

УДК 547.8 : 539.199

*Раиса КРАСНОЩЕКОВА\**, *Ууве КИРСО\**, *Адольфо РИЧЧИ\*\**, *Джованни АЛУННИ БИСТОККИ\*\**, *Джованни ДЕ МЕО\*\**, *Маури ПЕДИНИ\*\**, *Лучано БИНАЛЬЯ\*\**, *Пьер Сир ЖАКИНЬОН\*\*\**

## ГИДРОФОБНЫЕ СВОЙСТВА АЛКИЛЗАМЕЩЕННЫХ ДИБЕНЗО (*a, h*) АКРИДИНОВ

Дибензо (*a, h*) акридины относятся к числу малоизученных соединений класса полиядерных N-гетероциклических углеводов, среди которых есть и органоспецифичные канцерогены [1]. Эти широко распространенные в окружающей среде загрязнители [2] попадают в гидросферу различными путями — при пиролизе азотсодержащих органических материалов, с автомобильными выхлопными газами, с выбросами продуктов сгорания угля, с сигаретным дымом. Дальнейшая их судьба — биотранспорт, биоаккумуляция, окисление, сорбция и др. — в значительной мере определяется их гидрофобными свойствами, которые до сих пор практически не изучены.

В этой связи и предлагаются результаты определения растворимости в воде ряда дибензо (*a, h*) акридина и его алкилзамещенных производных, а также дается оценка их связывающей способности с белком.

### Экспериментальная часть

Объектом исследования служил ряд из шести *n*-алкилзамещенных дибензо (*a, h*) акридинов, синтезированных и очищенных авторами [3]. Реагенты: сывороточный альбумин человека (САЧ) фирмы Reanal (ВР), этанол (95%),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (х.ч.),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (х.ч.); бензол (х.ч.) и *n*-гексан (ч.), дополнительно очищенные активированным углем.

Опыты по определению растворимости в воде проводили при постоянной температуре ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) в круглодонной колбе-реакторе. 1 мг растворенного в этаноле вещества вносили в реактор, этанол упаривали под вакуумом, к сухому остатку добавляли 1700 мл бидистиллята. Содержимое реактора перемешивали с помощью магнитной мешалки в течение 6 ч, а затем давали отстояться 16—18 ч. Раствор фильтровали через двойную зеленую ленту (Filtrak 391, ГДР); арен извлекали из фильтра (1500 мл) трехкратной экстракцией бензолом (60 мл). Экстракт упаривали под вакуумом, сухой остаток растворяли в 2 мл этанола. Концентрацию гетерополиаренов (ГПА) определяли по UV-спектрам (Specord M-40) с помощью калибровочных кривых, используя соответствующую молекулярную экстинкцию ГПА в этаноле.

\* Eesti Teaduste Akadeemia Keemia Instituut (Институт химии Академии наук Эстонии). 200108 Tallinn, Akadeemia tee 15, Estonia.

\*\* Istituto di Chimica, Università degli Studi. (Институт химии при Перуджинском университете. Италия). 06100 Perugia, Italia.

\*\*\* Institut de Chimie des Substances Naturelles C.N.R.S. (Институт химии природных соединений ИЦНИ. Франция). 91190 Gif-sur-Yvette, France.

Для определения связывания ГПА с белком 1%-ный раствор САЧ в фосфатном буфере (рН 7,0) готовили впрок на серию опытов и хранили в холодильнике не более 3 дней.

1 мл раствора ГПА в этиловом спирте (1 мг/мл) вносили в круглодонную колбу, после упаривания растворителя добавляли раствор альбумина.

Три параллельных реактора с пробой устанавливали в специальное устройство и встряхивали (120 колебаний/мин) в течение 4 ч при температуре  $37 \pm 1$  °С. После отстаивания (~1 ч) содержимое реакторов отфильтровывали в условиях, аналогичных условиям определения растворимости в воде. После фильтрования связанный ГПА извлекали из альбумина трехкратной экстракцией *n*-гексаном (общий объем — 10 мл). Экстракт центрифугировали при 7000 г. Концентрацию дибензо(*a, h*)-акридинов определяли по спектрам поглощения их гексановых растворов (Specord M-40). Математическую обработку полученных данных проводили на ЭВМ ДВК-3 Электроника МСО 507 методом наименьших квадратов; в таблице представлена стандартная ошибка.

