

ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ^1H ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С АНТИБИОТИКОМ ТОПОТЕКАНОМ

© А. А. МОСУНОВ, В. В. КОСТЮКОВ, М. П. ЕВСТИГНЕЕВ

Севастопольский национальный технический университет, Украина;
e-mail: max_evstigneev@mail.ru

В настоящей работе с использованием данных ^1H ЯМР-спектроскопии проведен анализ гетероассоциации антибиотика топотекана (ТРТ) с ароматическими биологически активными соединениями (БАС): кофеином, мутагенами бромистым этидием и профлавином, антибиотиком дауномицином, витаминами флавин-моноклеотидом и никотинамидом. Получены равновесные константы гетероассоциации и индуцированные химические сдвиги протонов БАС в составе комплексов. Установлено, что комплексообразование ТРТ-БАС носит характер стэкинга хромофоров, дополнительно стабилизируемого в случае профлавина межмолекулярной водородной связью. Проведен расчет основных составляющих свободной энергии Гиббса реакции комплексообразования, выделены факторы, стабилизирующие и дестабилизирующие гетерокомплексы молекул.

Ключевые слова: топотекан; гетероассоциация; стэкинг; свободная энергия Гиббса.

Ароматические биологически активные соединения (БАС) в настоящее время широко используются в качестве компонентов лекарственных препаратов для лечения многих видов заболеваний [1, 2]. Благодаря наличию плоского хромофора в структуре ароматических БАС механизм их биологического действия часто связывают с интеркаляцией в ядерную ДНК с последующим нарушением жизненно важных клеточных процессов [3]. Кроме этого, плоская структура хромофора способствует эффективному комплексообразованию ароматических молекул в водном растворе, которое характеризуется энергетически выгодной стопочной ориентацией хромофоров в составе комплексов (стэкинг-ассоциация) и проявляется в регистрируемых различными экспериментальными методами процессах само- и гетероассоциации ароматических БАС [4, 5]. Отмеченное свойство ароматических соединений оказывать свое медико-биологическое действие путем связывания с ДНК и одновременно образовывать комплексы друг с другом в физиологической среде (гетероассоциация), рассматривается в настоящее время как один из наиболее значимых молекулярных механизмов, лежащих в основе регистрируемого *in vivo* или *in vitro* изменения биологической активности ароматических БАС в присутствии других ароматических соединений (т.н. интерцепторный механизм действия) [4, 5]. По этой

причине изучение гетероассоциации имеет большое значение для понимания механизмов биологических эффектов, наблюдаемых при совместном использовании различных ароматических препаратов.

Антибиотик топотекан (ТРТ), используемый в клинической практике для лечения онкологических заболеваний, является одним из представителей группы ароматических соединений, для которого наблюдается выраженное изменение биологического эффекта при совместном использовании с другими ароматическими молекулами, в частности, кофеином [6] и витамином B_2 [7], причем авторы процитированных работ связывают этот эффект именно с процессами комплексообразования с ДНК и гетероассоциацией. Помимо кофеина и витамина B_2 , существует также ряд свидетельств того, что активность ТРТ может изменяться в присутствии и других ароматических БАС [8], однако удовлетворительного объяснения этому факту дано не было. Недавно для системы ТРТ-кофеин нами была впервые продемонстрирована возможность количественного описания изменения биологического отклика ТРТ при добавлении кофеина на основании известных значений равновесных констант комплексообразования с ДНК и гетероассоциации [9]. Аналогичная взаимосвязь биологического отклика некоторого ароматического БАС1 в присутствии другого БАС2 и способ-

ности к гетероассоциации БАС1-БАС2 была ранее обнаружена для антиопухолевых антибиотиков доксорубина и митоксантрона в присутствии кофеина [5], а также ароматических канцерогенов в присутствии хлорофиллина [10]. Учитывая наличие плоского ароматического хромофора в структуре ТРТ, а также способность антибиотика к сильной агрегации за счет π -стэкинга в водном растворе [11], можно предположить, что гетероассоциация ТРТ-БАС является одним из возможных механизмов, наблюдаемого медико-биологического синергизма при их совместном использовании. Однако, необходимо отметить, что до сих пор исследования гетероассоциации ТРТ-БАС не проводились за исключением единственной известной нам работы [6], в которой гетероассоциация с кофеином (в контексте интерцепторного механизма) была изучена методом спектрофотометрии и микрокалориметрии, при этом данных о константе гетероассоциации получено не было.

Целью настоящей работы является исследование гетероассоциации ТРТ с типичными представителями группы ароматических БАС: кофеином (CAF), мутагенами – бромистым этидием (EB) и профлавином (PF), антибиотиком дауномицином (DAU), витаминами – флавин-моноклеотидом (FMN) и никотинамидом (NMD). Параметры гетероассоциации ТРТ-CAF были определены ранее [9], однако в настоящей работе для этой системы (как и для всех остальных) был дополнительно проведен полный энергетический анализ гетероассоциации.

Материалы и методы

ЯМР-эксперимент

Исследуемые соединения (рис. 1) были приобретены у фирмы Sigma (США), за исключением топотекана (фирма Molekula, Великобритания). Все они растворялись в D_2O с изотопной чистотой 99,95% (Sigma) и лиофилизировались. Растворы готовили путем добавления взвешенного количества образца в дейтерированный 0,1 М фосфатный буфер (рD 7,1), содержащий 10^{-4} моль/л EDTA. Одно- и двумерные спектры 1H ЯМР измерены на спектрометре “Bruker DRX” с резонансной частотой 500 МГц. Измерения протонных химических сдвигов молекул в смешанном растворе выполняли при температуре 298К, поддерживая постоянной концентрацию ТРТ (0,77 мМ) на уровне, соответствующем пределу растворимости антибиотика в выбранных условиях,

и варьируя концентрацию БАС в диапазоне их растворимости.

Отнесение резонансных сигналов протонов молекул в смешанных растворах производилось при помощи двумерных ROESY и TOCSY спектров. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2 диметил-2-силапентан-5-сульфоокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония.

