

УДК 577.113

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ АНТИБИОТИКА НОРФЛОКСАЦИНА С ДНК В ПРИСУТСТВИИ АРОМАТИЧЕСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

К.А. Рыбакова, М.П. Евстигнеев

*Кафедра физики Севастопольского национального технического университета.
Севастополь, Студгородок, Украина, 99053*

В настоящей работе исследован процесс конкурентного связывания антибиотика норфлоксацина с ДНК в присутствии антиопухолевых антибиотиков дауномицина, ногаламицина, новатрона и актиномицина D, кофеина и ароматических витаминов флавин-мононуклеотида (витамин В₂) и никотинамида (витамин РР). Для всех рассмотренных комбинаций рассчитано соотношение эффективности протекторного и интерцепторного механизмов действия, а также дана оценка относительного изменения биологического эффекта.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хинолоновые антибиотики, комбинированная терапия, гетероассоциация, комплексообразование, конкурентное связывание, протекторный механизм, интерцепторный механизм.

Норфлоксацин (NOR) является представителем фторхинолоновой группы антибиотиков, которые обладают выраженным бактерицидным действием и находят широкое применение в клинической практике [1]. NOR характеризуется оптимальной фармакокинетикой, высокой биодоступностью, хорошей переносимостью и высокой активностью по отношению к возбудителям, резистентным к другим противомикробным средствам. Как и для других антибиотиков фторхинолоновой серии, противомикробное действие норфлоксацина объясняется специфическим ингибированием гиразы ДНК – топоизомеразы II бактериального типа, которая раскручивает суперспирализованную ДНК перед началом репликации и транскрипции, что приводит к прекращению размножения микроорганизма. При этом считается, что ключевым моментом биологического действия NOR является его связывание не с гиразой ДНК, а непосредственно с нуклеиновой кислотой [2].

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что хинолоновые антибиотики проявляют ярко выраженный синергизм при использовании совместно с другими ароматическими биологически активными соединениями (БАС). Фторхинолоны могут взаимодействовать с метилксантинами (кофеин, теofilлин), увеличивая продолжительность их действия и усиливая токсические эффекты [2]. Хинолоновые препараты способны проявлять синергизм действия и с антрациклиновыми антиопухолевыми антибиотиками, при этом фторхинолоны демонстрируют существенную цитотоксичность, зависящую от времени и дозы экспозиции, что является весомым основанием для использования хинолонов в комбинированной противораковой химиотерапии [3]. Ко всему вышесказанному следует также добавить, что изменение биологической активности ряда антимикробных препаратов, включая хинолоновые антибиотики, было также зафиксировано в присутствии различных ароматических витаминов, в частности, производных флавина и витаминов К-серии [4].

Следует отметить, что приведенные факты проявления синергетических эффектов при использовании NOR совместно с другими препаратами не являются специфической особенностью лишь этого антибиотика. В качестве примера можно привести группу антрациклиновых антибиотиков – нековалентно интеркалирующих в ДНК агентов, нашедших широкое применение в клинической практике для лечения многих типов твердотельных опухолей и лейкемии [5]. Известно, что токсичность антрациклинов снижается в присутствии витамина В₂ (рибофлавина) [6], витамина РР (никотинамида) [7] и кофеина [8]. В качестве наиболее вероятного механизма изменения токсического действия антрациклинов разными авторами предлагается комплексообразование (гетероассоциация) антибиотика с витаминами или кофеином (интерцепторный механизм действия) и их конкуренция за место посадки на ДНК (протекторный механизм действия) [9] и ссылок в ней]. Учитывая, что антибиотик NOR достаточно эффективно образует гетерокомплексы с различными ароматическими соединениями [5] и связывается с молекулой ДНК [10], можно предположить, что механизмы интерцепторного и протекторного действий также могут давать вклад в отмеченные выше факты изменения биологического отклика комбинации препаратов с участием NOR.

