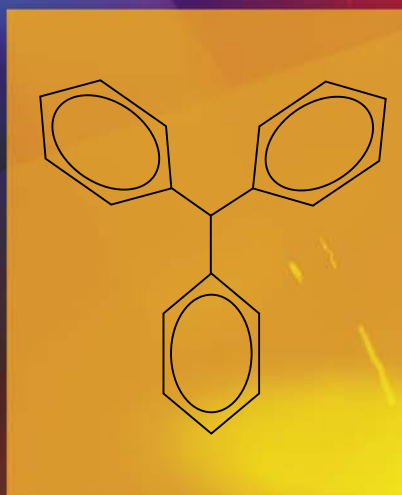
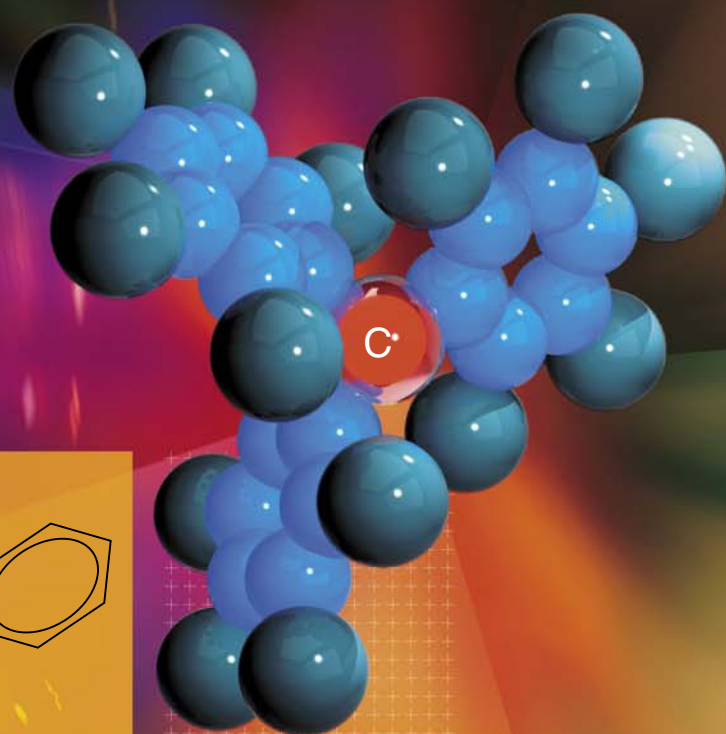


ТРИТИЛЬНЫЕ РАДИКАЛЫ:

111 лет исканий и находок



Ключевые слова:
стабильные органические радикалы,
трители, ЭПР, оксиметрия,
биомедицинские приложения.
Key words: persistent organic radicals,
Trityls, ESP, oxymetry,
biomedical applications

В наши дни даже люди, весьма далекие от химии, знают, что радикал – это не только бескомпромиссный сторонник глубоких преобразований в обществе, но и химическая частица с высокой реакционной способностью. Термин «свободный радикал» можно очень часто слышать при обсуждении проблем заболеваний и старения и пользы антиоксидантов, поскольку такие активные короткоживущие частицы постоянно генерируются в нашем организме в норме и при патологии. Однако мало кто знает, что за последние несколько десятилетий химикам удалось синтезировать ряд стабильных радикалов с долгим периодом «жизни», которые позволили провести настоящую революцию в инструментальных способах исследования вещества. В частности, «эволюционные потомки» первого тритильного радикала, открытого свыше ста лет назад, сегодня начинают активно использоваться в биомедицинских технологиях



ТОРМЫШЕВ Виктор Михайлович – кандидат химических наук, руководитель группы металлокомплексного катализа Института органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН (Новосибирск). Автор 64 научных публикаций