Построение структур комплексов молекул

Методика структурного анализа в целом соответствует методике, использованной нами ранее для исследования различных комплексов биомолекул [12, 13]. Техника построения структур вкратце заключается в следующем. Расчет пространственных структур 1 : 1 гетерокомплексов всех исследованных молекул производился методами молекулярной механики с использованием программы X-PLOR (версия 3.851 [14] с силовым полем Charmm22). К сожалению, межмолекулярных nOe кросс-пиков ни в одной из исследуемых систем ТРТ-БАС, на используемом в работе спектрометре (500 МГц) не наблюдалось, что связано с относительно небольшим вкладом реакций гетероассоциации в суммарное динамическое равновесие в растворе. Начальная структура 1 : 1 комплексов была построена исходя из значеный магнитного экранирования $\Delta\delta_c = \delta_m - \delta_c$, рассчитанного из кривых титрования. Моделирование водно-солевого окружения взаимодействующих комплексов осуществлялось с помощью 1100 молекул воды TIP3P, расположенных в кубическом боксе. Топология всех молекул и параметризация их атомных взаимодействий была создана в программе XPLO2D [15], при этом использовались кристаллические структуры из PDB банка данных. Параметры невалентных взаимодействий соответствовали силовому полю Charmm22. Квантово-механический расчет парциальных зарядов на атомах всех исследованных веществ проводился в программе Gaussian 03W [16], на уровне теорий DFT (B3LYP) и MP2 в базисе 6-31G*.

Расчет параметров гетероассоциации

Расчет параметров комплексообразования ТРТ-БАС по протонам БАС в настоящей работе проводился в рамках двухкомпонентной модели [17], строго учитывающей специфические эффекты, которые возникают при само- и гетероассоциации более высокого порядка, чем димеры. Входными данными для расчета были экспериментальные кривые (рис. 2),

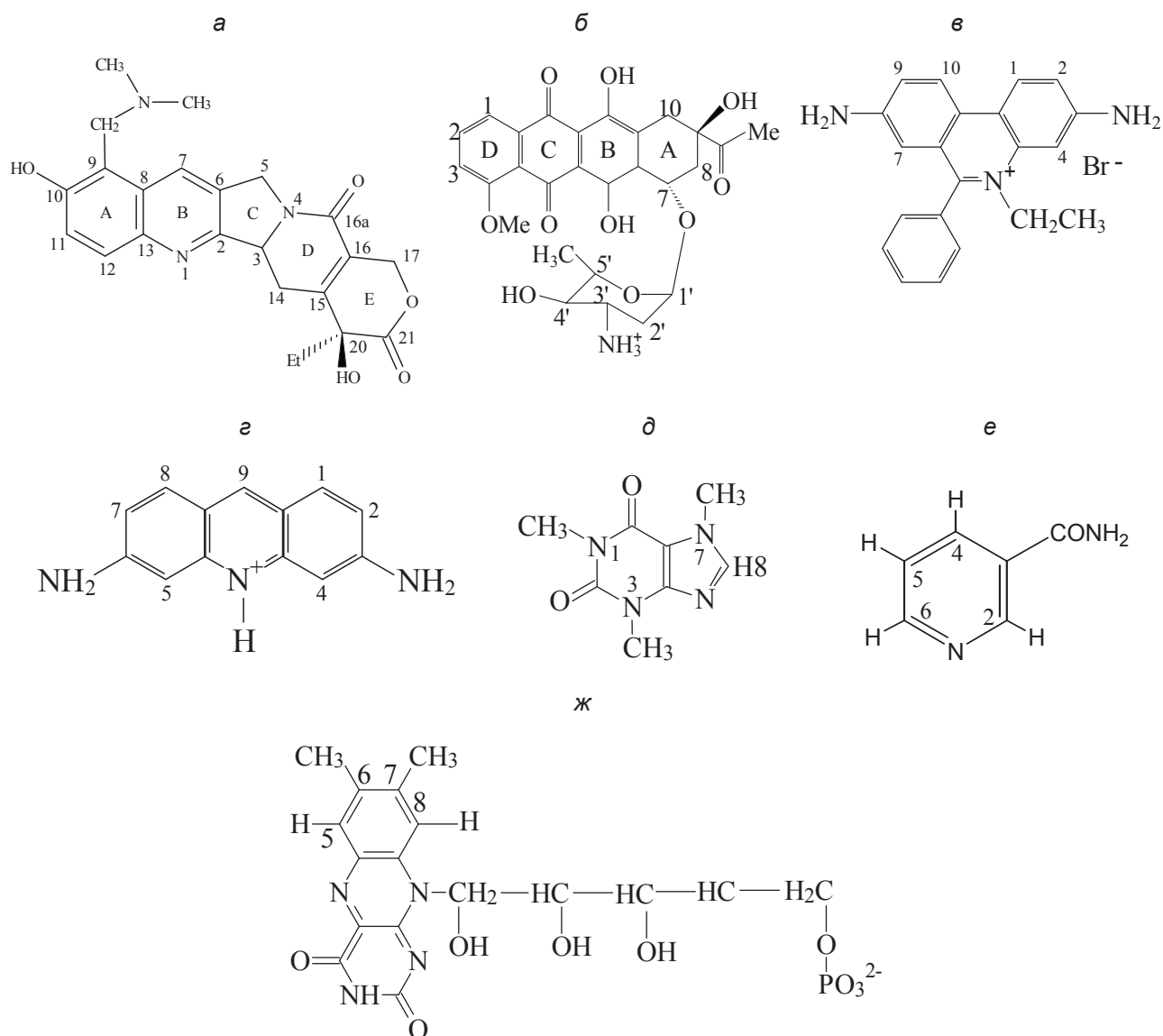


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых молекул БАС: а) лактонная форма топотекана; б) дауномицин, в) бромистый этидий, г) профлавин, д) кофеин, е) никотинамид, ж) флавиномононуклеотид

а также параметры самоассоциации молекул БАС – из работы [4]. Искомыми параметрами, определяемыми из условия минимума функции невязки (суммы квадратов отклонения расчетных от экспериментальных значений химических сдвигов), были константы гетероассоциации K_C и индуцированные химические сдвиги в составе комплексов (δ_c). Алгоритм проведения вычислительного эксперимента в точности соответствует стандартной схеме анализа гетероассоциации, детально описанной в работах [4,18]. Значения констант гетероассоциации рассчитывали по каждому протону, далее определяли среднее и погрешность среднего.

Методика энергетического анализа гетероассоциации

Расчет различных составляющих полной энергии Гиббса реакции гетероассоциации ТРТ с ароматическими БАС выполняли в соответствии с методикой, использованной ранее для решения аналогичной задачи для других типов гетерокомплексов [19]. Вкратце методика энергетического анализа заключается в следующем.