В настоящей работе нами проведен комплексный анализ эффективности действия протекторного и интерцепторного механизмов при совместном связывании NOR и различных ароматических биологически активных соединений с ДНК: антиопухолевого антибиотика дауномицина (DAU),

ногаламицина (NOG), новатрона (NOV), актиномицина D (AMD), кофеина (CAF) и витаминов флавинонуклеотида (FMN) – аналога витамина B₂ – и никотинамида (NMD).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

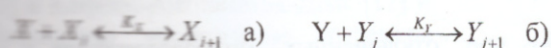
Модель конкурентного связывания в системе X-Y-ДНК

Обозначим основной лиганд, оказывающий свое биологическое действие путем комплексообразования с ДНК как X, а лиганд-«перехватчик», который способен нековалентно взаимодействовать и с X, и с ДНК – как Y. В результате гетероассоциации X-Y концентрация свободных молекул X в растворе снижается, следовательно биологический отклик вещества X изменяется под влиянием вещества Y. Согласно [8] будем называть этот процесс *интерцепторным* действием перехватчика Y на лиганд X. Наряду с этим молекулы вещества Y способны связываться с ДНК, блокируя тем самым места возможной посадки лиганда X, что также приводит к снижению доли комплексов X-ДНК в растворе и изменению биологической активности вещества X. Согласно [9] назовем этот процесс *примитивным* действием молекул Y на ДНК.

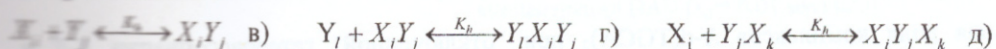
Как и ранее [11], будем использовать в качестве модели ДНК олигомерную последовательность d-(TGCA)_n, представляющую свободные от гистонов участки ядерной ДНК.

В общем случае корректный анализ трехкомпонентного динамического равновесия молекул X, Y в присутствии ДНК должен учитывать все возможные виды межмолекулярных взаимодействий компонент смеси, а именно самоассоциацию X, Y (а, б); гетероассоциацию X, Y (в, г, д) и комплексообразование X, Y с двухцепочечной (N₂) формой тетрамера в растворе (е, ж):

Самосоассоциация



Гетероассоциация



Комплексообразование с ДНК



где K_x, K_y – константы самоассоциации молекул лиганда и перехватчика соответственно; K_h – константа гетероассоциации X и Y; K_{2X}, K_{2Y} – константы комплексообразования X и Y с двухцепочечной формой тетрамера соответственно. Система уравнений закона сохранения массы для реакций (1) принимает вид [11-13]:

$$\begin{cases} \frac{x_1}{(1-K_x x_1)^2} \left(1 + \frac{K_h y_1}{1-K_y y_1} + \frac{K_h^2 y_1^2}{2(1-K_y y_1)^2} + \frac{K_h^2 x_1 y_1}{(1-K_x x_1)(1-K_y y_1)} \right) + K_{2X} x_1 N_2 = x_0 \\ \frac{y_1}{(1-K_y y_1)^2} \left(1 + \frac{K_h x_1}{1-K_x x_1} + \frac{K_h^2 x_1^2}{2(1-K_x x_1)^2} + \frac{K_h^2 x_1 y_1}{(1-K_y y_1)(1-K_x x_1)} \right) + K_{2Y} y_1 N_2 = y_0 \\ N_2(1 + K_{2X} x_1 + K_{2Y} y_1) = N_0 \end{cases} \quad (2)$$

где x₁, y₁, N₂ – мономерные концентрации X, Y и тетрамера соответственно; x₀, y₀ – общие концентрации X и Y; N₀ – общая концентрация тетрамерных участков ДНК. Решение (2) относительно x₁, y₁, N₂ позволяет найти мольные доли всех типов комплексов, существующих в растворе. Тестовые ЯМР-эксперименты, проведенные ранее для систем DAU-CAF-TGCA [12] и FMN-DAU-TGCA [13], подтвердили адекватность системы (2) для описания трехкомпонентных растворов X-Y-ДНК.