## Результаты и обсуждение

**Растворимость в воде.** Анализ полученных данных по растворимости в воде ГПА (таблица) позволяет сделать вывод о существенном влиянии *n*-алкильных заместителей на этот процесс.

Как и следовало ожидать, введение метильного заместителя уменьшает растворимость ГПА в воде в 2,5 раза, этильного — в 2 раза, усиливая его гидрофобные свойства, что может быть результатом комплексного воздействия структурных особенностей изученного класса соединений. Удлинение *n*-алкильной цепи заместителя оказывает прежде всего пространственные затруднения растворению ГПА в воде; наряду с этим важен вклад электронных эффектов заместителя — передачи по цепи атомов углерода поляризации  $\sigma$ -связей, обусловленной существованием в молекуле дибензо(*a, h*) акридина скелетного электронодонорного атома азота.

Для количественной оценки гидрофобного вклада заместителя К. Ханш ввел шкалу эмпирических  $\pi$ -констант, представляющих собой разность логарифмов концентрационных распределений в системе *n*-октанол—вода замещенного и незамещенного углеводородов [4]. При этом было показано, что для неполярных углеводородов суммарный вклад алкильных заместителей аддитивен, а значения  $\pi$  для метильных и метиленовых групп постоянны. Однако на примере *n*-пропильбензола обнаружилось, что введение полярного заместителя в *n*-пропильную цепь уменьшает значение  $\pi$  по сравнению с аддитивным за счет образования внутримолекулярной водородной связи, в результате чего растворимость углеводорода в воде возрастает [5]. Очевидно, что дальнейшее удлинение цепи заместителя должно способствовать, благодаря электронодонорным свойствам скелетного азота, образованию внутримолекулярной водородной связи (для  $C_nH_{2n+1}$ , где  $n > 3$ ), повышая тем самым их растворимость в воде, что и подтверждается полученными нами экспериментальными данными.

В пользу этого свидетельствуют результаты анализа роли пространственного эффекта, проведенного с помощью «истинных» стерических констант  $E_s^0$ , рассчитанных В. А. Пальмом путем разделения константы  $E_s$  Тафта на стерическую и гиперконъюгационную составляющие [6].

Как видно из таблицы, вклад стерической составляющей в изменение гидрофобности углеводорода существен до *n*-пропильного заместителя. Далее молекула становится более компактной за счет образования внутримолекулярной водородной связи, и с удлинением заместителя стерический эффект остается практически постоянным.

Электронный эффект заместителя, оцененный индукционными константами  $\sigma^*$  [7], ослабевает с удлинением *n*-алкильной цепи (таблица), свободная электронная пара у атома азота становится более подвижной, а в результате уменьшается растворимость углеводорода в воде. Однако начиная с заместителя *n*-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> индукционное влияние постепенно затухает.

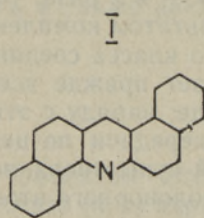
В итоге математической обработки результатов эксперимента нами получено корреляционное уравнение, достоверно (коэффициент Фишера — 5,9) описывающее комплексное воздействие гидрофобного, стерического и электронного эффектов на растворимость изученных углеводородов в воде:

$$\lg S = -9,172 + 1,0350\sigma^* - 0,372E^0 + 0,337\pi, \quad (1)$$

$$n=5, \quad r=0,973, \quad s=0,06.$$

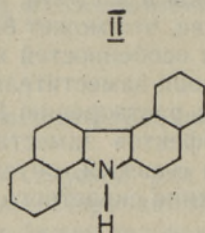
Из вышеизложенного следует, что гидрофобные свойства *n*-алкилдibenzo (*a*, *h*) акридинов определяются особенностями их молекулярной структуры.

