

Р. А. Сафиуллин, Ю.Э. Морозова, И. С. Ермоленко,
Е. С. Нефедьев, Э. Х. Казакова, М. К. Кадиров

СУЛЬФОНАТНОЕ И ФОСФОНОВОЕ ПРОИЗВОДНЫЕ КАЛИКС[4]РЕЗОРЦИНАРЕНОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ ФИБРИНА

Ключевые слова: фибриноген, фибрин, антитромботические агенты, каликс[4]резорцинарены.

Исследовано влияние на полимеризацию белка фибрина производных каликс[4]резорцинаренов, содержащих фосфоноацетометокси- и сульфонатные группы на верхнем ободке макроцикла. Процесс полимеризации был изучен методами атомно-силового микроскопии и УФ-спектроскопии. Было показано, что при концентрации каликсрезорцинарена $2,0 \cdot 10^{-6}$ М максимальная скорость полимеризации фибрина в системе фибриноген + тромбин уменьшается на 98,6 %, в случае с фосфонового производного каликсрезорцина, и 96,4 %, в случае сульфонатного производного. При такой концентрации молярное соотношение каликса и фибриногена равняется 6,8 : 1. Дальнейшее подтверждение того, что исследуемые производные каликсрезорцинаренов действуют на начальную стадию полимеризации фибрина, получено с помощью атомно-силового микроскопа. Было установлено, что в присутствии производных каликсрезорцинаренов на поверхности слюды, находящейся в среде реакции, не происходит формирование крупных протофибрилл, а происходит образование поверхностной микрофибриллярной матрицы. Эти эксперименты показывают, что исследуемые производные каликс[4]резорцинаренов являются ингибиторами полимеризации фибрина и могут быть использованы для разработки нового класса антитромботических препаратов.

Keywords: fibrinogen, fibrin, antithrombotic agents, calix[4]resorcinarene.

Calix[4]resorcinarene derivatives bearing phosphonoacetomethoxy- and sulfonate groups at the upper rim of the macrocycle have been studied with respect to their effects on fibrin polymerization. Polymerization process was studied by atomic force microscopy and UV-vis spectroscopy. At concentration of $2.0 \cdot 10^{-6}$ M of the calix[4]resorcinarene the maximum rate of fibrin polymerization in the fibrinogen + thrombin reaction decreased by 98,6%, in case of the phosphonic derivative, and by 96,4%, in case of the sulfonate derivative. At this concentration, the molar ratio of the calix[4]resorcinarene to fibrinogen was 6,8 : 1. Further confirmation that the inhibitor was acting at the initial step of the polymerization was obtained by atomic-force microscopy. No evidence of large protofibrils but formation of microfibrillar matrix on the surface of mica, incubated in the reaction medium, has been shown. These experiments demonstrate that the studied calix[4]resorcinarene derivatives are potential inhibitors of fibrin polymerization and can be used for the design of a new class of antithrombotic agents.

Введение

Фибриноген – гликопротеин с молекулярной массой 340 кДа, состоящий из трех пар полипептидных цепей: А α , В β и γ [1]. Концентрация фибриногена в плазме крови лежит в пределах 2 - 3 мг/мл. Физико-химические свойства молекул фибриногена активно изучаются различными методами в том числе, описанными в работах [2, 3]. Фибриноген участвует в процессах гемостаза. При активации тромбином, от фибриногена отделяются два фибринопептида А. Фибриноген преобразуется в фибрин, который полимеризуется в протофибриллы толщиной в две молекулы фибриногена [4, 5]. Под действием Фактора XIII происходит кроссшивки протофибрилл и образование фибрилл [6, 7]. Из фибрилл формируется трехмерная сеть, являющейся основой для формирования тромба, закупоривающего поврежденную часть сосуда [8-11].

Из-за способности образовывать комплексы по принципу «гость-хозяин» с биологическими молекулами каликса (макроциклические чашеподобные соединения) способны оказывать влияние на многие биохимические процессы и могут выступать в качестве платформы для молекулярного дизайна лекарственных препаратов [12-14].

Антитромботическое действие производных каликса было впервые показано в работе [15]. В работе [16] было показано, что под влиянием пара-сульфонатного производного каликс[8]арена существенно увеличивается тромбиновое время. Влияние метиленбисфосфоновых производных каликс[4]аренов на полимеризацию фибрина было впервые показано в работе [17]. Однако широкий ряд производных каликс[4]аренов до сих пор остается не изучен на предмет антикоагулянтных свойств.