Как видно из (2), для решения системы уравнений необходимо знать равновесные константы само-, гетероассоциации и комплексообразования лиганда и перехватчика с тетрамером ДНК. Ранее нами уже были детально исследованы процессы гетероассоциации хинолонового антибиотика норфлоксацина с антрациклиновыми антибиотиками (DAU, NOG, NOV, AMD) [5], витаминами (FMN, NMD) [14] и кофеином [11] а также комплексообразования NOR с тетрауклеотидом 5'-d(TrGpCpA) [10]. Значения полученных констант само-, гетероассоциации и комплексообразования исследуемых БАС с тетрамером ДНК представлены в таблице 1:

Табл.1 - Значения констант самоассоциации исследуемых БАС (K), их гетероассоциации (K_h) с норфлоксацином и комплексообразования с d(TGCA)₂ (K₂) при T=298 K

	NOR	DAU	NOG	NOV	AMD	FMN	NMD	CAF
K, л/моль	132 [11]	720 [15]	7 400 [15]	28 600 [15]	1 420 [15]	265 [15]	0.73 [15]	11.8 [15]
K _h , л/моль	-	460 [5]	875 [5]	1 780 [5]	980 [5]	180 [14]	23 [14]	30 [11]
K ₂ , л/моль	2 000 [10]	560 000 [15]	1 200 000 [15]	850 000 [15]	1 000 000 [15]	8 000 [13]	~ 0 ¹	250 [9]

Примечания:

¹ константа комплексообразования NMD с ДНК в литературе отсутствует. Поскольку связывание аналогов NMD с нуклеиновыми кислотами чрезвычайно мало [16], K₂ для NMD в данной работе полагается равной нулю.

Метод количественной оценки протекторного и интерцепторного механизмов

Гетероассоциация соединений X и Y, так же как и процесс комплексообразования Y-ДНК происходят в растворе одновременно, таким образом, интерцепторный и протекторный механизмы действия должны учитываться в анализе совместно. Для оценки влияния интерцепторного и протекторного механизмов, как и ранее при исследовании конкурентного связывания с ДНК ароматических антибиотиков в присутствии кофеина или витамина B₂ [11-13], будем использовать фактор R_D. Фактор R_D рассчитывается в следующем образом:

$$R_D = \frac{f_{C2(0)}^X - f_{C2(C)}^X}{f_{C2(0)}^X - f_{C2(h)}^X}, \quad (3)$$

где $f_{C2(0)}^X$ - мольная доля комплексов X-d(TGCA)₂ при "отключенных" гетероассоциации и комплексообразовании Y-ДНК.

$f_{C2(C)}^X$ - мольная доля комплексов X-d(TGCA)₂ при "отключенной" гетероассоциации X-Y и "включенном" комплексообразовании Y с d(TGCA)₂ (K_h = 0, K_{2Y} ≠ 0)

$f_{C2(h)}^X$ - мольная доля комплексов X-d(TGCA)₂ при "включенной" гетероассоциации X-Y и "отключенном" комплексообразовании Y с d(TGCA)₂ (K_h ≠ 0, K_{2Y} = 0) -

Область R_D > 1 соответствует преобладанию процесса комплексообразования Y-ДНК над процессом гетероассоциации X-Y (протекторное действие Y), а в области R_D < 1 главный вклад в уменьшение доли комплексов X-ДНК вносит процесс гетероассоциации (интерцепторное действие Y).

Для оценки процента лиганда X, вытесненного из ДНК за счет действия обоих молекулярных механизмов при добавлении лиганда-перехватчика Y, будем использовать фактор A_D [11]:

$$A_D = \frac{f_{C2(0)}^X - f_{C2}^X}{f_{C2(0)}^X} \times 100\%, \quad (4)$$

где f_{C2}^X - мольная доля комплексов X-d(TGCA)₂ при "включенных" гетероассоциации и комплексообразовании Y с d(TGCA)₂ (K_h ≠ 0, K_{2Y} ≠ 0).

Учитывая, что все рассмотренные в настоящей работе ароматические БАС оказывают свое биологическое действие путем комплексообразования с ядерной ДНК, а фактор A_D - это процент снижения доли комплексов X-ДНК - можно считать, что величина A_D является мерой изменения биологического эффекта вещества X при добавлении вещества Y.

Численный анализ связывания ароматических БАС с ДНК в присутствии NOR

Как и ранее [11, 12], в настоящей работе концентрация вещества X принималась постоянной, равной x₀ = 0.01 ммоль/л, а концентрация вещества Y варьировалась в широком диапазоне вплоть до миллимолярных концентраций. В качестве примера на рис.1 представлен график для фактора R_D, рассчитанный в широкой области концентраций NOR (лиганд-перехватчик Y), при постоянной концентрации DAU (x₀ = 0.01 ммоль/л).