Реакция (1) нековалентного комплексообразования молекул X и Y , приводящая к образованию гетерокомплекса XU , характеризуется равновесной константой комплексообразования K и изменением свободной

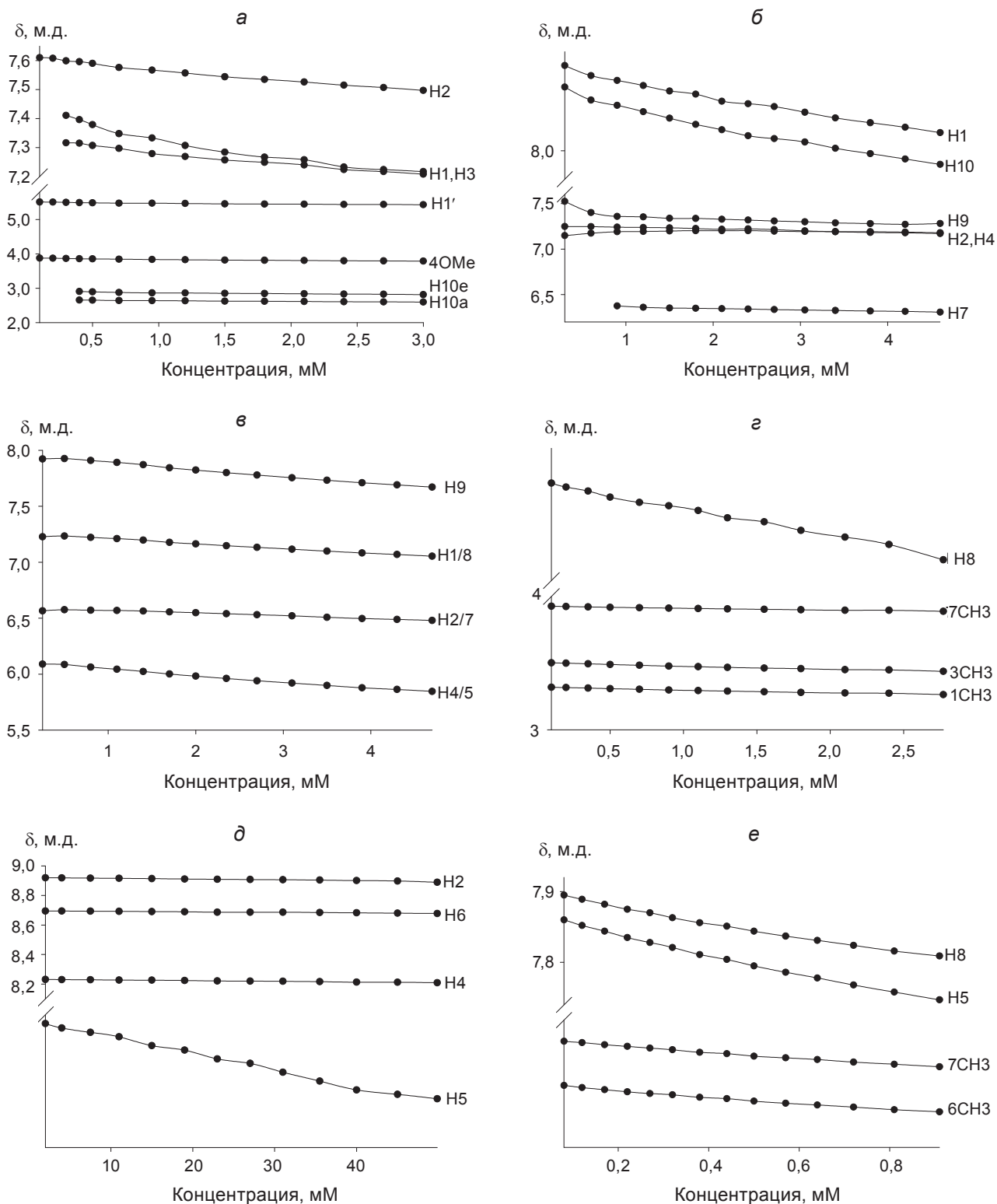


Рис. 2. Экспериментальная зависимость химических сдвигов ароматических протонов от концентрации исследуемых БАС в смешанном растворе в присутствии топотекана: а) дауномицина, б) бромистого этидия, в) профлавина, г) кофеина, д) никотинамида, е) флавиномононуклеотида

энергии Гиббса ΔG_{total} , которые измеряются экспериментально.



Изменение свободной энергии Гиббса ΔG_{total} состоит из множества вкладов от различных физических факторов, наиболее значимые из которых записываются в виде суммы [19]:

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{vdW} + \Delta G_{el} + \Delta G_{hyd} + \Delta G_{HB} + \Delta G_{entr}, \quad (2)$$

где индексы при ΔG обозначают вклад в изменение полной энергии Гиббса от ван-дер-ваальсовых, электростатических, гидрофобных взаимодействий, водородных связей и специфических факторов преимущественно энтропийной природы.

Полагая, что при невалентном комплексобразовании каких-либо структурных изменений в достаточно жестких ароматических молекулах не происходит, а также учитывая, что гетероассоциация протекает в водной среде, расчет каждого из термов в выражении (2) проводился по термодинамическому циклу, изображенному на рис. 3. Согласно этому циклу, расчет свободной энергии проводится в отдельности в вакууме (межмолекулярный терм, ΔG_{im}) и в водной фазе (сольватационный терм, ΔG_{solv}), которые связаны между собой выражением $\Delta G_{total} = \Delta G_{im} + \Delta G_{solv}^{XY} - \Delta G_{solv}^X - \Delta G_{solv}^Y$, упрощающимся к виду:

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{im} + \Delta G_{solv}, \quad (3)$$

где $\Delta G_{solv} = \Delta G_{solv}^{XY} - \Delta G_{solv}^X - \Delta G_{solv}^Y$ представляет собой суммарный вклад от взаимодействий с растворителем.

Ван-дер-ваальсовы взаимодействия (ΔG_{vdW}) являются энтальпийными по своей природе и рассчитывались в настоящей работе с учетом траектории движения атомов в ходе молекулярной динамики (МД, общее время эволюции системы составляло 1 нс) исследуемой системы, путем усреднения VDW-составляющих выходной энергии в X-PLOR за последние 40 пс МД.

