов**. Фармакологическая активность лекарственных препаратов определяется не только их химической структурой, но и состоянием функциональных групп, определяемым как взаимодействием молекул препарата с растворителем, так и друг с другом. При специфическом связывании этих молекул с клетками-мишенями, особую роль играет **конформация молекул**, которая может изменяться, например, при взаимодействии молекул препарата с двух и трёхзарядными ионами металлов. Одним из традиционных методов исследования конформации молекул является метод кругового дихроизма,

который позволяет следить за кинетикой конформационных перестроек молекул в растворе (при наличии полос поглощения в видимой или ультрафиолетовой областях спектра).

Объект исследования

Междисциплинарным **объектом нашего исследования** является молекула тетрациклина. С одной стороны – это биомолекула, оказывающая воздействие на биосинтез белка в бактериальных клетках, и поэтому представляющая интерес для биологов, медиков и фармацевтов. С другой – это достаточно стабильная мезомолекула, имеющая молекулярный размер, промежуточный между размерами малых органических молекул и макромолекул, и уникальное химическое строение, благодаря которому её можно использовать, например, в качестве биосенсора.

Предмет исследования

Предметом исследования диссертационной работы является изучение особенностей взаимодействия тетрациклина с ионами лантанидов, приводящего к комплексообразованию. Интерес к комплексным соединениям тетрациклина с ионами редкоземельных металлов связан с тем обстоятельством, что эти катионы обладают сродством к кальций-связывающим центрам белков, мембран, протеолипидов, причём константы связывания с лантанидами намного выше, чем с кальцием. Это свойство редкоземельных катионов послужило основанием для разработки ныне широко применяемого на практике метода редкоземельного спектроскопического зондирования биомолекул, базирующегося на гипотезе эквивалентности мест связывания лантанидов и кальция. По изменениям спектральных характеристик комплексных соединений, активированных лантанидами, делаются соответствующие выводы о строении мест связывания с ионами кальция или магния. Ионы лантанидов, несмотря на то, что являются абиотичными, находят применение в медицине в качестве диагностических средств, благодаря своим уникальным оптическим и магнитным свойствам. Катионы европия

успешно используются в качестве люминесцентных зондов, катионы гадолиния применяют при магнитно-резонансной томографии в качестве контрастных агентов. Изучается влияние катионов гадолиния на пролиферацию и подвижность некоторых опухолевых клеток. Таким образом, исследование комплексообразования тетрациклина с ионами редкоземельных элементов имеет важное научное и прикладное значение.

Степень разработанности научной проблемы

Тетрациклин и его производные успешно применяются в медицинской практике в качестве лекарственных препаратов. Тетрациклин хорошо проникает сквозь клеточные мембраны бактерий, связывается с рибосомами, оказывая ингибирующий эффект на синтез бактериальных белков. Установлено, что он может взаимодействовать и с митохондриями бактериальных клеток. Максимум антибактериальной активности гидрохлорид тетрациклина проявляет при слабокислом значении рН, равном 5,5. Остается открытым вопрос – чем всё-таки обусловлена селективность действия тетрациклина на клетки микроорганизмов, почему происходит увеличение проницаемости бактериальных мембран для тетрациклина по сравнению с мембранами клеток млекопитающих? По этому поводу существует две точки зрения. Некоторые учёные считают, что проницаемость мембран для тетрациклина напрямую связана с изменением его заряда и конформационных свойств при комплексообразовании с ионами металлов (он становится электрически нейтральным и легче растворяется в липидах). Другие полагают, что перенос тетрациклина через мембраны осуществляется специальными белками-переносчиками. Так или иначе, фармакокинетические исследования плазмы крови показали, что 95% тетрациклина, не связанного с белками, находится в форме комплексных соединений кальция и магния. Поэтому выяснение особенностей комплексообразования тетрациклина с катионами металлов играет большую роль для дальнейшего понимания механизмов транспорта тетрациклина в живых организмах.

В литературе имеются сведения, полученные методами рентгеноструктурного анализа, кругового дихроизма и ЯМР, о том, что связывание тетрациклина с ионами металлов способно изменять конформационное состояние молекул тетрациклина. В результате рентгеноструктурных исследований были получены структурные данные (значения длин ковалентных и водородных связей, валентных и пространственных углов) для многих известных производных тетрациклина, широко применяемых в медицине. Это позволило рассчитать пространственную структуру антибиотика. Потенциометрическим методом было установлено, что константы диссоциации протонов гидрохлорида тетрациклина в водных растворах при 25°C составляют $pK_{a1}=3,33$; $pK_{a2}=7,75$; $pK_{a3}=9,68$.

Однако, результаты спектральных исследований комплексных соединений тетрациклина с ионами металлов, полученные с помощью метода кругового дихроизма, противоречивы. Расхождения результатов связаны как с различиями условий проведения экспериментов (рН, ионная сила, концентрации реактивов, состав используемой щёлочи, вид аниона соли комплексообразующего катиона), так и с полным отсутствием информации о кинетических аспектах связывания тетрациклина с ионами металлов.

Кроме того, ряд исследований проводился при физиологически неприемлемых условиях (в диметилсульфоксиде, при крайне высоких рН и т.д). Работ, посвящённых изучению комплексообразования тетрациклина с ионами редкоземельных элементов, крайне мало - они были сделаны методом ЯМР. Методом кругового дихроизма таких исследований не проводилось.