Исследование связывания антибиотика норфлоксацина с ДНК...

Из рис.1 видно, что уменьшение концентрации тетрамера N_0 в смешанном растворе приводит к постепенному увеличению максимума исследуемой зависимости и сдвигу его в область малых концентраций NOR, что обусловлено более ранним насыщением тетрамера молекулами как норфлоксацина, так и дауномицина, и приводящим к доминированию протекторного действия в микромолярной области концентраций NOR. При концентрации норфлоксацина в диапазоне 1-10 ммоль/л, кривые рассчитанных зависимостей R_D (см. рис.1) проходят точку перегиба ($N_0 \leq 0.1$ ммоль/л) или имеют ярко выраженный максимум ($N_0 > 0.1$ ммоль/л). Наличие особой точки на кривых R_D также наблюдалось ранее в системах Витамин-Антибиотик-ДНК [13] и Кофеин-Антибиотик-ДНК [12] и обусловлено насыщением тетрамера молекулами NOR (рис. 2).

Исходя из общего вида полученных зависимостей $R_D(y_0)$ (см. рис.1), процесс вытеснения молекул лиганда из ДНК за счет действия интеркаляторного и протекторного механизмов можно разделить на две фазы в зависимости от концентрации ДНК в смешанном растворе: фаза 1 (без выраженного максимума) – при сравнимых концентрациях ДНК и лиганда: $N_0 \sim x_0 = 0.01$ ммоль/л; фаза 2 (с выраженным максимумом) – при концентрациях ДНК больших концентрации лиганда: $N_0 \gg x_0$. В пределах каждой фазы R_D мало зависит как от N_0 , так и от y_0 в области малых концентраций NOR (до 0.1 ммоль/л). Необходимо также отметить, что момент наступления фазы 2 существенно зависит от типа лиганда, конкурирующего с NOR за связывание с ДНК. Расчеты

показывают, что самое «позднее» наступление фазы 2 (наибольшая концентрация N_0) имеет место в системе NOR-CAF-ДНК при $N_0 = 5$ ммоль/л, в связи с этим в последующих расчетах концентрация тетрамера в фазе 2 принималась равной 5 ммоль/л.

На рис.3 представлен сравнительный график для R_D при связывании антиопухолевых антибиотиков (DAU, NOV, NOG, AMD), витамина (FMN) и кофеина с $d(TGCA)_2$ в фазе 1 (рис. 3а) и в фазе 2 (рис.3б). Поскольку связывания аналогов NMD с нуклеиновыми кислотами чрезвычайно мало [16], константа комплексообразования NMD с ДНК в данной работе полагается равной нулю. Таким образом, при отсутствии протекторного действия со стороны витамина на ДНК анализ фактора R_D для системы NOR-NMD-ДНК смысла не имеет.

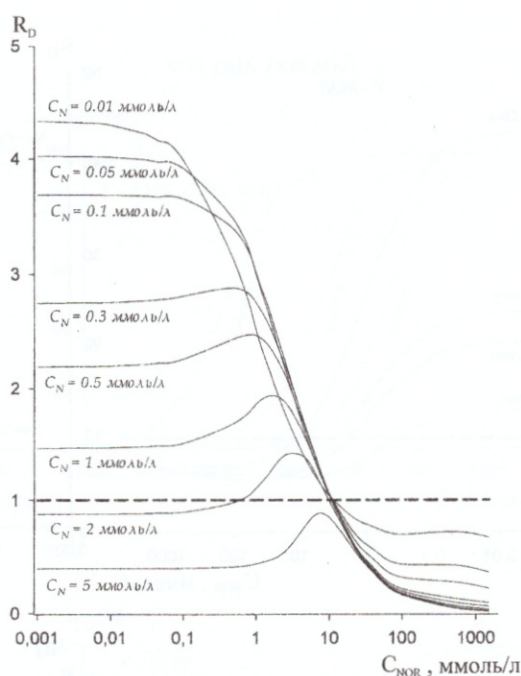


Рис. 1. Фактор R_D , как функция концентрации NOR (y_0) при изменении концентрации тетрамера (N_0) и фиксированной концентрации DAU ($x_0 = 0.01$ ммоль/л)