Расчет электростатической энергии (ΔG_{el}) проводился путем решения нелинейного уравнения Пуассона–Больцмана в программе DelPhi [20], учитывающего изменение электрических свойств ближайших гидратных слоев молекул при комплексобразовании. Нелинейное уравнение Пуассона–Больцмана использует неявное задание растворителя; для его решения применяется метод конечных

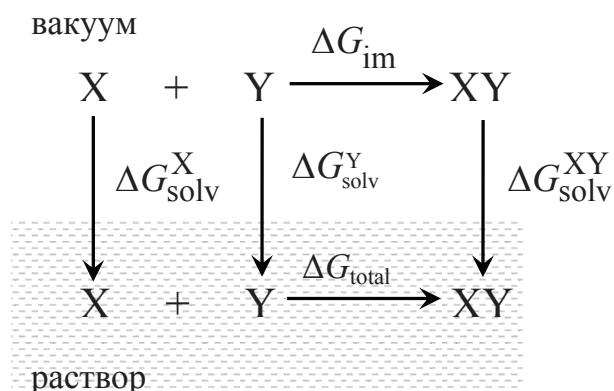


Рис. 3. Термодинамический цикл для расчета энергетических термов

разностей. Поляризуемость лигандов учитывается неявно путем установления внутренней диэлектрической проницаемости комплексов $\epsilon_i = 4$.

Расчет гидрофобного вклада (ΔG_{hyd}) проводился на основе линейной корреляции между энергией гидрофобной сольватации и изменениями площади, доступной для растворителя (SASA), ΔA :

$$\Delta G_{hyd} = \gamma \cdot \Delta A, \quad (4)$$

где $\gamma = 50$ кал/моль·Å² – микроскопический коэффициент поверхностного натяжения [21]. Площадь, доступная для растворителя, рассчитывалась в программе GETAREA, версия 1.1 [22]. Ранее нами было показано [21], что этот метод является наиболее подходящим для расчета гидрофобной энергии для класса ароматических молекул.

Энергетика водородных связей (ΔG_{HB}) образуется взаимодействиями двух типов:

- межмолекулярные водородные связи между лигандами в 1 : 1 комплексах;
- потеря водородных связей с водой вследствие дегидратации лигандов при образовании комплексов.

Конечное выражение для расчета энергетика водородных связей ΔG_{HB} имеет вид [19]:

$$\Delta G_{HB} = -0.25 \cdot 9 \cdot (N_{im} + \Delta N_{solv}), \text{ ккал/моль}, \quad (5)$$

где N_{im} – количество межмолекулярных водородных связей (как будет показано ниже, только в комплексе PF-ТРТ образуется одна межмолекулярная связь ($N_{im} = 1$), для всех остальных изученных систем – $N_{im} = 0$); ΔN_{solv} – изменение гидратационного индекса, рассчитываемого как количество молекул воды, формирующих водородные связи с гидрофильными атомами исследуемых молекул, в

процессе комплексообразования. Наличие водородной связи фиксировалось, если расстояние между электроотрицательными атомами лиганда и атомами кислорода/водорода воды, определяемое по траекториям МД, не превышало 3,2/2,4 Å соответственно.

Энтропийный вклад в полное изменение свободной энергии Гиббса гетероассоциации ароматических молекул вычисляли как сумму трех основных компонент:

$$\Delta G_{\text{entr}} = \Delta G_{\text{tr}} + \Delta G_{\text{rot}} + \Delta G_{\text{vibr}}, \quad (6)$$

где ΔG_{tr} , ΔG_{rot} и ΔG_{vibr} – изменения свободной энергии вследствие потерь трансляционных, ротационных и вибрационных степеней свободы при комплексообразовании.

Общий вибрационный вклад ΔG_{vibr} рассчитывали как:

$$\Delta G_{\text{vibr}} = \Delta G_{\text{vibr}}^{\text{I}} + \Delta G_{\text{vibr}}^{\text{II}}, \quad (7)$$

где $\Delta G_{\text{vibr}}^{\text{I}}$, $\Delta G_{\text{vibr}}^{\text{II}}$ соответствуют изменению вибраций химических связей (вибрации I типа) и механических осцилляций лигандов в комплексе (вибрации II типа) соответственно.

Методика расчета составляющих ΔG_{tr} , ΔG_{rot} , $\Delta G_{\text{vibr}}^{\text{I}}$, $\Delta G_{\text{vibr}}^{\text{II}}$ подробно описана в работе [23].

Результаты и обсуждение

Анализ расчетных значений параметров гетероассоциации

Из рис. 2 следует, что по мере увеличения концентрации БАС (при фиксированной концентрации ТРТ), ароматические протоны всех соединений смещаются в область сильного поля. Такое поведение является характерным для стэкинг-взаимодействия ароматических плоскостей и ранее неоднократно наблюдалось для большого количества различных типов ароматических молекул [4, 12, 13]. На возможность гетероассоциации ТРТ посредством стэкинга ароматических хромофоров также указывают результаты работ [11, 24], в которых монотонное смещение химических сдвигов протонов антибиотика в область сильного поля было отмечено при исследовании самоассоциации ТРТ и его комплексообразования с олигонуклеотидами. Высокие концентрации взаимодействующих молекул, используемые в ЯМР-эксперименте (мМ) и предполагающие агрегацию более высокого порядка чем димеры, дают основание для использования модели комплексообразования, учитывающей вероятность образования всех возможных типов

гетерокомплексов и гомо-агрегатов в системе ТРТ-БАС. Однако существование ТРТ в растворе в двух различных формах накладывает свое ограничение на выбор модели, используемой для анализа экспериментальных кривых по протонам БАС.

В настоящей работе определение параметров гетероассоциации ТРТ-БАС производилось по полному набору ароматических протонов только молекул БАС (рис. 2), несмотря на то, что исходные ^1H ЯМР-спектры также содержат сигналы ароматических протонов топотекана. Это связано с тем, что в условиях эксперимента (нейтральный pH) топотекан (рис. 1, а) существует в двух формах – лактонной (lact, кольцо E закрыто) и карбоксилатной (carb, кольцо E открыто) [25], – что проявляется в наличии двух наборов пиков от молекулы ТРТ в одномерных ^1H ЯМР-спектрах. Неизбежное перекрывание сигналов ТРТ и их невысокая интенсивность по сравнению с сигналами БАС (вследствие меньшей концентрации) является причиной ненадежности определения положения резонансов протонов ТРТ в спектрах и, как следствие, ненадежности последующего количественного расчета параметров гетероассоциации по этим данным.

В отличие от протонов ТРТ, представленных в эксперименте двумя отдельными наборами пиков, химические сдвиги протонов молекул БАС содержат в себе взвешенное, пропорционально мольным долям соответствующих типов комплексов, экранирование как от карбоксилатной, так и лактонной форм антибиотика. Выделение этих вкладов на основании концентрационных кривых протонов БАС не представляется возможным, в связи с чем анализ равновесия ТРТ-БАС по протонам БАС возможен только в рамках двухкомпонентной модели, предполагающей несущественную разницу констант гетероассоциации Carb-БАС и Lact-БАС, и, следовательно, рассматривающей ТРТ как однокомпонентную систему. Такое предположение является вполне допустимым, поскольку, как указывалось ранее [9], параметры самоассоциации Lact- и Carb-форм совпадают в пределах погрешности определения, равно как и параметры гетероассоциации кофеина с Lact- и Carb-формами статистически неразличимы на фоне погрешности эксперимента.