В более обобщенном виде это подтверждается сравнением гидрофобных свойств (*S* — растворимость в воде, нМ) ряда полиаренов:



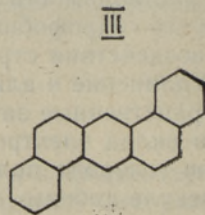
$$S = 2,6 \text{ нМ}$$

дibenzo (*a*, *h*) акридин



$$S = 12 \text{ нМ}$$

дibenzo (*a*, *h*) карбазол



$$S = 110 \text{ нМ}$$

дibenzo (*a*, *h*) антрацен

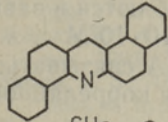
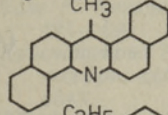
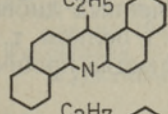
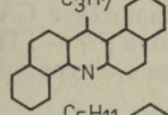
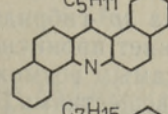
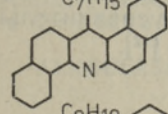
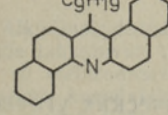
Особенности химической структуры этих соединений обусловлены состоянием скелетного атома азота (I, II) и углерода (III) в центральном цикле: *sp*<sup>2</sup>-гибридизованный азот (I) содержит электронную пару, как уже отмечалось, не задействованную в ароматическом секстете, а потому обладает сильными нуклеофильными свойствами. В соединении II азот *sp*<sup>3</sup>-гибридизован, электронная пара задействована в пятичленном цикле и делокализована по кольцу, электронодонорные свойства ослаблены. И, наконец, соединение III — *sp*<sup>2</sup>-гибридизованный углерод, отсутствие свободной электронной пары.

Гидрофобные свойства неполярных углеводородов, как уже отмечалось, зависят от их способности дополнительно «структурировать» воду [8], содержащую *sp*<sup>3</sup>-гибридизованный атом кислорода с двумя несвязанными электронными парами, т. е. являющуюся сильным нуклеофилом.

Логично, что образование водой дополнительных водородных связей, т. е. ее «структурирование» при соприкосновении с углеводородом, усиливается в ряду: III > II > I, и соответственно в том же направлении изменяется растворимость этих соединений в воде.

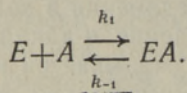
**Связывание с белком.** Введение *n*-алкильного заместителя в дибензо(*a, h*) акридин существенно сказывается на способности углеводорода связываться с белком, экспериментально определенной нами как молярное соотношение ( $\bar{v}$ ) связанного лиганда и белка (таблица). Значения  $\bar{v}$  мы использовали для получения более строгих термодинамических характеристик процесса, представляющих собой константы связывания ( $K_{св}$ ,  $M^{-1}$ ) углеводорода с белком, исходя из следующих теоретических предпосылок.

Взаимосвязь растворимости<sup>1)</sup> в воде ( $S$ , нМ) и связывания<sup>2)</sup> с белком ( $\bar{v}$ , моль ГПА/моль альбумина) со структурой *n*-алкилзамещенных дибензо(*a, h*) акридинов ( $\pi$ ,  $E_s^0$ ,  $\sigma^*$  — константы гидрофобности Ханша, стерические и индукционные константы заместителей соответственно)

Соединение	Мол. масса, г	$S$	$\bar{v} \cdot 10^{-3}$	Константы заместителей		
				$\pi^4$	$E_s^0$ <sup>5)</sup>	$\sigma^*$ <sup>6)</sup>
	279,2	$2,60 \pm 0,58^{3)}$	$0,9 \pm 0,1^{3)}$	0	-0,25	+0,490
	293,2	$1,07 \pm 0,12$	$4,0 \pm 0,5$	0,44	0,00	0
	307,2	$0,69 \pm 0,08$	$30,0 \pm 2,9$	0,88	0,27	-0,100
	321,2	$0,95 \pm 0,12$	$9,0 \pm 0,3$	1,32	0,56	-0,115
	349,2	$1,50 \pm 0,16$	$1,0 \pm 0,1$	2,20	0,60	-0,162
	377,2	—	$0,8 \pm 0,1$	нет	нет	нет
	409,2	$1,17 \pm 0,11$	—	нет	нет	нет

Условия: 1)  $25 \pm 1^\circ C$ , бидистиллят; 2)  $37,0 \pm 1^\circ C$ , фосфатный буфер, pH 7,0, концентрация альбумина — 0,12 мМ; 3) стандартная ошибка; 4—6) данные взяты из [4, 6, 7] соответственно.