Цель и задачи исследования

Целью нашей работы является выяснение молекулярных механизмов связывания кальция и лантанидов тетрациклином при физиологически активных концентрациях тетрациклина ($\sim 10^{-4}$ М) и оптимальном значении рН $\sim 5,2$.

Исходя из общей цели, в диссертации решались следующие **задачи**:

1. Выявление особенностей комплексообразования тетрациклина с рядом одно-, двух- и трёхзарядных ионов металлов в воде методом кругового дихроизма.
2. Проверка гипотезы об изоморфизме мест связывания кальция и лантанидов (на примере комплексных соединений тетрациклина с кальцием и самарием).
3. Изучение влияния фактора pH на процесс комплексообразования тетрациклина с кальцием и самарием в водных растворах.
4. Кинетическое исследование процесса комплексообразования самария с тетрациклином в водных растворах в изоэлектрической точке (при pH=5,2).
5. Исследование влияния одновалентных катионов на процесс комплексообразования тетрациклина с ионами самария.
6. Регистрация и анализ оптических и ПМР спектров комплексных соединений тетрациклина с ионами лантанидов (для выяснения строения мест связывания ионов металлов).
7. Конформационный анализ пространственной структуры молекул тетрациклина в комплексных соединениях с ионами металлов с помощью ЭВМ и сопоставление результатов расчетов с данными, полученными при исследованиях взаимодействия тетрациклина с ионами металлов методами КД и ЯМР спектроскопии.

Научная новизна работы

1. Обнаружено различие мест связывания ионов кальция и лантанидов молекулой тетрациклина в воде при pH=5,2 (в изоэлектрической точке) в комплексах состава 1:1.
2. В водных растворах при pH=5,2 связывание ионов металлов с молекулами тетрациклина происходит на A-хромофоре при участии трикарбонилметановой группировки.

Для доказательства этих выводов, существенных для выявления механизмов биологического действия антибиотиков ряда тетрациклина,

использовались следующие экспериментальные результаты, полученные впервые методами КД, ЯМР и оптической спектроскопии:

- 1) обнаружены различия спектров кругового дихроизма комплексов тетрациклина с ионами скандия и тяжёлых металлов (стронция, кадмия, лантанидов) и с ионами лёгких металлов (магния, кальция, алюминия) в области длин волн $\lambda \sim 380-420$ нм в комплексных соединениях состава 1:1 при $pH=5,2$ в воде;
- 2) получены кинетические кривые образования комплексных соединений тетрациклина с самарием в воде, свидетельствующие о зависимости кинетики комплексообразования при $pH=5,2$ от типа катиона щелочи (KOH, NaOH, LiOH);
- 3) продемонстрировано влияние ионной силы и pH на кинетику образования комплексных соединений тетрациклина с самарием в воде в области слабых pH ($pK_1 < pH < pK_2$);
- 4) получены и проанализированы электронно-колебательные спектры люминесценции и возбуждения Eu^{3+} в комплексных соединениях тетрациклина с кальцием, стронцием, иттрием, лантаном, гадолинием, лютецием, активированных европием, которые свидетельствуют о низкой симметрии центров связывания катионов металлов.

Кроме того, произведён расчёт и анализ конформационных состояний тетрациклина на ЭВМ и предложены практические методы оценки чистоты препаратов тетрациклина и определения тяжёлых металлов в природных водоёмах при помощи метода кругового дихроизма.

Научно-практическая значимость исследования

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, важны, поскольку иллюстрируют фундаментальные механизмы образования комплексных соединений полидентатных лигандов в электролитах, содержащих многозарядные ионы металлов. Они могут найти применение в биофизике, координационной химии и медицинской биологии, позволяют

приблизиться к пониманию механизмов действия тетрациклина на молекулярном уровне и стимулировать дальнейшие изыскания в этой области. Исследована кинетика и выявлены физико-химические факторы, влияющие на процесс связывания тетрациклина с ионами лантанидов, проведён анализ конформаций тетрациклина в комплексных соединениях лантанидов на ЭВМ. Кинетические исследования процесса комплексообразования показали, что при создании новых комплексов важную роль играют сольватационные факторы: рН, ионная сила, полярность растворителя. Открытый нами эффект замедления процесса комплексообразования тетрациклина с самарием при замене гидроксида калия на гидроксиды натрия или лития, возможно, является частным проявлением общей тенденции взаимодействия одновалентных катионов с хелатами биологических мезо- и макромолекул и многозарядных ионов металлов, и требует дальнейших исследований.

Результаты диссертационной работы имеют важное практическое значение. На их основе предложены спектральные экспресс-методы измерения содержания катионов тяжёлых металлов в природных водоёмах и определения чистоты препаратов антибиотиков тетрациклинового ряда, что делает эту работу интересной не только для биофизиков, но и для экологов, а также специалистов в области медицинской промышленности.

Результаты работы также представляют практический интерес для специалистов, разрабатывающих новые биосенсоры.