Результаты расчетов параметров гетероассоциации ТРТ-БАС по двухкомпонентной модели, учитывающей бесконечномерную само- и гетероассоциацию взаимодействующих веществ, представлены в таблице.

Расчетные значения параметров гетероассоциации топотекана с ароматическими БАС при 298 К

Протон БАС	δ_c , м.д.	$\Delta\delta_c$, м.д.	K_s , М ⁻¹	K_C , М ⁻¹	f_c , %
PF-TPT					
H9	7,91	0,89	700 ± 150	3000 ± 300	39,7
H1/8	7,21	0,69			
H2/7	6,56	0,50			
H4/5	6,06	0,80			
EB-TPT					
H1	8,02	0,67	305 ± 14	1450 ± 300	25,9
H2	7,10	0,38			
H4	6,89	0,66			
H7	6,17	0,50			
H9	7,30	0,36			
H10	7,94	0,69			
DAU-TPT					
H2	7,42	0,46	720 ± 130	2000 ± 340	30,4
H1	7,13	0,77			
H3	7,25	0,35			
4OMe	3,83	0,22			
H10e	2,86	0,22			
H10a	2,61	0,24			
H1'	5,50	0,05			
NMD-TPT					
H2	8,56	0,37	$0,73 \pm 0,05$	45 ± 10	1,2
H6	8,50	0,20			
H4	7,86	0,38			
H5	7,53	0,06			
FMN-TPT					
H8	7,69	0,30	265 ± 38	1300 ± 200	24,2
H5	7,61	0,39			
7Me	2,40	0,19			
6Me	2,30	0,19			
CAF-TPT [9]					
H8	7,72	0,17	$11,8 \pm 0,3$	320 ± 30	7,7
7Me	3,82	0,13			
3Me	3,30	0,24			
1Me	3,15	0,20			

Примечание: K_s и K_C – константы самоассоциации БАС и их гетероассоциации с ТРТ, соответственно; f_c – критерий дополнительной стабилизации гетерокомплексов; δ_c , $\Delta\delta_c$ – абсолютный и индуцированный химические сдвиги протонов в гетерокомплексах

Анализ индуцированных химических сдвигов по протонам БАС (табл.) свидетельствует об эффекте экранирования ($\Delta\delta_c > 0$) и подтверждает вывод о стэкинг-характере комплексообразования ТРТ-БАС, сделанный выше на основании качественного рассмотрения экспериментальных кривых титрования. Наибольшее, в среднем, экранирование протонов БАС от молекулы ТРТ наблюдается в комплексе с PF. По-видимому, это связано с отсутствием разветвленных боковых цепей в структуре PF и, как следствие, меньшим расстоянием в гетерокомплексе. Ранее похожий эффект наблюдался при замене аминокрупп PF на массивные диметильные группы акридинового оранжевого [26], а также, когда происходила последовательная замена боковых групп бромистого этидия на азидогруппы [27] при исследовании гетероассоциации указанных соединений с антибиотиком дауномицином.

Расчетные константы гетероассоциации по всем исследованным системам принимают промежуточные значения между константами самоассоциации ТРТ ($K_{\text{ТРТ}} = 3800 \text{ M}^{-1}$ [9]) и соответствующего лиганда. Считается, что основной вклад в энергетику комплексов ароматических молекул дают гидрофобные, ван-дер-ваальсовы и электростатические взаимодействия [17, 28]. Однако в некоторых системах может наблюдаться дополнительная стабилизация комплексов за счет межмолекулярных водородных связей или взаимодействий по типу «перенос заряда» [4, 29]. Для оценки вероятности дополнительной стабилизации гетерокомплексов XY по сравнению с самоассоциатами ароматических соединений X и Y в работе [29] был предложен критерий

$$f_c = \frac{K_c}{K_x + K_y + K_c}, \text{ причем установлено, что для}$$

реакций комплексообразования в водной среде, удовлетворяющих условию $f_c > 35\%$, с высокой степенью вероятности может ожидатьс additional стабилизация гетерокомплексов за счет межмолекулярных водородных связей. Как следует из таблицы, указанному условию соответствует система ТРТ-PF, следовательно, в этом комплексе существует высокая вероятность образования дополнительной межмолекулярной водородной связи, стабилизирующей его. Эта информация является важной для последующего структурного и энергетического анализа систем ТРТ-БАС.

Важно отметить, что фактор f_c по своей сути представляет собой меру относительного вклада реакций гетероассоциации в суммарное

динамическое равновесие и, следовательно, отражает значимость вклада интерцепторного механизма действия (см. введение) в изменение связывания антибиотика ТРТ с ДНК при введении лиганда-перехватчика. Это значит, что при условии отсутствия других механизмов, интерцепторное действие на ТРТ, будет наиболее значительным при введении в систему PF и DAU, и наименее значительным для NMD и CAF (табл.).

Структурный и энергетический анализ гетероассоциации ТРТ-БАС

Расчитанные методами молекулярного моделирования структуры приведены на рис. 4 (структура комплекса ТРТ-CAF опубликована в работе [9]). Так, в комплексе с DAU наблюдается полное перекрывание всех колец ароматических хромофоров, в комплексе ТРТ-EB молекула красителя располагается над кольцами А, В, С молекулы антибиотика. Молекула PF располагается над всеми кольцами молекулы ТРТ, обеспечивая полное перекрывание колец С и D и частичное – колец А, В и Е. Кроме того, сделанное выше предположение о возможной стабилизации данного комплекса водородной связью нашло свое подтверждение в процессе молекулярного моделирования. Водородная связь, стабилизирующая комплекс PF-ТРТ, образуется между протонами аминокруппы красителя в положении 3 и атомом кислорода антибиотика в положении 20. В комплексе ТРТ-CAF молекула кофеина расположена над кольцами А и В молекулы ТРТ [9]. Комплекс ТРТ-NMD является наиболее сложным с точки зрения анализа взаимного расположения молекул (в силу малых размеров молекулы никотинамида). Однако, исходя из качественного анализа хода экспериментальных кривых протонов молекулы ТРТ в комплексе (данные не приведены), было сделано предположение о преимущественном расположении молекулы NMD в области колец А-В молекулы антибиотика. Это позволило задать начальную структуру комплекса и выполнить минимизацию по энергии, в результате которой была получена наиболее стабильная структура (рис. 4, з). Наконец, в комплексе FMN-ТРТ наблюдается полное перекрывание ароматических колец обеих молекул. Во всех комплексах плоскости молекул практически параллельны друг другу.