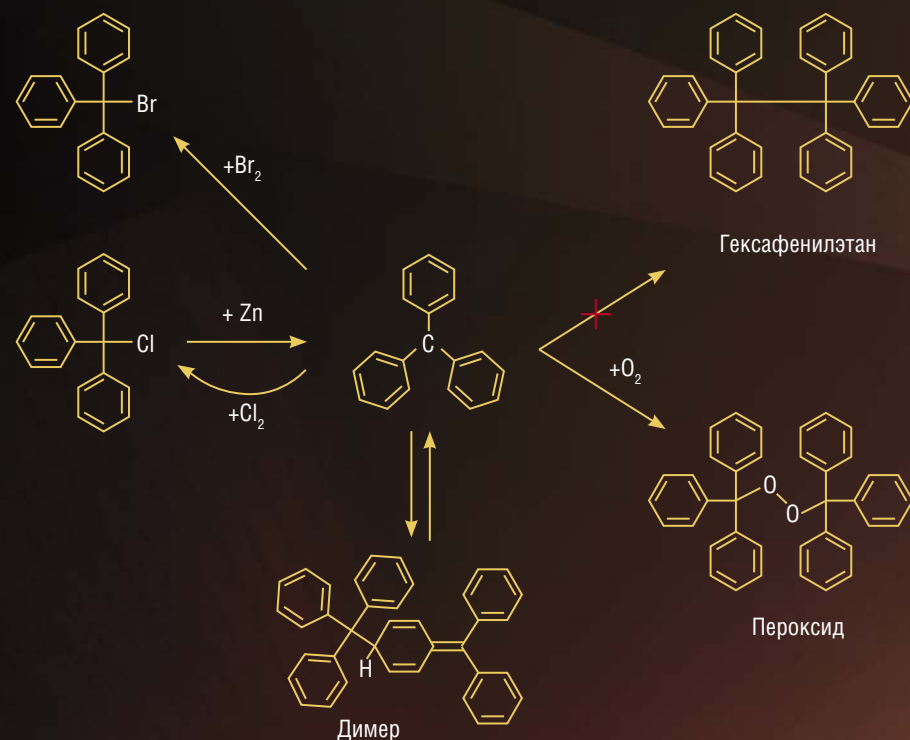
ГРИГОРЬЕВ Игорь Алексеевич – доктор химических наук, директор Института органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН (Новосибирск). Автор свыше 200 научных публикаций, в том числе 16 обзоров и монографий, и 13 патентов

Когда молодой постдокторант М. Гомберг в 1897 г. вернулся в родной Мичиганский университет (Чикаго, США) после стажировки в Германии, он занялся проверкой своих идей в области органической химии, которые появились у него в ходе совместной работы с крупнейшими немецкими химиками того времени.

Гомберг поставил перед собой задачу синтеза неизвестного ранее вещества – *гексафенилэтана*, симметричного углеводорода, в котором к обоим центральным атомам углерода присоединены по три фенильных группы. Считалось, что цели можно достичь с помощью хорошо известной *реакции Вюрца* – взаимодействия активного металла с уже полученным к тому времени *трифенилметилхлоридом*. Однако, к большому удивлению ученого, вместо ожидаемого вещества неизменно получалось нечто иное (впоследствии вещество было идентифицировано как пероксидное соединение – продукт захвата атмосферного кислорода неизвестным участником реакции).

Для обеспечения чистоты эксперимента исследователь полностью устранил «кислородную помеху». Однако опыты, проводимые в инертной атмосфере, принесли новые сюрпризы. Вопреки прогнозу, полученный продукт оказался чрезвычайно реакционноспособным и охотно реагировал с кислородом и галогенами. Так, в реакции с хлором получался исходный трифенилметилхлорид.

Убедившись в том, что столь странные результаты не являются следствием процедурных ошибок, ученый пришел к парадоксальному выводу: он получил ранее неизвестную форму органического вещества с необычным трехвалентным состоянием углерода. Не «целую» молекулу, а *радикал* – обломок молекулы с разорванной химической связью и, соответственно,



Открытый Гомбергом органический свободный радикал трифенилметил $C_{19}H_{15}$ в растворе существует в состоянии динамического равновесия со своим димером. Он легко реагирует с галогенами и кислородом, образуя, соответственно, галогениды и пероксид

с неспаренным электроном. Это открытие полностью противоречило устоявшимся взглядам на строение органических соединений, согласно которым органический углерод всегда должен быть четырехвалентным, а любые другие формы «не существуют в природе» и поэтому не заслуживают рассмотрения.