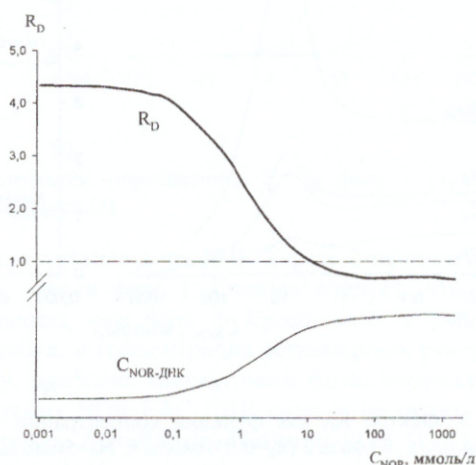


Рис. 2. Сравнительные графики зависимости концентрации комплексов NOR-d(TGCA)₂ $C_{NOR-ДНК}$ и R_D ($N_0=0.01$ ммоль/л) от концентрации NOR.

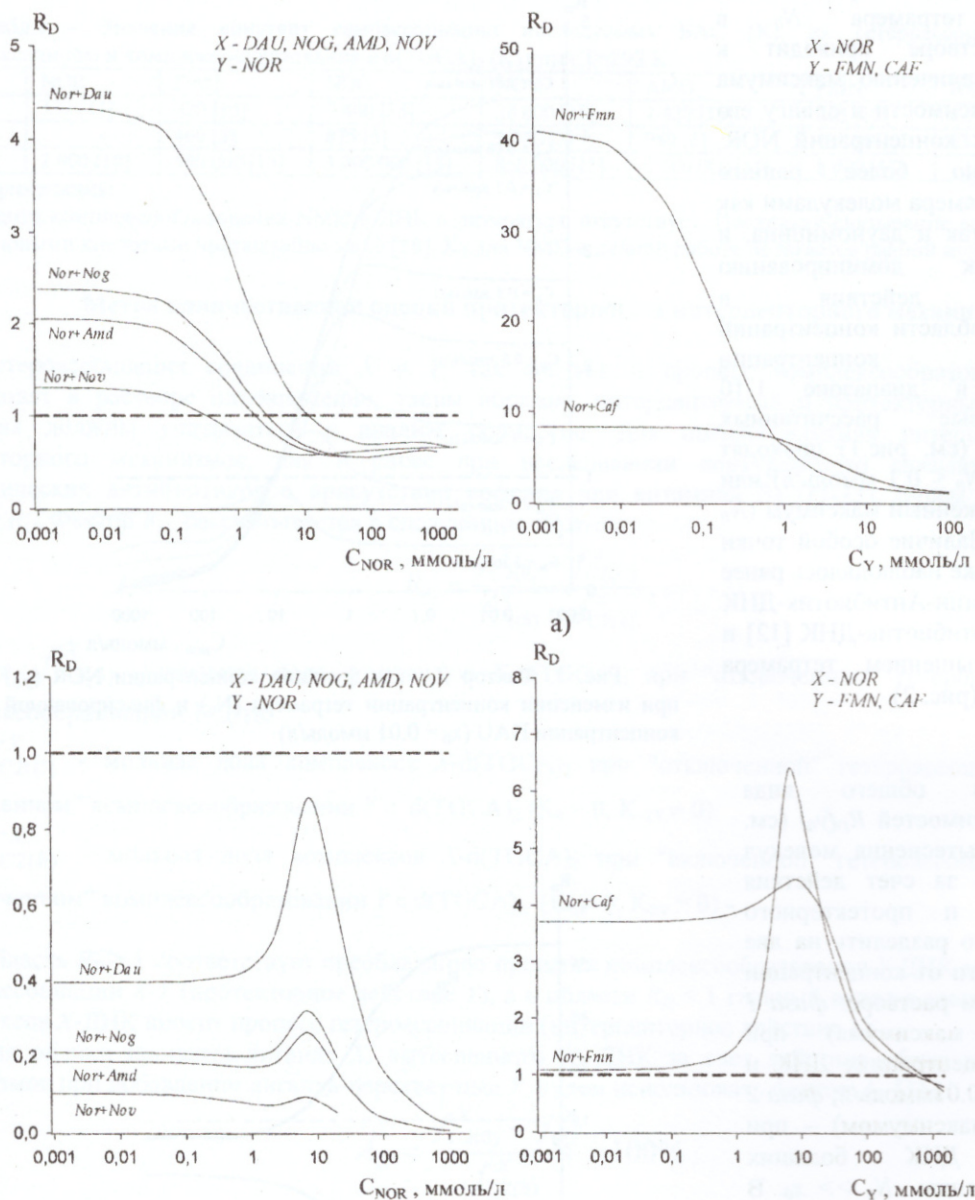


Рис. 3. Фактор R_D как функция концентрации перехватчика (Y): а) фаза 1 ($x_0=0.01$ ммоль/л; $N_0=0.01$ ммоль/л), б) фаза 2 ($x_0=0.01$ ммоль/л; $N_0=5$ ммоль/л).

Для всех исследованных комбинаций на рис. 3а пересечение кривой с осью R_D при $y_0 \rightarrow 0$ дает достаточно хорошую корреляцию между параметром R_D и константой гетероассоциации K_h в виде:

$$R_D \approx \frac{C}{K_h}, \quad (5)$$

где C некоторая константа, зависящая, как показывают расчеты, от типа лиганда-перехватчика Y . Выражение (5) согласуется с результатом, полученным ранее при исследовании систем "Антибиотик-CAF-ДНК" и "Антибиотик-FMN-ДНК" [12, 13].

Расчитанные зависимости A_D для исследуемых ароматических молекул представлены на рис. 4а для фазы 1, на рис. 4б для фазы 2.

Исследование связывания антибиотика норфлоксацина с ДНК ...