В данной работе были исследованы антикоагулянтные свойства производных каликс[4]резорцинаренов, содержащих сульфонатные и фосфоновые группы, в системе фибриноген + тромбин. Одно из соединений содержит четыре сульфонатные группы, другое содержит восемь фосфоновых групп (Рис. 1).

Экспериментальная часть

Структурные формулы исследуемых производных каликс[4]резорцинаренов (КРА) приведены на Рис. 1.

Названия этих соединений согласно номенклатуре ИЮПАК записываются следующим образом:

1) тетра-натриевая соль 4,6,10,12,16,18,22,24-октагидроксид-5,11,17,23-тетрасульфид-2,8,14,20-

тетрапентилпентацiclo[19.3.1.13,7.19,13.115,19]октакоза-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-додекаена; (КРА-1)

2) 4,6,10,12,16,18,22,24-октафосфоацетометилокси-2,8,14,20-тетраундецилпентацiclo[19.3.1.13,7.19,13.115,19]октакоза-1(25),3,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-додекаен; (КРА-2).

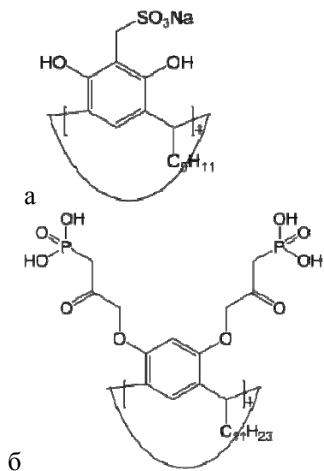


Рис. 1 - Структурные формулы производных каликс[4]резорцинаренов: а) КРА-1; б) КРА-2

Соединение 1 было синтезировано согласно методике, описанной в работе [18], соединение 2 было получено аналогично методикам, описанной в работах [19, 20].

Для исследования полимеризации фибрина и получения фибрин-мономера в раствор фибриногена (EnzymeResearchLaboratories, США) в натрий фосфатном буфере с pH=7.4 и концентрацией 100 ± 10 мкг/мл добавлялись 0,1 НИН единицы активности тромбина (Технология-Стандарт, Россия). Для изучения влияния КРА на полимеризацию фибрина соединения 1 и 2 добавлялись в раствор фибриногена перед добавлением тромбина. Концентрация КРА составляла $2 \cdot 10^{-6}$ М.

Измерения спектров поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях (в диапазоне от 200 до 500 нм) проводилось на УФ-спектрометре Lambda 35 UV/IS (PerkinElmerInstruments) в 1 см кварцевой кювете с корректировкой оптического фона. Все фоновые растворы имели тот же состав, что и исследуемые растворы, но без добавления фибриногена и тромбина. Все измерения проводились при комнатной температуре (23 °C).

Поверхности пластинок слюды 1×1 см² обновлялись непосредственно перед экспериментом. Слюда инкубировалась в растворе фибриногена, тромбина и каликсаренов в течение часа при комнатной температуре (23°C), после чего пластинки промывались в чистом натрий фосфатном буфере и деионизованной воде. Затем слюда сушилась в струе аргона.

Концентрация фибриногена в растворе определялась с помощью УФ-спектроскопии по методике, описанной в работе [21].

Микроскопические исследования были реализованы на атомно-силовом микроскопе (АСМ) MultiMode V (VeecoInstrumentsInc., США) по методикам, описанным в работах [22-25]. Для сканирования поверхностей использовались кремниевые кантилеверы RТESP (VeecoInstrumentsInc., США) с коэффициентом упругости 40 Н/м и радиусом закругления иглы 10-13 нм. Обработка микроскопических изображений производилось с помощью программного обеспечения NanoScope 7.30.

Результаты и обсуждения

Для растворов фибриногена, тромбина и соединений 1 и 2, были получены зависимости изменения спектров поглощения от времени. Зависимости оптической плотности растворов на длине волны 350 нм представлены на **Рис. 2**. При добавлении тромбина в раствор фибриногена оптическая плотность раствора заметно растет с течением времени, данный факт свидетельствует о протекании процесса полимеризации фибрина и формировании фибрин-мономера. Как видно из **Рис. 2**, при наличии КРА-1 и -2 оптическая плотность растворов в течение получаса возрастает незначительно. Так, при концентрации КРА-1 $2 \cdot 10^{-6}$ М в растворе фибриногена (100 ± 10 мкг/мл) и тромбина (0,1 НИН) максимальная скорость полимеризации фибрина уменьшается на 98,6 %. При той же концентрации КРА-2, содержащего четыре сульфатные группы, максимальная скорость полимеризации фибрина уменьшается на 96,4 %. При таких концентрациях молярное соотношение КРА и фибриногена составляло 6,8 : 1. Слабый рост оптической плотности растворов фибрина, содержащих КРА-1 и -2, свидетельствует об отсутствии формирования фибрин-мономера в объеме растворов.