Тем не менее Гомберг опубликовал результаты своих исследований в статье (Gomberg, 1900), которая вызвала необычайный интерес и нашла быстрое признание у научного сообщества. Фактически этой работой было заложено новое направление, посвященное химии (и спектроскопии) органических радикалов. Открытый радикал был отнесен к категории *тримильных*, а автор открытия получил почетный титул «основателя химии органических свободных радикалов».

Казанский приоритет

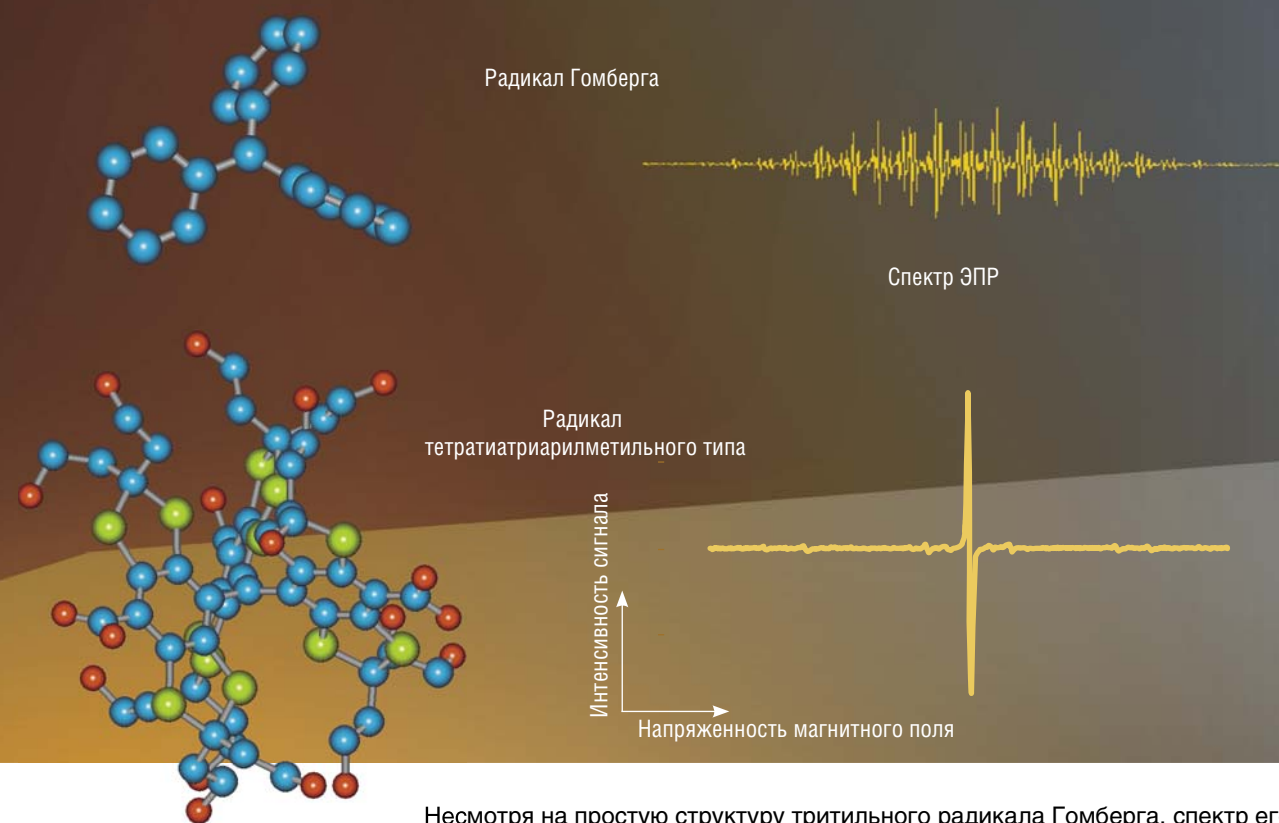
Дальнейший ход событий показал, что радикалы являются «химической нормой», а отнюдь не редкостью. Они принимают участие в очень многих превращениях, от многотоннажного органического синтеза до метаболических процессов, лежащих в основе дыхания растений и животных или трансформации лекарственных препаратов внутри организма. Даже молекулярный кислород – вещество, без которого немислима жизнь, – является радикалом.