Защищаемые положения

1. Введение многозарядных ионов металлов в водные растворы гидрохлорида тетрациклина при рН= 5,2 сопровождается появлением в спектрах кругового дихроизма новой консервативной полосы КД в области длин волн $\lambda \sim 370-420$ нм. Порядок чередования знаков КД компонентов консервативной полосы $\lambda \sim 370-420$ нм зависит от типа катионов металлов, взаимодействующих с молекулой тетрациклина:

- а) связывание ионов натрия, калия, цезия, а также цинка, железа, гадолиния не приводит к существенным изменениям величины эллиптичности в этой области спектра КД;
- б) связывание ионов лёгких металлов: магния, алюминия, кальция сопровождается появлением новой консервативной полосы КД с отрицательным экстремумом при $\lambda = 410$ нм;
- в) связывание ионов тяжёлых металлов (иттрия, стронция и лантанидов) приводит к появлению новой консервативной полосы КД с положительным экстремумом при $\lambda = 415$ нм.
2. В группе комплексных соединений тетрациклина с ионами ряда металлов, исследованных нами в воде при $\text{pH} = 5,2$, наибольшие значения амплитуды эллиптичности наблюдаются в случае взаимодействия с ионами самария (полоса КД положительного знака, $\lambda_{\text{max}} = 415$ нм) и ионами кальция (полоса КД отрицательного знака, $\lambda_{\text{min}} = 410$ нм). Места связывания кальция и лантанидов на А-кольце молекулы тетрациклина различны.
3. Ионная сила водных растворов, pH , а также состав щелочи, используемой для депротонирования гидрохлорида тетрациклина, оказывают воздействие на кинетику комплексообразования гидрохлорида тетрациклина с самарием в воде ($1,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$). Повышение pH в слабокислой области ($\text{pK}_1 < \text{pH} < \text{pK}_2$) не изменяет величину амплитуды полосы эллиптичности в комплексах тетрациклина с кальцием (при $\lambda_{\text{min}} = 410$ нм), но оказывает на нее воздействие в случае комплексов с самарием (при $\lambda_{\text{max}} = 415$ нм): наибольшие значения эллиптичности достигаются в изоэлектрической точке при $\text{pH} \sim 5,2$.
4. Наблюдаемые эффекты открывают возможность создания датчиков для регистрации концентраций кальция и тяжёлых металлов в водных растворах с помощью дихрографического метода.

Апробация работы

Результаты работы были доложены на следующих конференциях, симпозиумах и совещаниях:

- 1) X Всесоюзное совещание "Физические методы в координационной химии". (Кишинев, 1990);
- 2) VIII Всесоюзный симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул. (Новосибирск, 1990);
- 3) VI Всесоюзное Совещание "Спектроскопия координационных соединений".- (Краснодар, 1990);
- 4) Всесоюзная конференция "Современные направления создания и оценки качества готовых лекарственных препаратов антибиотиков и антимикробных веществ". (Москва, 1990);
- 5) V Всесоюзное Совещание "Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах". (Иваново, 1991).

Публикации

Результаты работы, описанной в диссертации опубликованы в шести статьях и пяти докладах на Всесоюзных конференциях, симпозиумах и совещаниях. Список работ прилагается в конце автореферата (стр. 19).

СТРУКТУРА И ОБЪЁМ ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 127 страницах, иллюстрирована 38 рисунками и 2 таблицами. Список литературы содержит 100 источников.

Во введении дана общая характеристика работы, обоснована актуальность темы, сформулированы цели и определены основные задачи исследования, кратко изложены научная новизна и практическая ценность работы.

Первая глава посвящена обзору литературы по исследованиям взаимодействия тетрациклина с ионами металлов. Проанализированы опубликованные результаты исследований комплексных соединений лантанидов с тетрациклином методами ЯМР и рентгеноструктурного анализа. Установлено, что систематических исследований спектров КД тетрациклина с ионами редкоземельных металлов в растворах не проводилось. В связи с этим была выбрана цель данной работы: проведение детальных исследований взаимодействий тетрациклина с ионами металлов с помощью спектров кругового дихроизма, спектров люминесценции и спектров ПМР.

Во второй главе описаны материалы, методы синтеза комплексных соединений тетрациклина с ионами металлов, а также методы исследования, использованные в работе. В нашей работе изучалось комплексообразование гидрохлорида тетрациклина с солями натрия, калия, цезия, магния, кальция, стронция, бария, кадмия, меди, цинка, алюминия, железа, скандия, иттрия и лантанидов в воде, этиловом спирте, диметилсульфоксиде и ацетоне.