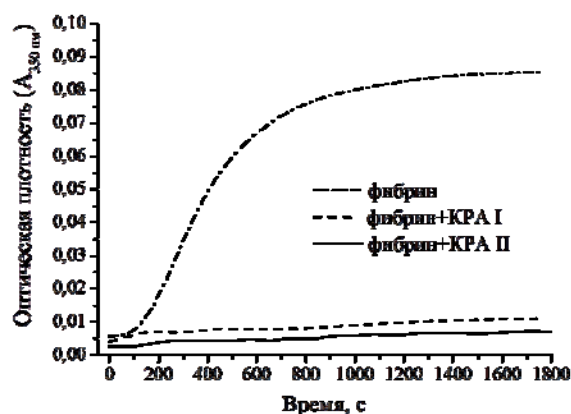


Рис. 2 - Зависимость от времени оптической плотности на длине волны 350 нм растворов фибриногена, тромбина и КРА

Метод АСМ показал, что при инкубации слюды в растворе фибриногена и тромбина на ее поверхности образуются крупные протофибриллы высотой 12 – 14 нм и шириной 100 – 200 нм (**Рис. 3 а**). Однако в присутствии соединений 1 и 2 на поверхности слюды, находящейся в среде реакции,

не происходит формирование крупных протофибрилл. Вместо этого на поверхности слюды образуется микрофибриллярная матрица. Наблюдаемые микрофибриллы имеют высоты в пределах 5 – 6 нм и ширины 40 – 80 нм (Рис. 3 б, в). Данный факт также свидетельствует об ингибировании производными каликс[4]резорцинаренов формирования поверхностно-индуцированного фибрин-мономера.

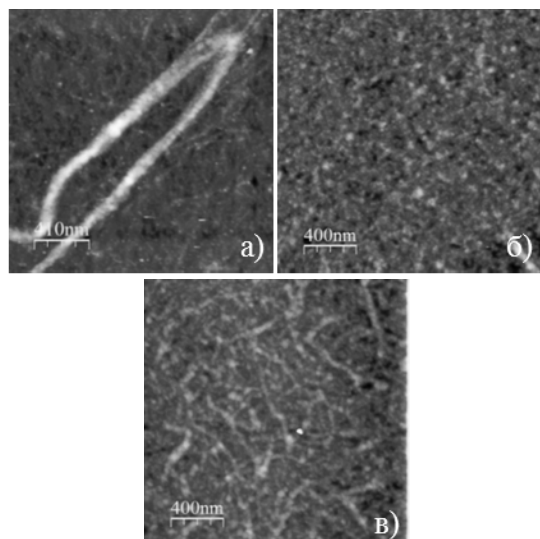


Рис. 3 - АСМ изображение поверхности слюды, инкубированной в растворах: а) фибриноген + тромбин; б) фибриноген + тромбин + КРА-1; в) фибриноген + тромбин + КРА-2

Выводы

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что тетраметилсульфонатный тетрапенилкаликс[4]резорцинарен и октафосфоновая кислота тетраундецилкаликс[4]резорцинарена являются перспективными ингибиторами коагуляции фибрина и могут быть использованы для разработки новых антитромботических препаратов.

Работы выполнены на оборудовании ЦКП «Наноматериалы и нанотехнологии» в рамках ПНР-4.

Литература

[1] M.W. Mosesson, J. Thromb. Haemost., **3**, 8, 1894–1904 (2005);
[2] Ю.Г. Будникова, Т.В. Грязнова, М.К. Кадиров, Е.В. Третьяков, К.В. Холин, В.И. Овчаренко, Р.З. Сагдеев, О.Г. Синяшин, Журнал физической химии, **83**, 11, 2169–2174 (2009);