Согласно [9], термодинамическое равновесие между исходными веществами и образующимся в системе комплексом белок—лиганд имеет вид:



Здесь  $E$  — белок,  $A$  — субстрат,  $k_1$  и  $k_{-1}$  — константы скорости образования и диссоциации комплекса  $EA$  соответственно. Мерой стабильности образующегося комплекса является  $K_{св}$  лиганда и белка, равная обратной величине его константы диссоциации ( $K_d$ ):

$$K_{св} = (K_d)^{-1} = \frac{[EA]}{[A][E]}, \quad (2)$$

где  $[A]$  — концентрация несвязанного лиганда,  $[E]$  — общая концентрация белка,  $[EA]$  — концентрация связанного лиганда.

В результате ряда преобразований уравнения (2) получаем

$$\bar{v} = \sum_{i=1}^i \frac{n_i K_{св} [A]}{1 + K_{св} [A]}, \quad (3)$$

где  $n$  — количество мест связывания.

Для простейшего случая, когда  $n=1$ , из уравнения (3) для исследованных ГПА нами рассчитаны  $K_{св}$ , значения которых колеблются в зависимости от структуры углеводорода от  $0,05 \cdot 10^2 M^{-1}$  до  $1,10 \cdot 10^2 M^{-1}$ .

Анализ этих результатов показал, что способность ГПА связываться с белком зависит от их гидрофобных свойств и выражается корреляционным уравнением

$$K_{св}^{САЧ} = -(6,06 \pm 0,99) \lg S + (-54,02 \pm 8,90), \quad (4)$$

$$n=5, \quad r=0,96, \quad s=0,16, \quad P > 0,99.$$

Видно, что с уменьшением растворимости в воде изученных дибензо ( $a, h$ ) акридинов повышается их способность связываться с белком, т. е. усиливаются гидрофобные взаимодействия, обуславливающие процесс связывания.

Судя по значениям  $K_{св}$ , дибензо ( $a, h$ ) акридины связываются с САЧ в сто раз слабее, чем соединения ряда дибензо ( $c, g$ ) карбазола [10] — ГПА с  $sp^3$ -гибридизованным азотом в пятичленном цикле, где электронная пара делокализована по всему кольцу.

Можно предположить, что свободная электронная пара  $sp^2$ -гибридизованного атома азота у дибензо ( $a, h$ ) акридинов затрудняет проникновение ГПА в гидрофобный карман белка, ослабляя тем самым возможность их конкуренции с другими биологически активными веществами [11] за места связывания. Это может быть одной из причин сравнительно низкой биологической активности дибензо ( $a, h$ ) акридинов [12].

## Выводы

Растворимость в воде  $n$ -алкилзамещенных полициклических углеводородов с гетероатомом (N) в шестичленном кольце — дибензо ( $a, h$ ) акридинов — очень низка (2,60—0,69 нМ) и определяется гидрофобными, стерическими и электронными эффектами заместителей. Полилинейная корреляция для пяти соединений выполняется с коэффициентом  $r=0,97$  и стандартной ошибкой  $s=0,06$ .

Константы связывания с белком изученных дибензо(*a, h*) акридинов изменяются в диапазоне  $(0,05-1,10) \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ , что обусловлено гидрофобными свойствами гетерополиарена: установлена линейная корреляция для пяти соединений с  $r=0,96$  и  $s=0,16$ .