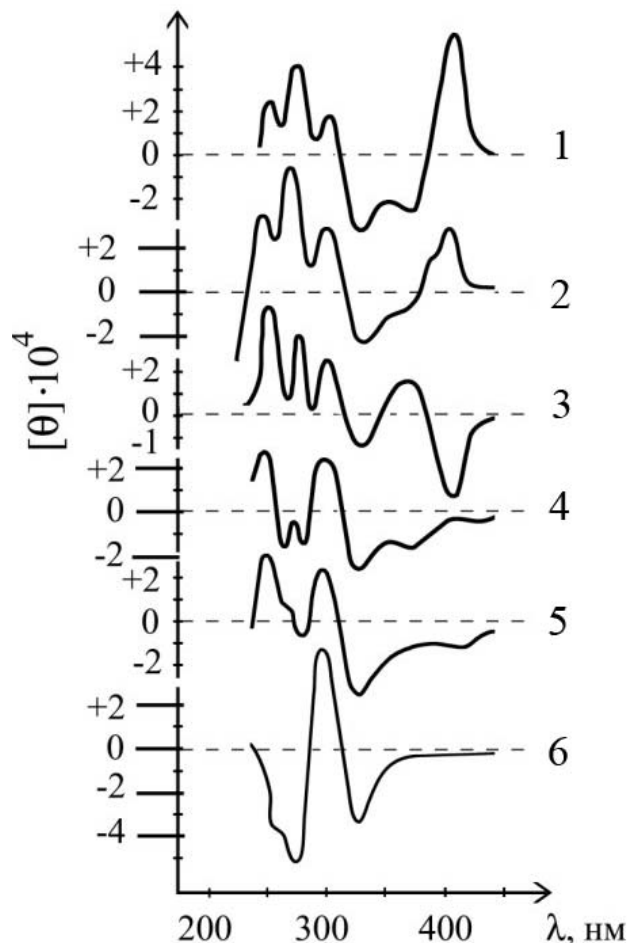
Спектры поглощения получали на спектрофотометре UV-VIS "Specord" (ГДР) при температуре 300°C. **Спектры кругового дихроизма** растворов комплексных соединений регистрировались на дихрографе CD 185 фирмы Jouan (Франция) при температуре 300K°. Образование комплексных соединений регистрировалось по изменению кругового дихроизма в области длин волн $\lambda \sim 245-470$ нм. **Спектры люминесценции** ионов европия (Eu^{3+}) записывали на спектрометре ИСП-51 с длиннофокусной камерой УФ-90 в области ${}^5\text{D}_{0,1,2} - {}^7\text{F}_{0,1}$ переходов люминесценции ионов Eu^{3+} и затем получали денситограммы на микрофотометре. Для этого готовили комплексные соединения тетрациклина с ионами металлов, активированные Eu^{3+} . **Спектры ПМР** получали на спектрометре WM-250 в дейтерированной воде относительно эталона ДСС (диметилсилоксан силапентан натриевая соль сульфокислоты). **Математическое моделирование пространственной структуры комплексных соединений тетрациклина с металлами** осуществлялось на ЭВМ ЕС 1055М методами молекулярной механики с

помощью модифицированной программы В.Г.Дашевского, написанной на Фортране.

В третьей главе описаны результаты исследования спектров кругового дихроизма (КД) гидрохлорида тетрациклина (ТЦ) и его комплексных соединений с ионами металлов.

Связывание молекул ТЦ с ионами ряда металлов в воде сопровождается появлением в длинноволновой области спектра КД ($\lambda \sim 360-420\text{нм}$) дополнительной консервативной полосы. В спектрах растворов свободного тетрациклина такая полоса не наблюдается. С помощью спектров КД было выяснено, что максимальные амплитуды дихроизма консервативной полосы достигаются в случае связывания ТЦ с ионами самария или кальция в водных растворах при $\text{pH} = 5,2$. При этом длинноволновые полосы КД для растворов комплексов ТЦ с самарием и кальцием инверсны по отношению друг к другу. В области полосы дихроизма $\lambda \sim 410-415 \text{ нм}$ наблюдается положительный пик дихроизма для комплекса с самарием и отрицательный – для комплекса с кальцием. Установлено, что депротонирование молекулы ТЦ сопровождается конформационными переходами: в нейтральной и слабокислой областях pH тетрациклин находится в конформации, приближающейся к планарной, а в кислой и слабощелочной области – в «свёрнутой» конформации.

Рис.1. Спектры КД водных растворов гидрохлорида тетрациклина (6) при $\text{pH}=2,0$ и его комплексов с хлоридами металлов [1:1] при $\text{pH}=5,2$: EuCl_3 (1), YCl_3 (2), CaCl_2 (3), MgCl_2 (4), NaCl (5).



При образовании комплексов ТЦ с ионами многозарядных металлов [1:1] в воде при $pH=5,2$ на фоне КОН в спектрах поглощения происходит батохромное смещение наиболее низкочастотной полосы поглощения с $\lambda_{max}=360$ нм до $\lambda_{max}=400$ нм, а в спектрах КД наблюдается появление новой консервативной полосы в области длин волн $\lambda \sim 370-420$ нм (рис.1). Порядок чередования знаков КД компонентов консервативной полосы $\lambda \sim 370-420$ нм, наблюдаемой в указанном диапазоне, зависит от типа катионов металлов, взаимодействующих с молекулой тетрациклина:

- 1) взаимодействие с ионами натрия, калия, цезия, а также цинка, железа, гадолиния не приводят к существенным изменениям спектра КД тетрациклина в этой области;
- 2) взаимодействие с ионами лёгких металлов: магнием, алюминием, кальцием приводит к появлению новой полосы КД с существенным отрицательным пиком дихроизма при $\lambda = 410$ нм – амплитуда дихроизма максимальна для комплексов тетрациклина с ионами кальция;
- 3) взаимодействие с ионами скандия и ионами тяжёлых металлов (иттрия, стронция и лантанидов) приводит к появлению новой полосы КД с положительным пиком дихроизма при $\lambda = 415$ нм. По ряду лантанидов дихроизм велик в комплексах ионов, у которых число 4f-электронов меньше семи (цериевая подгруппа) и увеличено координационное число.

Наибольшие значения амплитуды эллиптичности наблюдаются в растворах комплексов ТЦ с самарием (положительный КД $\lambda_{max}= 415$ нм) и с кальцием (отрицательный КД $\lambda_{min}= 410$ нм) (рис.3).

Инверсия длинноволновой полосы КД для комплексов с кальцием и самарием связана с различием мест связывания катионов этих металлов на А-кольце молекулы тетрациклина (рис.2).

Рис.2. Места связывания самария и кальция в молекуле гидрохлорида тетрациклина при pH=5,2.