[3] М.К. Кадиров, Е.В. Третьяков, Ю.Г. Будникова, К.В. Холин, М.И. Валитов, В.Н. Вавилова, В.И. Овчаренко, Р.З. Сагдеев, О.Г. Синяшин, Журнал физической химии, **83**, 12, 1–8 (2009);
[4] B. Blomback, Thromb. Res., **83**, 1–75 (1996);
[5] A.P. Laudano, R.F. Doolittle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 3085–3089 (1978);
[6] W.E. Fowler, R.R. Hantgan, J. Hermans, H.P. Erickson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 4872–4876 (1981);
[7] J.W. Weisel, Y. Veklich, O. Gorkun, J. Mol. Biol., **232**, 285–297, (1993);
[8] H.V. Roohk, J. Pick, R. Hill, E. Hung, R.H. Bartlett, Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, **22**, 1–8 (1976);
[9] W.-B. Tsai, J.M. Grunkemeier, C.D. McFarland, T.A. Horbett, J. Biomed. Mater. Res., **60**, 3, 348–359 (2002);
[10] Y. Wu, M. Zhang, K.D. Hauch, T.A. Horbett, J. Biomed. Mater. Res. A, **85**, 3, 829–839 (2008);
[11] A. Agnihotri, P. Soman, C.A. Siedlecki, Colloids Surf. B. Biointerfaces, **71**, 1, 138–147 (2009);
[12] E. Da Silva, A.N. Lazar, A.W. Coleman, J. Drug. Deliv. Sci. Technol., **14**, 3–20, (2004);
[13] R.V. Rodik, V.I. Boyko, V.I. Kalchenko, Curr. Med. Chem., **16**, 1630–1655, (2009);
[14] A. de Fatima, S.A. Fernandes, A.A. Sabino, Curr. Drug. Discov. Technol., **6**, 151–170, (2009);
[15] K.M. Hwang, Y.M. Qi, S.Y. Liu, T.C. Lee, W. Choy, J. Chen, US Patent, 5,409,959, (1995);
[16] E. Da Silva, D. Ficheux, A.W. Coleman, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., **52**, 201–206, (2005);
[17] E.V. Lugovskoy, P.G. Gritsenko, T.A. Koshel, I.O. Koliesnik, S.O. Cherenok, O.I. Kalchenko, V.I. Kalchenko, S. V. Komisarenko, FEBS J., **278**, 8, 1244–1251, (2011);
[18] E.Kh. Kazakova, N. A. Makarova, A.Yu. Ziganshina, L.A. Muslinkina, A.A. Muslinkin, W. D. Habicher, Tetrahedron Lett., **41**, 10111–10115 (2000);
[19] А.В. Просвиркин, Э.Х. Казакова, В.Д. Хабихер, С.В. Федоренко, А.Р. Мустафина, А.И. Коновалов. ЖОХ, **73**, 970–973 (2003);
[20] J. Drabowicz, D. Krasowska, A. Łopusin'ski, Th.S.A. Heugebaert, Ch.V. Stevens. Top. Heterocycl. Chem., **21**, 103–147, (2010);
[21] I.S. Yermolenko, A. Fuhrmann, S.N. Magonov, V.K. Lishko, S.P. Oshkadyarov, R. Ros, T.P. Ugarova, Langmuir, **26**, 22, 17269–17277, (2010);
[22] И. Р. Низамеев, Р. А. Сафиуллин, Е. С. Нефедьев, М. К. Кадиров, С. Е. Соловьева, И. С. Антипин, Н. Б. Мельникова, Е. Н. Кочетков, Вестник КТУ, **14**, 35–38, (2011);
[23] Р. А. Сафиуллин, Е. Н. Кочетков, Н. Б. Мельникова, С. Е. Соловьева, И. С. Антипин, М. К. Кадиров, Е. С. Нефедьев, Вестник КТУ, **15**, 61–62, (2012);
[24] Р. А. Сафиуллин, Е. Н. Кочетков, Н. Б. Мельникова, С. Е. Соловьева, И. С. Антипин, М. К. Кадиров, Вестник КТУ, **16**, 8, 48–50, (2013);
[25] А. А. Muravev, S. E. Solovieva, E. N. Kochetkov, N. B. Mel'nikova, R. A. Safiullin, M. K. Kadirov, S. K. Latypov, I. S. Antipin, A. I. Kononov, Macrocyclics, **6**, 4, 302–307, (2013).

© Р. А. Сафиуллин - асс. КНИТУ, м.н.с. лаб. ЭХС ИОФХ им. А.Е. Арбузова, saffromer@gmail.com; Ю. Э. Морозова - канд. хим. наук, н.с. лаб. химии каликсаренов ИОФХ им. А.Е. Арбузова; И. С. Ермоленко - Research Professional Senior FSC, Arizona State University, Center for Metabolic and Vascular Biology; Е. С. Нефедьев - д-р физ.-мат. наук, проф., зав. каф. физики КНИТУ; Э. Х. Казакова - д-р хим. наук, проф., с.н.с. лаб. химии каликсаренов ИОФХ им. А.Е. Арбузова; М. К. Кадиров - д-р хим. наук, проф. каф. физики КНИТУ, kamaka59@gmail.com.