Пониженная в среднем на два порядка относительно других полиаренов способность связываться с белком может быть одной из причин сравнительно низкой биологической активности дибензо(*a, h*) акридинов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Schurdak, M., Randerath, K. Tissue-specific DNA adduct formation in mice treated with the environmental carcinogen 7H-dibenzo(*c,g*)carbazole. — *Carcinogenesis*, 1985, 6, N 9, 1271—1274.
2. Steward, A. R., Kumar, S., Sikka, H. C. Metabolism of dibenzo(*a,h*)acridine by rat liver microsomes. — *Carcinogenesis*, 1987, 8, N 8, 1043—1050.
3. Jacquignon, P., Viallet, P., Ricci, A., Alunni Bistocchi, G., De Meo, G., Vigo, J., Pedini, M., Binaglia, L. Chimie organique biologique. Sur de nouveaux marqueurs de membranes à structure benzacridine. — *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1981, 292, Ser. II, 675—678.
4. Hansch, C., Fujita, T.  $\rho$ - $\sigma$ - $\pi$  Analysis. A method for correlation of biological activity and chemical structure. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 86, 1616—1626.
5. Hansch, C., Anderson, S. M. The effect of intramolecular hydrophobic bonding on partition coefficients. — *J. Org. Chem.*, 1967, 32, 2583—2586.
6. Пальм В. А. Основы количественной теории органических реакций. Л., 1977, 226—239.
7. Жданов Ю. А., Минкин В. И. Корреляционный анализ в органической химии. Ростов, 1966, 313—316.
8. Sarma, T. S., Ahluwalia, J. C. Experimental studies of the structure of aqueous solutions of hydrophobic solutes. — *Chem. Soc. Rev.*, 1973, 2, 203—232.
9. Чанг Р. Физическая химия с приложениями к биологическим системам. М., 1980, 491—496.
10. Краснощечкова Р., Перэн Ф. Полиядерные гетероциклические углеводороды. III. Связывание дибензокарбазолов с белком. — *Ж. общ. хим.*, 1988, 58, вып. 7, 1540—1543.
11. Kragh-Hansen, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. — *Carcinogenesis*, 1983, 4, N 10, 17—48.
12. Warshawsky, D., Hollinsworth, L., Reilman, R., Strong, D. The metabolism of dibenzo(*a,i*)acridine in the isolated perfused lung. — *Cancer Lett.*, 1985, 28, 317—326.

Поступила в редакцию

27/IV 1990

После переработки

12/IX 1990

Raissa KRASNOSTSJKOVA, Uuve KIRSO, Adolfo RICCI, Giovanni ALUNNI  
BISTOCCHI, Giovanni DE MEO, Maury PEDINI, Luciano BINAGLIA,  
Pierre Cyr JACQUIGNON

#### ALKÜÜLASENDATUD DIBENSO(*a,h*)AKRIDIINIDE HÜDROFOOBSED OMADUSED

Alküülaseendatud mitmetuumaliste heterotsükliiliste süsivesinike — dibenso(*a,h*)akriidiinide lahustuvus vees on kvantitatiivselt määratud substituentide hüdrofoobsete, steriilsete ja elektroonsete efektidega. Lahustuvusest annab tunnistust saadud hea polülineaarne korrelatsioon ( $r=0,97$ ,  $s=0,06$ ). Dibenso(*a,h*)akriidiinide lahustuvus vees on väga madal:  $0,69-2,60 \text{ nmol/l}$ , samuti on väike nende valguga seostumise võime, vastavad konstandid  $K_b$  on määratud vahemikus  $(0,05-1,10) \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ . Uuritud heterotsükliiliste ühendite võime seostuda valguga on ligikaudu 100 korda väiksem kui nende analoogidel — kantserogeensetel mitmetuumalistel süsivesinikel. Sellest võib olla tingitud dibenso(*a,h*)akriidiinide madal bioloogiline aktiivsus. Nimetatud ühendite hüdrofoobsed omadused ja võime valguga seostuda on heas korrelatiivses seoses ( $r=0,96$ ,  $s=0,16$ ).

### HYDROPHOBIC PROPERTIES OF ALKYL-SUBSTITUTED DIBENZO(*a,h*)ACRIDINES

Water solubility of *n*-alkyl-substituted polycyclic hydrocarbons with heteroatom in the six-membered ring — dibenzo(*a,h*)acridines — is very low (0.69—2.60 nM) and is determined by the hydrophobic, steric and electronic effects of the substituents. A poly-linear correlation ( $r=0.97$ ,  $s=0.06$ ) between the hydrophobicity and substituent constants has been established for five compounds of this series.

The ability of the dibenzo(*a,h*)acridines to bind with protein is determined by the hydrophobic properties of the compounds as a linear correlation has been drawn between these parameters ( $r=0.96$ ,  $s=0.16$ ).

The binding constants of the dibenzo(*a,h*)acridines are in the range of (0.05—1.10) · 10<sup>2</sup> M<sup>-1</sup>. These values are two orders lower than those for the other carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. This may be one of the reasons of the relatively low biological activity of the dibenzo(*a,h*)acridines.