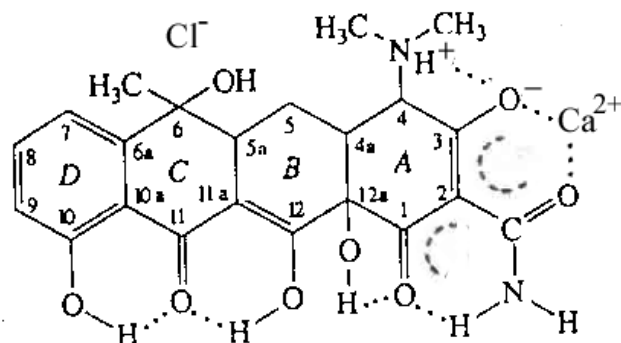
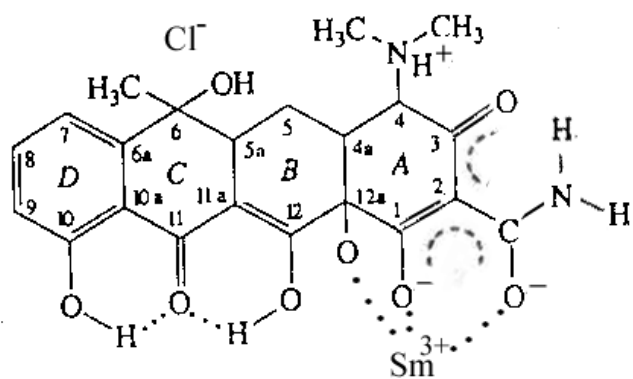
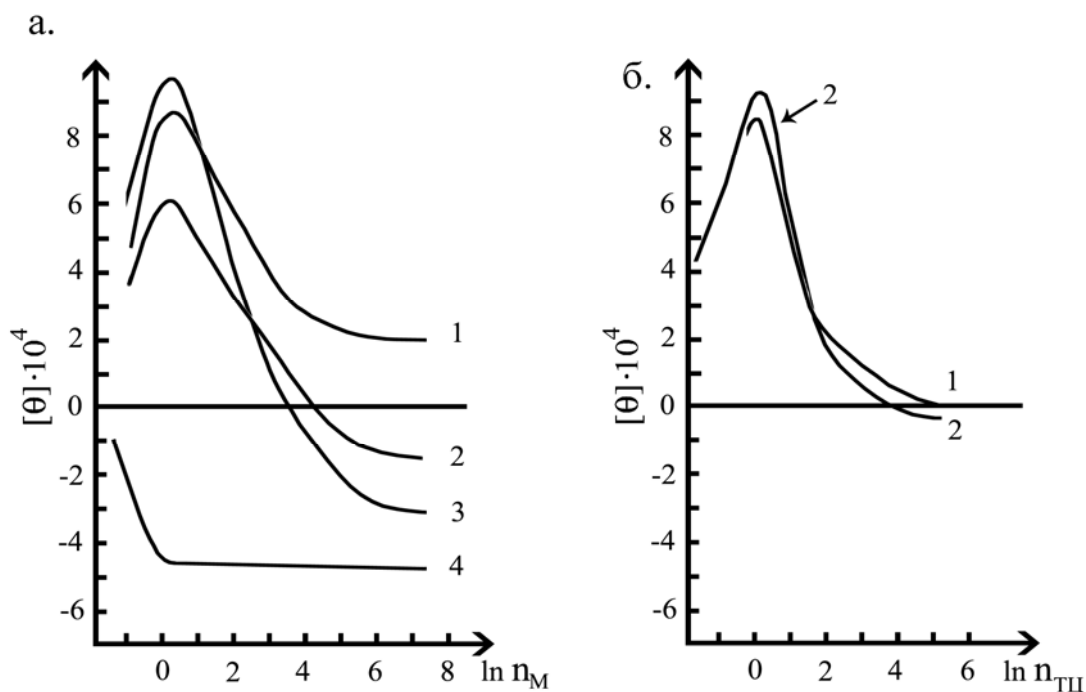


Рис.3. Зависимость значений амплитуды эллиптичности $[\theta]$ для экстремумов КД от стехиометрии комплексов тетрациклина с ионами кальция и самария в воде при pH=5,2.



$[M]$ – концентрация ионов металла, $[TЦ]$ – концентрация гидрохлорида тетрациклина, $n_M = [M]/[TЦ]$, $n_{TЦ} = [TЦ]/[M]$.

- а) многоядерные комплексы, образующиеся при взаимодействии тетрациклина:
 1 - с ацетатом самария ($\lambda = 415$ нм), 2 - с хлоридом самария на фоне одноядерных комплексов хлорида кальция ($\lambda = 410$ нм), 3 - с хлоридом самария ($\lambda = 415$ нм), 4 - с хлоридом кальция ($\lambda = 410$ нм); ($[TЦ] = 1,5 \cdot 10^{-4} M$);
 б) многолигандные комплексы, образующиеся при взаимодействии тетрациклина:
 1 - с ацетатом самария ($\lambda = 410$ нм), 2 - с хлоридом самария ($\lambda = 410$ нм), ($[M] = 1,5 \cdot 10^{-4} M$).

Наибольшие значения дихроизма ($\lambda_{max} = 415$ нм) для растворов комплексов ТЦ с самарием в области слабых кислотных pH: ($pK_1 < pH < pK_2$)

достигаются вблизи изоэлектрической точки при $\text{pH} \sim 5,2$. Повышение pH не влияет на изменение амплитуды эллиптичности θ_{max} полосы КД ($\lambda_{\text{min}} = 410 \text{ нм}$) в комплексах с кальцием. Ионная сила водных растворов, pH , а также тип щелочи, используемой для депротонирования гидрохлорида тетрациклина, оказывают существенное влияние на кинетику комплексообразования ТЦ с самарием в воде ($1,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$). По мере увеличения величины ионных радиусов однозарядных катионов (от лития к калию), присутствующих в водной среде, наблюдается возрастание скорости реакции комплексообразования ТЦ с самарием (рис.4).