Однако увидеть присутствие радикалов совсем непросто. Как правило, свободные радикалы (за рядом

исключений, к числу которых относится и кислород) обладают крайне высокой реакционной способностью – и, следовательно, малыми временами жизни. Поэтому традиционные методы химического анализа непригодны для их обнаружения и уж тем более для установления их строения.

Найти свойственный всем свободным радикалам признак помог случай. В июне 1941 г. молодой научный сотрудник Казанского государственного университета Е. К. Завойский в солях некоторых металлов впервые наблюдает явление *электронного парамагнитного резонанса* (ЭПР). Выяснилось, что все дело в парамагнетизме ионов этих металлов, который обусловлен наличием неспаренных электронов. Если образец поместить в магнитное поле, он обнаруживает способность к резонансному поглощению электромагнитного излучения, что приводит к появлению характерного для него спектра ЭПР.

«Явление электронного парамагнитного резонанса» было внесено в Государственный Реестр научных открытий СССР 12 июля 1944 г. С этой даты и ведется отсчет одного из важнейших событий в физике XX в. – открытие ЭПР как явления и метода спектроскопического анализа. Появление нового метода привело к резкому ускорению научного поиска и способствовало появлению принципиально новых парамагнитных материалов на основе органических радикалов, которым удалось придать необычайно высокую, практически безграничную во времени «живучесть». К их числу в первую



● углерод
● кислород
● сера
Атомы водорода не показаны

Несмотря на простую структуру тримильного радикала Гомберга, спектр его электронно-парамагнитного резонанса весьма сложен. Это вызвано главным образом взаимодействием магнитного момента неспаренного электрона с ядерными магнитными моментами окружающих атомов водорода 1H . Спектральная же картина устойчивого радикала тетраатриарилметильного типа, специально сконструированного для использования в качестве спинового зонда, напротив, предельно проста – спектр вырожден в синглет, а сигнал имеет высокую интенсивность

очередь нужно отнести стабильные нитрокислые радикалы, традиционно изучаемые в Новосибирском институте органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН и являющиеся его своеобразной «визитной карточкой»*.

Просто – о сложном

Но какой же оказалась судьба трифенилметила – родоначальника тримильных радикалов? На первый взгляд она весьма завидна, так как на долгое время этот простейший из тримильных стал излюбленным и весьма полезным модельным объектом многочисленных фундаментальных исследований в области спектроскопии и химической физики. Однако до практических приложений долгое время дело не доходило по двум причинам. Радикал этот не очень устойчив: длительность его жизни обычно не превышает секунды. Кроме того,

* Подробнее о нитрокислых радикалах – в статье В. А. Резникова на с. 58–67.

весьма сложная структура его спектра ЭПР препятствует использованию этого радикала в качестве полезного на практике спинового зонда.

Задачу упрощения вида спектра и придания радикалам высокой устойчивости удалось решить химикам норвежской компании *Nycomed Imaging*, открывшим в конце прошлого века тримильные нового типа, в состав которых входит сера (*тетраатриарилметилы*).