Важной составляющей полной картины гетероассоциации БАС является информация об энергетическом вкладе различных видов физических взаимодействий в суммарную энергию Гиббса реакции образования гетерокомплексов. В настоящей работе методами

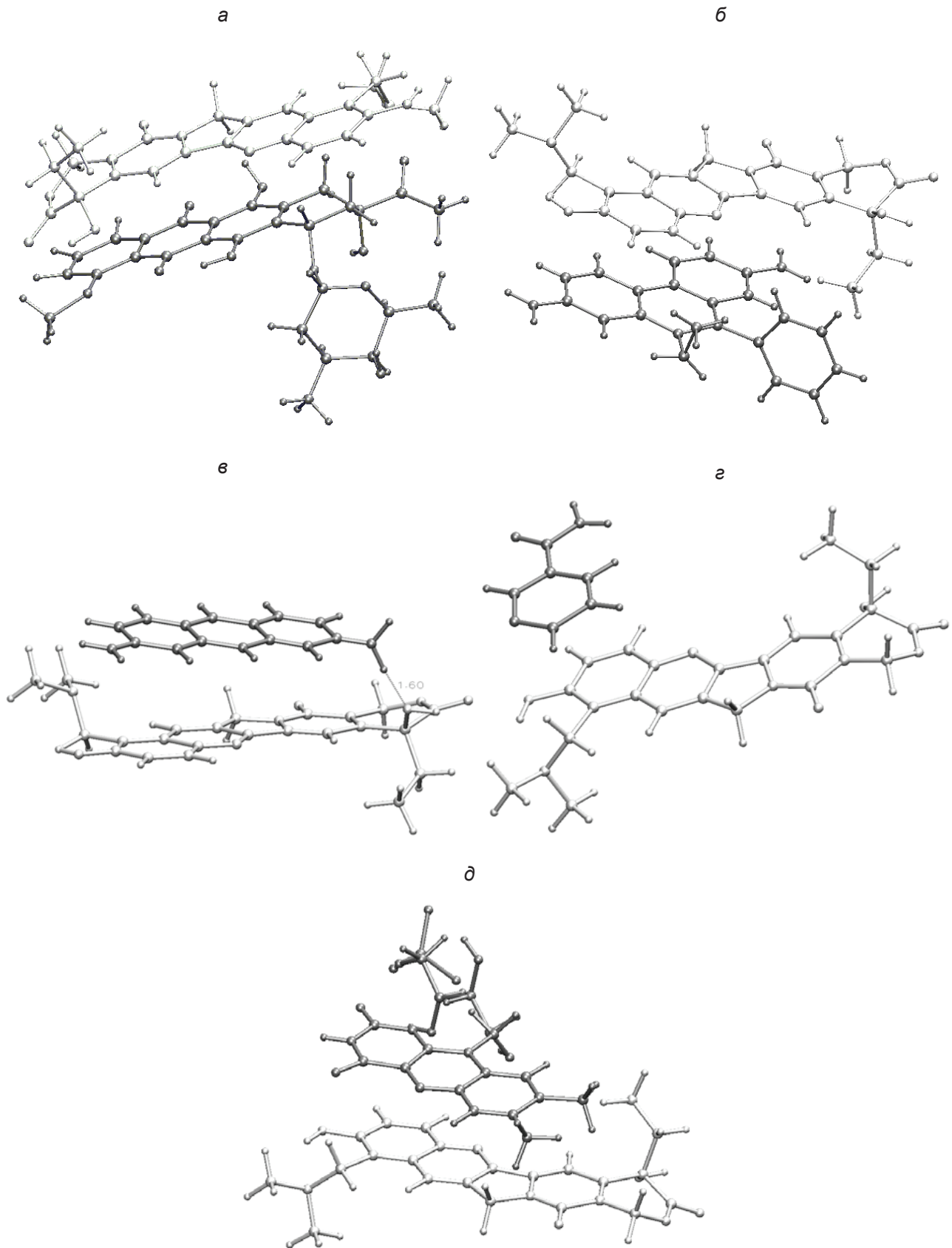


Рис. 4. Расчетные пространственные структуры гетерокомплексов: а) TPT-DAU, б) TPT-EB, в) TPT-PF, г) TPT-NMD, д) TPT-FMN

молекулярного моделювання произведено розділення експериментальної енергії Гіббса реакцій гетероасоціації антибіотика топтекана з досліджуваними БАС на окремі енергетичні складові (рис. 5).

Первинним і вповне природним етапом аналізу діаграми вкладів на рис. 5 є сопоставлення теоретичної і експериментальної (табл.) повних енергій Гіббса реакцій гетероасоціації. Однак такий аналіз по відношенню до систем ТРТ-БАС, маючим розброс по енергії Гіббса ($\Delta G_C = -RT \ln K_C$) в межах 2...4,5 ккал/моль (табл.), оказується позбавленим значення. Дійсно, погрешність оцінки енергій ван-дер-ваальса з молекулярної динаміки в межах будь-якого сучасного методу складає порядку декілька ккал/моль, що порівнянимо з самою ΔG_C і її варіацією в різних системах ТРТ-БАС. По цій причині аналіз повної енергії ΔG_C не є статистично значимим і тільки аналіз термів її складових, може нести фізичний зміст (детальне обговорення даної проблеми дано в роботі [19]).

Як випливає з рис. 5, для всіх досліджуваних систем ТРТ-БАС має місце якіс-

не аналогічне розподілення енергетики по різних термах повної енергії Гіббса. Сумарний вклад ван-дер-ваальсових взаємодій ΔG_{vdw} оказується незначительним внаслідок взаємної компенсації вигідного міжмолекулярного взаємодія і невигідної втрати ван-дер-ваальсових контактів на водне середовище. Такого ефекту по відношенню до процесів комплексоутворення ароматических молекул раніше неодноразово відмічалося різними авторами і, по-видимому, є загальною властивістю π -стэкінга в водній середі ([19] і посилання на неї). Вклад електростатических взаємодій ΔG_{el} також оказується незначительним по причині того, що молекула ТРТ є електрически нейтральною при фізіологіческому рН [30].