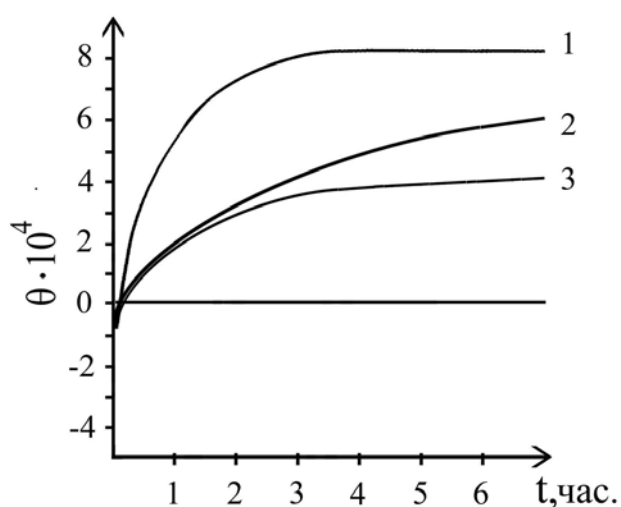


Рис.4. Кинетика образования комплексов тетрациклина с самарием [1:1] при $\text{pH} = 5,2$ ($\lambda = 415 \text{ нм}$) на фоне различных щелочей:
1- KOH, 2- NaOH, 3- LiOH.

Время образования многолигандных комплексов ТЦ с самарием при $\text{pH} = 5,2$ зависит от условий проведения эксперимента и растёт в случае поэтапного титрования лигандом вследствие образования промежуточных комплексов. Соотношение амплитуд эллиптичности θ_{380} ($\lambda = 380 \text{ нм}$) и θ_{320} ($\lambda = 320 \text{ нм}$) в спектрах КД меняется по ряду лантанидов. В начале ряда $\theta_{380} < \theta_{320}$, в середине $\theta_{380} \sim \theta_{320}$, а к концу ряда $\theta_{380} \ll \theta_{320}$. В комплексах конца ряда лантанидов исчезает консервативный характер полосы длинноволнового перехода. Интенсивность консервативной полосы КД, соответствующей длинноволновому переходу, находится в прямой зависимости от диэлектрической проницаемости среды и протонодонорной способности молекул растворителя. По мере уменьшения диэлектрической проницаемости (уменьшения полярности растворителя) максимум длинноволновой полосы

в спектрах поглощения комплексов тетрациклина с самарием смещается к коротковолновому краю спектра, а в спектрах КД происходит уширение консервативной полосы (рис.5):

Рис.5. Длинноволновая область спектров КД растворов комплексов тетрациклина с ацетатом самария ($1,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$) [1:1]:

1 - в этиловом спирте,

2 – в диметилсульфоксиде, 3 – в ацетоне.

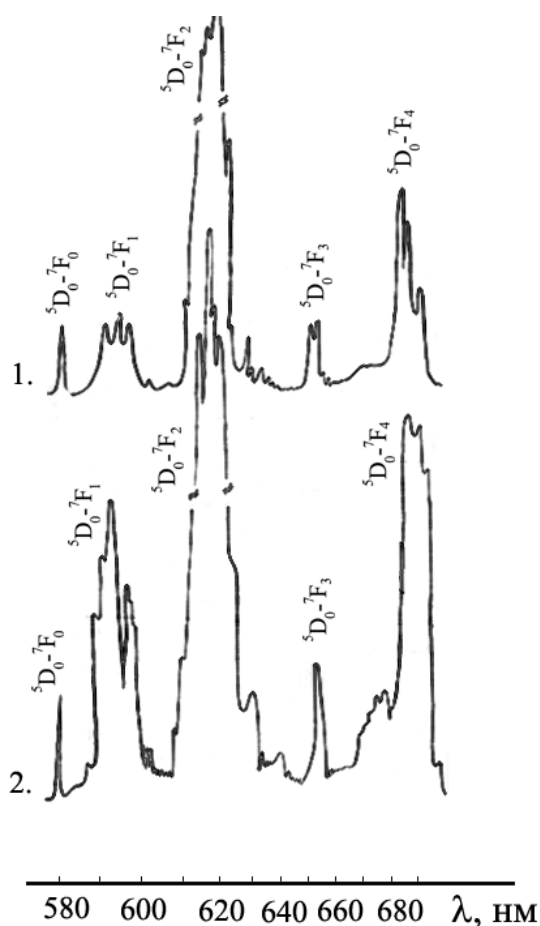
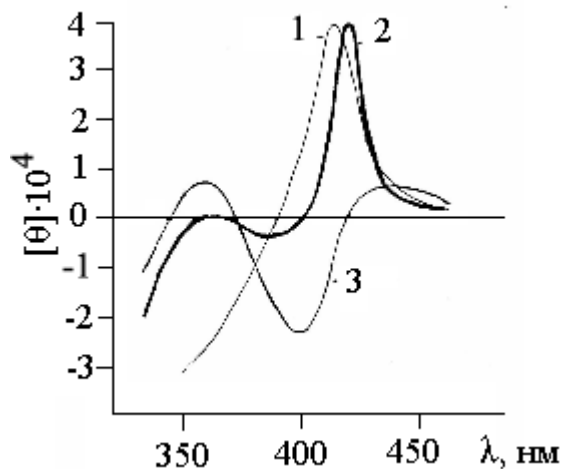


Рис.6. Денситограммы электронно-колебательных спектров люминесценции комплексного соединения тетрациклина с ионами европия:

1 - в воде; 2 – при связывании с лецитиновыми липосомами.