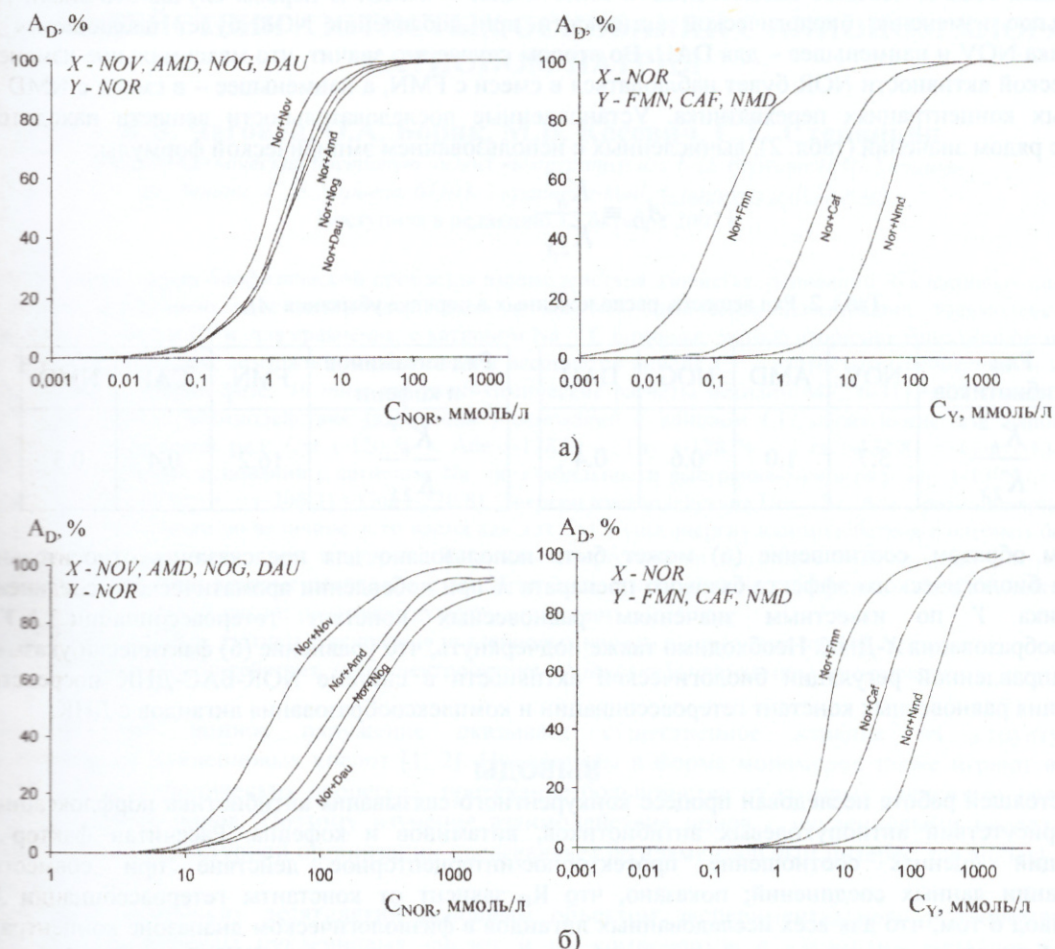


Рис. 4. Фактор A_D как функция концентрации перехватчика Y : а) фаза 1 ($x_0=0.01$ ммоль/л, $N_0=0.01$ ммоль/л), б) фаза 2 ($x_0=0.01$ ммоль/л, $N_0=5$ ммоль/л).

Из рис. 4 видно, что эффективное вытеснение лиганда X из ДНК в фазе 2 начинается только при концентрациях Y на один-два порядка больших, чем в фазе 1. Отсюда следует, что фаза 1 более привлекательна с точки зрения дальнейшего анализа, чем фаза 2. Кроме того, в работе [12] было показано, что концентрации лиганда, $x_0 = 0.01$ ммоль/л, и концентрация тетрамерных участков ДНК $N_0 = 0.01$ ммоль/л (т.е. фаза 1) являются, по-видимому, наиболее адекватными физиологическим условиям. Таким образом, дальнейший анализ фазы 2 в системах NOR-БАС-ДНК смысла не имеет. Аналогичный вывод был сделан ранее и по отношению к системам Антибиотик-Витамин-ДНК [13] и Антибиотик-Кофеин-ДНК [12]. Учитывая вышесказанное, из рис. 4а следует, что в *in vitro* эксперименте по комбинированному использованию антибиотика NOR совместно с другими ароматическими препаратами можно ожидать изменение биологической активности:

- > антиопухолевых антибиотиков при добавлении NOR в концентрациях $C_{NOR} \geq 0.1$ ммоль/л;
- > антибиотика NOR при добавлении рибофлавина в концентрации $C_{FMN} \geq 0.01$ ммоль/л;
- > антибиотика NOR при добавлении кофеина в концентрации $C_{CAF} \geq 0.1$ ммоль/л;
- > антибиотика NOR при добавлении никотинамида в концентрации $C_{NMD} \geq 1$ ммоль/л.