Эти вещества обладают прекрасной растворимостью в воде, устойчивы к действию большинства окислителей и восстановителей, а в спектре ЭПР «демонстрируют» один-единственный, или как принято говорить, *синглетный* сигнал. Будучи крайне узким и поэтому весьма интенсивным, сигнал от этих радикалов обладает способностью «чувствовать» присутствие других парамагнитных веществ в растворе. Их влияние приводит к уширению линии, что позволяет судить о концентрации примеси. В случае кислорода взаимодействие носит обратимый характер: сигнал сужается при удалении кислорода и вновь расширяется при насыщении раствора кислородом. Сочетание этих качеств имеет особую



Водный раствор тетраатриарилметильного радикала № I под кодовым наименованием «Finland Trityl», синтезированного в НИОХ СО РАН, имеет глубокий зеленый цвет, свидетельствующий о чистоте образца. В молекуле этого вещества все 36 ковалентно связанных атомов водорода представлены изотопом дейтерия. Ядерный магнитный момент дейтерия значительно ниже ядерного момента протона – это обстоятельство дает эффект резкого сужения сигнала в спектре ЭПР

ценность при использовании тетраатриарилметильных радикалов в качестве спиновых зондов в биологических и медицинских исследованиях.

В списке потенциально возможных приложений особенно выделяются методы регистрации пространственного распределения кислорода в живых организмах и материалах биологического происхождения – *трехмерная оксиметрия* на основе ЭПР спектроскопии высокого разрешения. Для таких объектов выдвигается дополнительное ограничение: парамагнитные добавки должны быть нетоксичными. Задача эта имеет прямое отношение к диагностике ряда опасных заболеваний, течение которых меняет картину распределения кислорода.

«Трехмерный» кислород

Для реализации этих программ необходимо, чтобы новые парамагнитные материалы были доступны как для фундаментальной науки, так и для прикладных работ. Но это требование не выполнялось, материалы были недоступны. Именно тогда Новосибирский институт органической химии СО РАН приступил к разработке методов синтеза и изучению свойств устойчивых тритильных радикалов разнообразных типов.

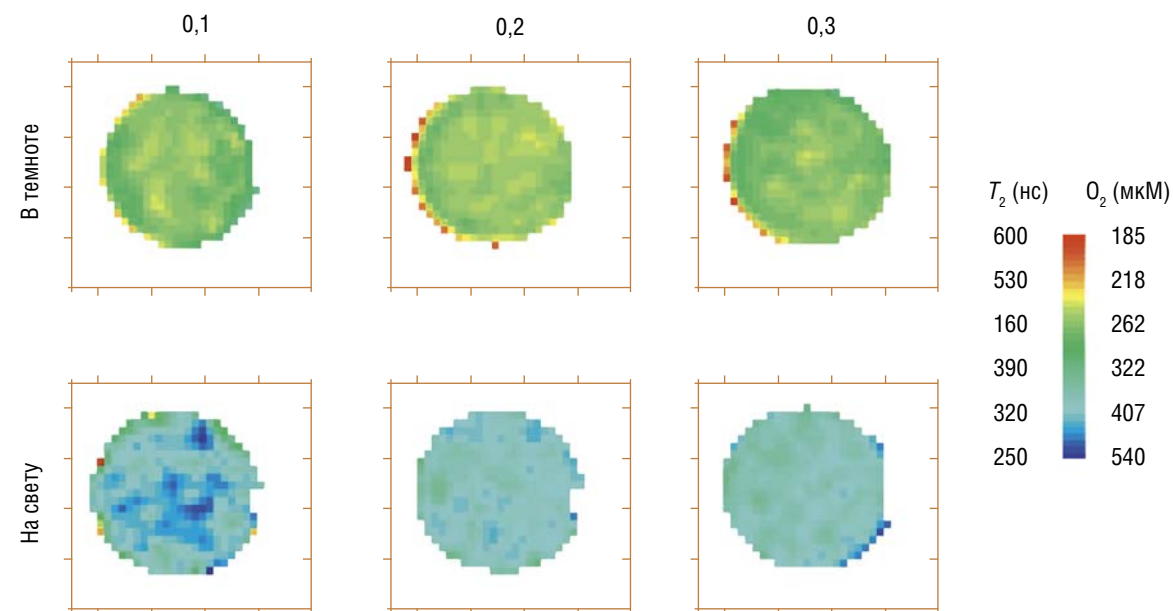
Как правило, такой синтез проводится в несколько стадий, каждую из которых можно осуществить разными способами. И за последнее десятилетие новосибирским ученым удалось определить основные пути синтеза радикалов и оптимизировать все стадии химической трансформации. Были разработаны методики, позволяющие получать радикалы в лабораторном масштабе (десятки граммов), которые отличаются простотой проведения и очистки конечных продуктов.