Эти особенности говорят о низкой симметрии комплексов. Спектр кальциевой соли ТЦ, меченной европием, имеет наиболее четкую структуру и напоминает спектры β -дикетонатов европия. Спектры ПМР (протонного магнитного резонанса) комплексных соединений тетрациклина с диамагнитным ионом La^{3+} и парамагнитным ионом Yb^{3+} приведены на рис.7 и рис.8.

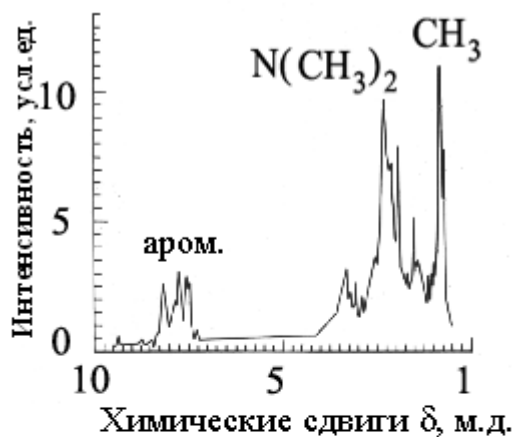


Рис.7. Спектр ПМР раствора комплекса лантана с тетрациклином в D_2O .

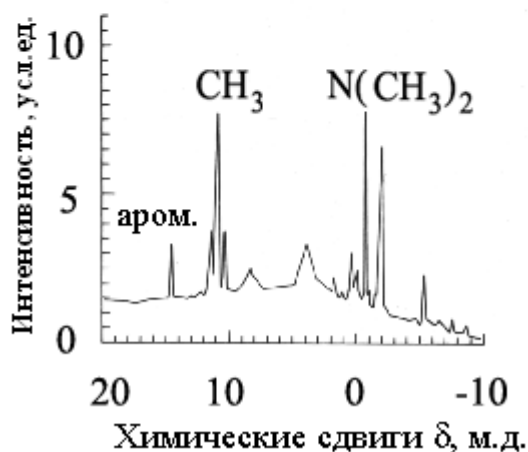


Рис.8. Спектр ПМР раствора комплекса иттербия с тетрациклином в D_2O .

Данные ПМР качественно согласуются с данными, полученными по спектрам КД, свидетельствующими о том, что при $\text{pH}=5,2$ ионы лантаноидов, а также кальция, стронция, иттрия взаимодействуют с трикарбонилметановой группировкой А-кольца молекулы тетрациклина.

Математическое моделирование пространственной структуры комплексных соединений ТЦ производилось с целью оценки относительной стабильности различных конформаций ТЦ при учёте Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и внутримолекулярных водородных связей. Оно осуществлялось на ЭВМ ЕС-1055М методами молекулярной механики с помощью модифицированной программы В.Г. Дашевского, написанной на

Фортране. Сложность построения структурной модели молекулы ТЦ на компьютере состоит в том, что в ее состав входят четыре замкнутых углеродных кольца. При построении моделей за основу брали плоское кольцо D, а затем последовательно замыкали оставшиеся B, C, A кольца, варьируя значения пространственных углов (через 1°), сохраняя неизменными величины валентных углов и длины связей для атомов, находящихся в sp_3 гибридизации. Таким способом было получено 14 потенциально возможных конформаций остова молекулы ТЦ, различающихся по степени «свёрнутости-развёрнутости» молекулы. Для каждой из полученных конформаций суммировались вклады Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий атомов (моделируемых потенциалами Дашевского) в потенциальную энергию системы и производился расчет длин внутримолекулярных водородных связей. Оптимальной конформации тетрациклина соответствовал минимум потенциальной энергии. Обнаружена прямая связь между степенью развернутости молекулы и энергией Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, а также выяснены условия существования «развёрнутых» и «свёрнутых» конформаций молекулы тетрациклина.

В пятой главе обсуждаются возможности применения полученных результатов в медицине, фармакологии и экологии. Наблюдаемые эффекты открывают возможность создания биодатчиков для регистрации концентраций кальция и тяжёлых металлов в водных растворах с помощью портативных дихрографов. Дихрографический метод позволяет определять содержание тяжёлых и легких двухзарядных катионов металлов в воде и может применяться как для проверки жесткости водопроводной питьевой воды, так и для проведения экологического мониторинга содержания катионов кальция и тяжёлых металлов в пресноводных водоёмах, природных карстовых источниках, а также сливах и стоках промышленных предприятий. Этот метод может быть также использован в фармацевтической промышленности для определения чистоты препаратов тетрациклина на основе анализа спектров КД водных растворов антибиотика.

В заключении сформулированы результаты диссертационной работы и подчеркнута её практическое значение.

ВЫВОДЫ

При физиологически активных рН ($\text{pH}=5,2$) образование эквимольных комплексных соединений гидрохлорида тетрациклина с ионами многозарядных металлов (кальция, магния, алюминия, стронция, иттрия и лантанидов) в воде происходит с участием трикарбонилметановой группировки А-кольца молекулы тетрациклина. При переходе от кальция к лантанидам меняется ориентация карбамидной группы относительно остова молекулы тетрациклина, объясняемая различием мест связывания катионов кальция и лантанидов.