По отношению к кофеину полученный результат находится в согласии с известными *in vitro* экспериментами по комбинированному использованию CAF совместно с антибиотиками антрациклинового ряда [8]. Для остальных соединений полученные данные имеют предсказательную силу. Важно, однако, отметить, что полученные результаты справедливы только в том случае, если механизмы интерцепторного и протекторного действия дают основной вклад в наблюдаемый медико-биологический синергизм при совместном использовании ароматических лекарственных соединений.

Анализ кривых на рис. 4а свидетельствует о том, что абсолютное значение параметра A_D сильно зависит от концентраций молекул ДНК, лиганда X и перехватчика Y , однако последовательность расположения кривых на графике A_D для разных веществ остается неизменной. Таким образом, можно

сделать вывод, что последовательность размещения веществ по фактору A_D является функцией только равновесных констант ассоциации и комплексообразования. Анализ фактора A_D позволяет установить последовательность расположения лигандов по степени чувствительности к добавлению соединения-перехватчика: $NOV > AMD > NOG > DAU$ и $FMN > CAF > NMD$. В первом случае это значит, что максимальное изменение биологической активности при добавлении NOR будет наблюдаться для антибиотика NOV и наименьшее – для DAU. Во втором случае это значит, что максимальное изменение биологической активности NOR будет наблюдаться в смеси с FMN, а наименьшее – в смеси с NMD при одинаковых концентрациях перехватчика. Установленные последовательности веществ находятся в согласии с рядом значений (табл. 2), вычисленных с использованием эмпирической формулы:

$$A_D \equiv \frac{K_h^2}{K_{2X}} \quad (6)$$

Табл. 2. Ряд веществ, расположенных в порядке убывания A_D

Ряд антибиотиков	NOV	AMD	NOG	DAU	Ряд витаминов и кофеин	FMN	CAF	NMD
$\frac{K_h^2}{K_{2X}}$	3.7	1.0	0.6	0.4	$\frac{K_h^2}{K_{2X}}$	16.2	0.4	0.3