Синтезированные в институте радикалы тетраатриарилметильного типа демонстрируют высокую устойчивость к большому кругу восстановителей и ферментов. Спектр ЭПР этих радикалов характеризуется синглетным сигналом чрезвычайно малой ширины. Это обстоятельство обеспечивает резкое увеличение чувствительности и разрешения – параметров, играющих ключевую роль в трехмерной оксиметрии биологических объектов.

Будучи полярными и хорошо растворимыми в воде веществами, тритильные радикалы существенно различаются по способности к связыванию с белками и липидами. Так, радикал типа I, впервые синтезированный исследователями *Nycomed*, обладает сравнительно высокой склонностью к образованию связанных состояний с высокомолекулярными биополимерами и поэтому характеризуется более высокой токсичностью. Это обстоятельство препятствует его широкому применению в экспериментах непосредственно на теплокровных организмах, однако не создает затруднений для исследований в клеточных культурах или применительно к микроорганизмам.

Недавно новосибирские исследователи совместно с биофизиками из института *Technion* (Хайфа, Израиль) разработали новую методологию построения образа трехмерного распределения кислорода, генерируемого живыми клетками цианобактерий. При этом использовался один из методов импульсной ЭПР-спектроскопии, которым определяется характерное время спин-спиновой релаксации. Такие измерения можно проводить не только для всего образца в целом, но и для любого его участка с высоким пространственным разрешением (не хуже 0,1 мм). Просканировав весь объект, можно получить трехмерную картину распределения в нем растворенного кислорода.

Уровень плоскости «среза» (мм) ото дна сосуда:

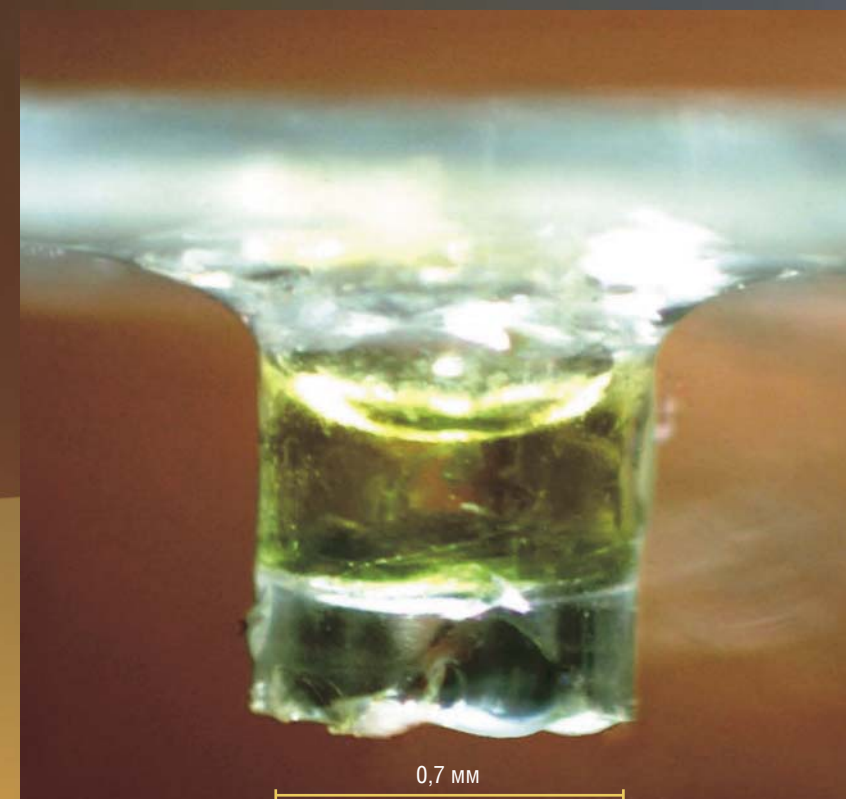


Этот микрореактор открытого типа содержит водный раствор тритильного радикала типа I, в котором находится суспензия сине-зеленых водорослей – фотосинтезирующих цианобактерий.

О фотосинтетической деятельности этих организмов, сопровождающейся выделением кислорода, можно судить по горизонтальным сечениям 3D-образов распределения кислорода в реакторе (*вверху*). В темновом режиме концентрация кислорода почти одинакова по всему объему реактора и приблизительно соответствует природной норме – состоянию насыщения атмосферным воздухом.

При освещении сосуда фотосинтетическая деятельность цианобактерий приводит к росту концентрации кислорода и неравномерному его распределению по объему.

По: (Halevy et al., 2010)





Новый инструментарий, основанный на использовании спектроскопии ЭПР, обладает высокой чувствительностью по отношению к кислороду – порядка 1 мкМ. Он является удачным дополнением к ныне существующим методикам, базирующимся на потенциометрических измерениях, эффектах флуоресценции и фосфоресценции.

Тритил для оксиметрии in vivo

В этом месте, замыкая своеобразный круг, наш рассказ возвращается в исходную географическую точку. В стенах Университета Чикаго в рамках междисциплинарной программы, выполняемой с участием НИОХ СО РАН при поддержке Национального института здоровья США, сегодня проводится блок медико-диагностических исследований при использовании еще одного тритильного радикала – типа II.

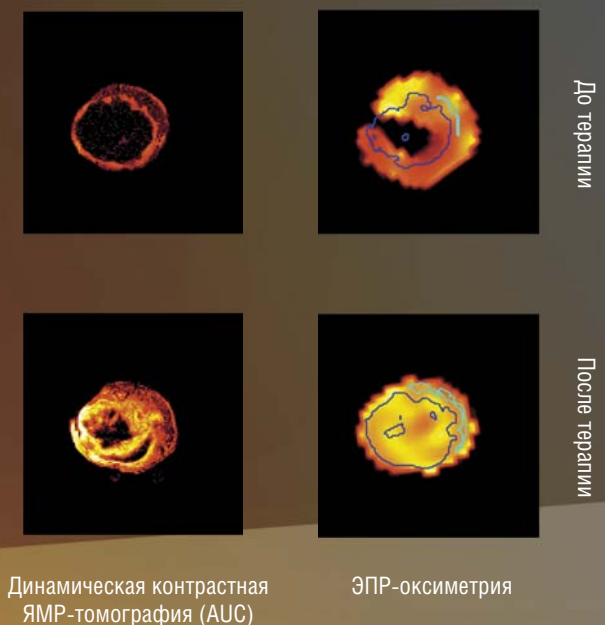
В отличие от радикала типа I, этот сильнополярный тритил оказался нетоксичен в опытах с теплокровными животными. Это обстоятельство оказалось очень важным для биомедицинских исследований злокачественных новообразований, характерной чертой которых, как известно, является внутриопухолевая гипоксия (пониженная концентрация кислорода), положительно связанная с ростом опухоли. Поэтому на основе безопасного для живого организма тритила типа

II началась разработка инструментального диагностического метода для определения области локализации злокачественных опухолей во время курса лечения средствами химио- и радиотерапии.