Эти выводы сделаны на основании установленных нами экспериментальных фактов и математического моделирования конформаций тетрациклина, а именно:

1. Комплексообразование гидрохлорида тетрациклина с многозарядными ионами металлов сопровождается появлением в спектрах кругового дихроизма новой консервативной полосы в области длин волн $\lambda \sim 370-420$ нм. Порядок чередования знаков компонент этой консервативной полосы КД зависит от типа катионов, взаимодействующих с молекулой тетрациклина:
 - 1) отрицательный пик дихроизма при $\lambda_{\text{min}} = 410$ нм (в комплексах с лёгкими металлами: магнием, алюминием, кальцием);
 - 2) положительный пик дихроизма при $\lambda_{\text{max}} = 415$ нм (в комплексах со скандием и тяжёлыми металлами: иттрием, стронцием и лантанидами).

Связывание ионов однозарядных катионов, а также ионов цинка, железа, гадолиния не приводит к появлению длинноволновой полосы КД.

2. Вблизи изоэлектрической точки ($\text{pH}=5,2$) наибольшие значения амплитуды эллиптичности наблюдаются в растворах комплексов тетрациклина с самарием (положительный КД, $\lambda_{\text{max}} = 415$ нм) и с кальцием (отрицательный КД, $\lambda_{\text{min}} = 410$ нм). Различие знаков дихроизма связано с различием мест связывания кальция и лантанидов на А-кольце молекулы тетрациклина. По ряду лантанидов дихроизм велик в спектрах комплексов ионов цериевой подгруппы (число 4f-электронов меньше семи и велико координационное число).

3. Ионная сила, рН, а также тип щелочи, используемой для депротонирования гидрохлорида тетрациклина, влияют на скорость образования комплексов тетрациклина с самарием, возрастающую по мере увеличения радиусов однозарядных катионов (от Li^+ к K^+), присутствующих в водном растворе.
4. Спектры люминесценции примеси Eu^{3+} в комплексах кальция, стронция, иттрия, лантана, гадолиния и лютеция с тетрациклином, также, как и спектры ПМР, говорят о низкой симметрии центров связывания многозарядных катионов металлов.
5. На основе анализа моделей конформационных состояний молекулы тетрациклина, полученных в результате машинного эксперимента на ЭВМ ЕС-1055М, обнаружена прямая связь между степенью свёрнутости молекулы и энергией Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий.

Проведенная работа открывает возможность создания фотохемодатчиков для регистрации концентраций катионов кальция и тяжёлых металлов в водных растворах с помощью дихрографического метода, в частности, для определения жесткости питьевой воды, для определения чистоты препаратов тетрациклина и для определения наличия ионов тяжёлых металлов в воде.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Грошева В.И. Влияние одновалентных катионов на процесс комплексообразования тетрациклина с ионами самария.// Антибиотики и химиотерапия.- 2005.- Т.50 .- №10-11.- С.3-7 .
2. Грошева В.И. Спектральный контроль содержания примесей металлов в препаратах тетрациклина.//Антибиотики и химиотерапия.- 2006.- Т.51.- № 2.- С.3-7.
3. Бабушкина Т.А., Грошева В.И., Золин В.Ф., Коренева Л.Г. Изучение комплексообразования тетрациклина с ионами лантаноидов методами

- оптической и ЯМР-спектроскопии.// Координационная химия.- 1997.- Т.23.- №9.- С.709-711.
4. Грошева В.И., Золин В.Ф. Спектры кругового дихроизма комплексов тетрациклина с ионами металлов.//Координационная химия.- 1994. - Т.20.- №5.- С.397-400.
 5. Грошева В.И. Влияние депротонирования на конформационное состояние молекулы тетрациклина.//Антибиотики и химиотерапия.- 1992.- Т.37.- № I.- С. 11-14.
 6. Грошева В.И. Применение метода кругового дихроизма для оценки чистоты препаратов тетрациклина.// Успехи в области изучения и производства антибиотиков. – М.: Труды ВНИИА, 1992.- С.148-154.
 7. Грошева В.И. О влиянии природы растворителя на формирование комплексов тетрациклин: самарий.// Тезисы докладов V Всесоюзного Совещания "Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах".- Иваново, 1991.- С.62.
 8. Грошева В. И., Золин В.Ф. Кинетические исследования процесса комплексообразования тетрациклина с ионами РЗЭ методом кругового дихроизма.//Тезисы докладов X Всесоюзного совещания "Физические методы в координационной химии".- Кишинев, 1990.- С.42.
 9. Золин В.Ф., Грошева В.И., Бабушкина Т.А.. ЯМР и оптическая спектроскопия комплексов лантанидов с тетрациклином.// Тезисы докладов VI Всесоюзного Совещания "Спектроскопия координационных соединений".- Краснодар, 1990.- С. 157.
 10. Грошева В.И. Конформационный анализ структуры молекулы тетрациклина.//Тезисы докладов VIII Всесоюзного симпозиума по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул.- Новосибирск, 1990.- Ч.1.- С.117.
 11. Грошева В.И. Применение метода КД для оценки чистоты препаратов тетрациклина.//Тезисы докладов Всесоюзной конференции "Современные направления создания и оценки качества готовых лекарственных препаратов антибиотиков и антимикробных веществ".- М., 1990.- С.50.