Таким образом, соотношение (6) может быть использовано для предсказания относительного изменения биологического эффекта базового препарата X при добавлении ароматического соединения-перехватчика Y по известным значениям равновесных констант гетероассоциации $X-Y$ и комплексообразования X -ДНК. Необходимо также подчеркнуть, что уравнение (6) фактически указывает способ направленной регуляции биологической активности в системе NOR-БАС-ДНК посредством варьирования равновесных констант гетероассоциации и комплексообразования лигандов с ДНК.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе исследован процесс конкурентного связывания антибиотика норфлоксацина с ДНК в присутствии антиопухолевых антибиотиков, витаминов и кофеина. Рассчитан фактор R_D , позволяющий оценить протекторное/интерцепторное действие при совместном использовании данных соединений; показано, что R_D зависит от константы гетероассоциации $X-Y$. Сделан вывод о том, что для всех исследованных лигандов в физиологическом диапазоне концентраций (фаза I) наблюдается доминирование протекторного механизма связывания с ДНК. Рассчитан фактор A_D – процент уменьшения доли комплексов X -ДНК в растворе при добавлении соединения Y . Показана его связь с константами гетероассоциации и комплексообразования лиганда с ДНК. Установлены граничные концентрации лигандов, при которых может наблюдаться эффект изменения биологической активности при их совместном использовании с норфлоксацином.

СПИСОК ИСПОЛЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Shen L.L. // Adv. Pharmacol. 1994. V.29A. P.285-304.
2. Wijnands W.J.A., Vree T.B. // J. Drug. Ther. Res. 1991. V.16. P.15-17.
3. Kamat A.M., deHaven J.I., Lamm D.L. // Obstetrics and Gynecology. - 1999. - V.54(1). - P.56-61.
4. Dozal A., Keyzer H., Kim H.K., Wang W.W. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2000. V.14. P.261-265.
5. Евстигнеев М.П., Рыбакова К.А., Дэвис Д.Б. // Физ. химия. 2007. Т.81. №5. С.923-929.
6. Pinto J., Huang Y., Pelliccione N. et al // Clin.Res. 1983. V.31. P.467.
7. Cakir S., Bicer E., Coskun E., Cakir O. // Bioelectrochem. 2003. V.60. P.11-19.
8. Traganos F., Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z. // Cancer Res. 1991. V.51. P.3682-3689.
9. Davies D.B., Veselkov D.A., Djimant L.N., Veselkov A.N // Eur. Biophys. J. 2001. V.30. P.354-366.
10. Евстигнеев М.П., Барановский С.Ф., Рыбакова К.А., Дэвис Д.Б. // Молекулярная биология. 2006. Т.40. №5. С.894-899.
11. Evstigneev M.P., Rybakova K.A., Davies D.B. // Biophys. Chem. 2006. V.121. P.84-95.
12. Evstigneev M.P., Khomich V.V., Davies D.B. // Eur. Biophys. J. 2006. V.36. P.1-11.
13. Evstigneev M.P., Mukhina Yu.V., Davies D.B. // Biophys.Chem. 2005. V.118. P.118-127.
14. Евстигнеев М.П., Рыбакова К.А., Дэвис Д.Б. // Биофизика. 2006. Т. 51. Вып. 4. С. 661-668.
15. Евстигнеев М.П. // Дис. докт.физ.-мат.наук: 03.00.02. Харьк. нац. унив. им. В.Н. Каразина. 2006. 341с.
16. Neault J.F., Naoui M., Manfait M., Tajmir-Riahi H.A. // FEBS Letters. 1996. V.382. P.26-30.