В качестве терапевтического средства воздействия на опухоль была выбрана радиационно-индуцируемая генная терапия – новое направление, сочетающее высокую эффективность с направленным воздействием на пораженные участки. Суть этой терапии в том, что генетически модифицированный аденовирусный вектор вызывает в инфицированных клетках экспрессию гена, приводящего к наработке α -фактора некроза раковых тканей. Кроме того, α -фактор обладает ярко выраженным *антивазкулярным эффектом*, т.е. способностью разрушать кровеносные сосуды, питающие опухоль. А поскольку деятельность вектора «запускается» облучением раковых клеток значительной дозой радиации, эффект радиационной терапии подкрепляется уменьшением кровоснабжения опухолевых участков.

Использование чувствительного к концентрации кислорода тритила II позволяет контролировать ход лечения путем генерации трехмерных образов распределения кислорода и их последующего анализа. Предлагаемая методика может сочетаться с традиционными методами магниторезонансной томографии.

Новый подход был апробирован на лабораторных тимус-эктомированных мышках с раком простаты.



Животные были обследованы по «радикальной» методике, после чего половина из них была подвергнута комплексной генно-радиационной терапии. Через три дня были вновь сняты трехмерные картины распределения концентрации кислорода в области простаты у особей из экспериментальной и контрольной групп.

Судя по этим данным, у мышей, подвергавшихся терапевтической процедуре, произошло видимое сокращение размеров опухоли. С помощью ЭПР-контроля удалось заметить и то обстоятельство, что антивазкулярный эффект, первоначально вызываемый действием аденовирусного вектора, по мере уменьшения опухоли исчезает, и кровоснабжение анализируемого участка в конечном итоге заметно усиливается.

Тритильные радикалы прошли долгий путь от открытия до применения в качестве кислород-чувствительного зонда в биомедицинской диагностике. И разумеется, круг возможных применений этих уникальных соединений далеко не исчерпывается исследованиями в области 3D-оксиметрии высокого разрешения. Например, они оказались весьма полезными в исследованиях особенностей диффузии в микрогетерогенных системах, определении пространственной структуры биополимеров, выявлении факторов и глубины стресса у культурных и дикорастущих растений.

В программе исследований НИОХ СО РАН особое место занимают радикалы, характеризующиеся

* Подробнее – в статье В. А. Резникова на с. 58–67.

В Университете Чикаго были проведены сравнительные исследования насыщенности кислородом биологических тканей с помощью традиционных методов ядерного магнитного резонанса и новым методом ЭПР-оксиметрии, основанном на использовании тритильного радикала. Слева – измеренные разными методами наиболее информативные сечения трехмерных образов распределения концентрации кислорода в области простаты у больных раком лабораторных мышей, показывающие эффективность комплексной генно-радиационной терапии

отчетливо детектируемым откликом спектра ЭПР на изменение кислотности среды – это так называемые рН-чувствительные спиновые зонды*. В последние годы сотрудниками института разработаны подходы к синтезу радикалов нитроксильного ряда, способных обеспечить надежное и высокочувствительное зондирование кислотности среды в широком диапазоне. Накопленный в институте опыт по дизайну нитроксильных рН-зондов разумно перенести на тритилы.

Важность этих работ в том, что с помощью подобных соединений можно будет регистрировать очень малые изменения кислотности среды в значимом для медицины и биологии диапазоне (рН 6,5–7,5). Возможность локализации в живом организме участков с аномальными параметрами кислотности даст основу для надежно выявления разнообразных патологий.

Литература

Григорьев И. А., Полюенко Ю. Ф., Войнов М. А. рН-чувствительные нитроксильные радикалы: структурные требования, проблемы молекулярного дизайна и синтетические подходы // *Химия ароматических, гетероциклических и природных соединений (НИОХ СО РАН 1958–2008 гг.)*. Новосибирск, 2009. С. 501–535.

Gomberg M. An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl // *J. Am. Chem. Soc.* 1900. V. 22. № 11. P. 757–771.

Halevy R., Tormyshev V., Blank A. Microimaging of Oxygen Concentration near Live Photosynthetic Cells by Electron Spin Resonance // *Biophysical Journal*. 2010. V. 99. P. 971–978.