Енергетически невигідними (перешкоджаючими комплексоутворенню) є сумарний вклад водородних зв'язів ΔG_{HB} і ентропійний терм ΔG_{entr} (рис. 5). Позитивний знак ΔG_{HB} є наслідком втрати водородних зв'язів з водним середовищем при утворенні гетерокомплексів. Позитивний знак ΔG_{entr} в основному обумовлено втратою степеней свободи молекул при комплексоутворенні. Подібний енергетический

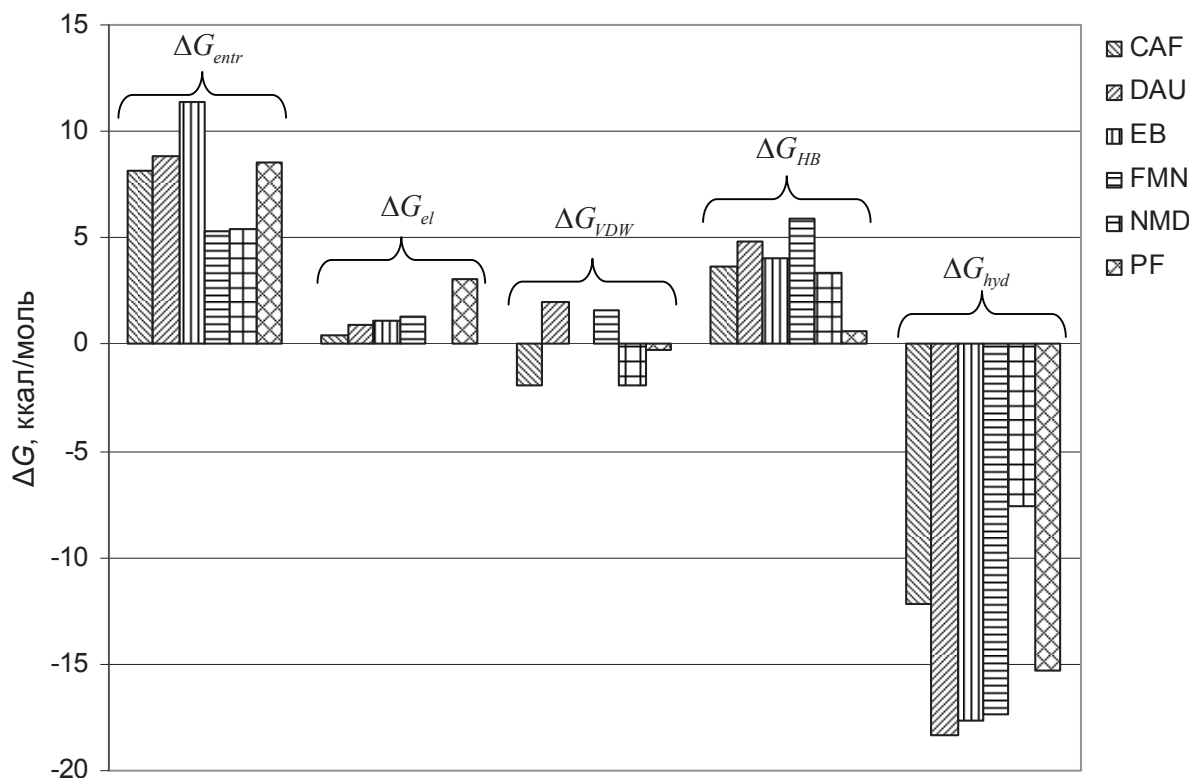


Рис. 5. Расчетные значения энергетических термов полной энергии Гиббса реакций гетероасоциации ТРТ-БАС

профиль также в целом согласуется с тем, что наблюдалось ранее нами и другими авторами для различных комплексов ароматических молекул ([19] и ссылки в ней).

Как следует из рис. 5, основной стабилизирующий гетерокомплексы ТРТ-БАС вклад по абсолютной величине изменения энергии Гиббса дают гидрофобные взаимодействия ΔG_{hyd} . Однако наиболее важный, на наш взгляд, результат, заключается в том, что из всех рассчитанных термов именно ряд стабильности систем ТРТ-БАС по значениям гидрофобной энергии (DAU→EB→FMN→CAF→NMD) оказывается идентичным ряду равновесных констант гетероассоциации (отметим, что RF должен быть исключен из такого сравнения вследствие дополнительной стабилизации гетерокомплекса Н-связью (табл.)). Следовательно, различие в стабильности систем ТРТ-БАС определяется именно гидрофобным фактором. Этот результат указывает направление, в котором следует производить направленный синтез производных ТРТ и БАС с целью максимизации/минимизации эффективности их комплексообразования в физиологическом растворе.

Таким образом, в настоящей работе впервые исследована гетероассоциация антибиотика топотекана с ароматическими биологически активными соединениями: кофеином, бромистым этидием, профлавином, дауномицином, флавин-монопнуклеотидом и никотинамидом. Получены равновесные константы гетероассоциации, индуцированные химические сдвиги протонов БАС в составе комплексов, рассчитаны пространственные структуры 1 : 1 гетерокомплексов и составляющие полной энергии Гиббса реакций комплексообразования, ответственные за вклад различных физических факторов в энергетику гетероассоциации.

Установлено, что комплексообразование ТРТ-БАС носит характер стэкинга хромофоров, дополнительно стабилизируемого в случае RF межмолекулярной водородной связью; доминирующими в энергетике комплексообразования ТРТ-БАС являются гидрофобные взаимодействия; ряд стабильности систем ТРТ-БАС по константам гетероассоциации (DAU→EB→FMN→CAF→NMD) идентичен величине гидрофобного вклада.

Полученные результаты предоставляют всю необходимую информацию для последующего количественного анализа действия ароматических БАС на связывание ТРТ с ДНК в трехкомпонентных системах ТРТ-БАС-ДНК.

ВИВЧЕННЯ МЕТОДОМ ¹H ЯМР-СПЕКТРОСКОПІЇ КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ АРОМАТИЧНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК З АНТИБІОТИКОМ ТОПОТЕКАНОМ

*А. О. Мосунов, В. В. Костюков,
М. П. Євстигнєєв*

Севастопольський національний
технічний університет, Україна;
e-mail: max_evstigneev@mail.ru

У роботі з використанням даних ¹H ЯМР-спектроскопії проведено аналіз гетероасоціації антибіотика топотекану (ТРТ) з ароматичними біологічно активними сполуками (БАС): кофеїном, мутагенами бромистим етидієм і профлавіном, антибіотиком дауномицином, вітамінами флавінмонопнуклеотидом і нікотинамідом. Одержано рівноважні константи гетероасоціації і індуковані хімічні зсуви протонів БАС у складі комплексів. Встановлено, що комплексоутворення ТРТ-БАС має характер стэкінга хромофорів, який додатково стабілізується у разі профлавіна міжмолекулярним водневим зв'язком. Проведено розрахунок основних складових вільної енергії Гіббса реакції комплексоутворення, виділено чинники, які стабілізують та дестабілізують гетерокомплекси молекул.

Ключові слова: топотекан; гетероасоціація; стэкінг; вільна енергія Гіббса.

STUDIES BY MEANS OF ¹H NMR SPECTROSCOPY OF COMPLEX FORMATION OF AROMATIC BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS WITH ANTIBIOTIC TOPOTECAN

*A. A. Mosunov, V. V. Kostjukov,
M. P. Evstigneev*

Sevastopol National Technical University, Ukraine;
e-mail: max_evstigneev@mail.ru

Summary

The analysis of heteroassociation of antibiotic topotecan (TPT) with aromatic biologically active compounds (BAC): caffeine, mutagens ethidium bromide and proflavine, antibiotic daunomycin, vitamins flavin-monomucleotide and nicotinamide, has been carried out in the work using ¹H NMR spectroscopy data. The equilibrium constants of heteroassociation and induced chemical shifts of

the protons have been obtained in the complexes with BAC. It is found that the complex formation TPT-BAC has the nature of stacking of the chromophores, additionally stabilized in the case of proflavine by intermolecular hydrogen bond. Calculation of the basic components of the Gibbs free energy of the complexation reactions is carried out, and the factors which stabilize and destabilize the heterocomplexes of molecules are revealed.

Key words: topotecan; heteroassociation; stacking; Gibbs free energy.

1. *Chu E., DeVita V. T.* Physicians' cancer chemotherapy drug manual. – L.: Jones and Bartlett Publ. – 2003. – 512 p.
2. *Prylutska S. V., Burlaka A. P., Prylutskyu Yu. I. et al.* // Біотехнологія. – 2011. – 4, № 6. – С. 82–87.
3. *Graves D. E., Velea L. M.* // *Curr. Org. Chem.* – 2000. – 4. – P. 915–928.
4. *Evstigneev M. P.* DNA-binding aromatic drug molecules: Physico-chemical interactions and their biological roles. – Lambert Academic Publishing, 2010. – 96 p.
5. *Evstigneev M. P., Lantushenko A. O., Evstigneev V. P. et al.* // *Biophys. Chem.* – 2008. – 132. – P. 148–158.
6. *Traganos F., Kapuscinski J., Gong J. et al.* // *Cancer Res.* – 1993. – 53. – P. 4613–4618.
7. *Лантушенко А. О., Мосунов А. А., Даржинкевич З., Евстигнеев М. П.* // Фізика живого. – 2007. – 15. – С. 18–23.
8. *Bernacki R. J., Pera P., Gambacorta P. et al.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2000. – P. 293–297.
9. *Evstigneev M. P., Mosunov A. A., Evstigneev V. P. et al.* // *Eur. Biophys J.* – 2011. – 40. – P. 969–980.
10. *Dashwood R., Guo D.* // *Env. Mol. Mutagen.* – 1993. – 22. – P. 164–171.
11. *Bocian W., Kawecki R., Bednarek E. et al.* // *Chem. Eur. J.* – 2004. – 10. – P. 5776–5787.
12. *Andrejuk D. D., Hernandez Santiago A. A., Khomich V. V. et al.* // *J. Mol. Str.* – 2008. – 889. – P. 229–236.
13. *Davies D. B., Evstigneev M. P., Veselkov D. A., Veselkov A. N.* // *Biophys. Chem.* – 2005. – 117. – P. 111–118.
14. *Brunger A. T.* X-PLOR: A System for X-ray Crystallography and NMR. – Yale: Yale University Press, 1992.
15. *Kleywegt G. L.* Dictionaries for heteros. News Uppsala Software Fact. – 1998. – 5. – P. 4–5.
16. *In Gaussian 03.* – Gaussian Inc.: Wallingford, 2004.
17. *Evstigneev V. P., Mosunov A. A., Buchelnikov A. S. et al.* // *J. Chem. Phys.* – 2011. – 134. – Art. no. 194902–194907.
18. *Veselkov A. N., Evstigneev M. P., Veselkov D. A., Davies D. B.* // *J. Chem. Phys.* – 2001. – 115, N 5. – P. 2252–2266.
19. *Kostjukov V. V., Khomytova N. M., Hernandez Santiago A. A. et al.* // *J. Chem. Thermodyn.* – 2011. – 43. – P. 1424–1434.
20. *Rocchia W., Alexov E., Honig B.* // *J. Phys. Chem. B.* – 2001. – 105, N 28. – P. 6507–6514.
21. *Костюков В. В., Хомутова Н. М., Лантушенко А. О., Евстигнеев М. П.* // Біополімери і клітина. – 2009. – 25, № 2. – С. 133–141.
22. *Fraczkiewicz R., Braun W.* // *J. Comput. Chem.* – 1998. – 19, N 3. – P. 319–333.
23. *Костюков В. В., Хомутова Н. М., Евстигнеев М. П.* // Хім. фізика. – 2009. – 28, № 9. – С. 26–32.
24. *Mazzini S., Bellucci M. C., Dallavalle S. et al.* // *Org. Biomol. Chem.* – 2004. – 2. – P. 505–513.
25. *Gabr A., Kuin A., Aalders M.* // *Cancer Res.* 1997. – 57. – P. 4811–4816.
26. *Davies D. B., Veselkov D. A., Kodintsev V. V. et al.* // *Mol. Phys.* – 2000. – 98, N 23. – P. 1961–1971.
27. *Веселков А. Н., Лантушенко А. О., Евстигнеев М. П. и др.* // Укр. хім. журн. – 2002. – 68. – С. 78–83.
28. *Kostjukov V. V., Tverdokhle N. M., Evstigneev M. P.* // *Ukr. J. Phys.* – 2011. – 56, N 1. – P. 37–48.
29. *Kostjukov V. V., Mosunov A. A., Ermolaev M. A. et al.* // *J. Mol. Str.* – 2011. – 985. – P. 403–406.
30. *Streltsov S. A., Grokhovskii S. L., Kudelina I. A. et al.* // *Mol. Biology.* – 2001. – 35, N 3. – P. 365–373.

Получено 24.01.2012