

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.113:541.49

¹Н ЯМР ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕТЕРОАССОЦИИИ НОГАЛАМИЦИНА С АРОМАТИЧЕСКИМИ АНТИОПУХОЛЕВЫМИ АНТИБИОТИКАМИ**М.П. Евстигнеев¹, А.О. Розвадовская¹, Д.Б. Дэвис²**¹ Кафедра физики Севастопольского национального технического университета Севастополь-99053, Украина; e-mail: max_evstigneev@mail.ru² Департамент биологических и химических наук Беркбек колледжа Лондонского университета, Великобритания
Поступила в редакцию 12 апреля 2005 г.

Методом одно- и двумерной ЯМР спектроскопии (500МГц) проведено исследование комплексообразования антибиотика ногаламицина (NOG) с антиопухолевыми антибиотиками дауномицином, митоксантроном и актиномицином D в водном растворе. Получены равновесные параметры гетероассоциации антибиотиков и построены наиболее вероятные структуры 1:1 гетерокомплексов в водном растворе. Показано, что NOG образует комплексы с ароматическими антибиотиками, характеризуемыми промежуточными энергетическими параметрами в сравнении с параметрами самоассоциации этих молекул. Сделаны выводы об особенностях структуры 1:1 гетерокомплексов антиопухолевых антибиотиков в растворе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гетероассоциация, ногаламицин, дауномицин, митоксантрон, актиномицин D.

В настоящее время в клинической практике одним из наиболее распространенных способов повышения эффективности медико-биологического действия различных противоопухолевых препаратов является использование их в комбинации с другими биологически активными соединениями [1,2]. Такой подход во многих случаях позволяет значительно снизить неизбежную при химиотерапии токсичность вводимых лекарственных препаратов на ткани организма, либо повысить эффективность противоопухолевого действия за счет биологического синергизма между компонентами комбинированной дозы.

В качестве базовых препаратов химиотерапии раковых заболеваний в настоящее время широкое распространение получили ароматические антибиотики: дауномицин (DAU), доксорубицин (DOX), ногаламицин (NOG), митоксантрон (NOV), актиномицин D (AMD) (рис.1), амсакрин (AMSA) и др. Практически все из перечисленных ароматических соединений при повышенных дозах проявляют высокую кардиотоксичность, что ограничивает их применение в клинической практике [1,2]. Однако риск кардиотоксичности может быть существенно снижен, либо медико-биологический эффект усилен при комбинировании этих антибиотиков с другими препаратами в дозе, и в частности, с различными антиопухолевыми ароматическими антибиотиками. Существует ряд свидетельств о высокой эффективности комбинаций DOX-AMD [3,4], NOV-DOX [5], а также комбинаций указанных антибиотиков с амсакрином [6,7] при лечении некоторых видов твердотельных опухолей и лейкомии.

В настоящее время не существует удовлетворительного объяснения наблюдаемому биологическому синергизму ароматических антибиотиков при комбинированной химиотерапии как на биологическом, так и на молекулярном уровне. Однако в определенных случаях некоторое представление о механизмах совместного действия ароматических лекарственных препаратов может быть получено. В частности, известно, что перечисленные выше ароматические антибиотики проявляют свое действие главным образом путем комплексообразования с ядерной ДНК в клетке [8], что дает основание считать процесс связывания данного антибиотика с молекулой нуклеиновой кислоты зависимым от присутствия другого антибиотика [9,10] и, следовательно, влияющим на их медико-биологическую активность. В то же время ароматические антибиотики проявляют сильную тенденцию к самоассоциации [11,12] и взаимной гетероассоциации [13] в растворе. Ранее взаимодействие антибиотиков с другими ароматическими молекулами уже рассматривалось различными авторами как один из возможных механизмов изменения биологической активности антиопухолевых антибиотиков *in vitro* [14,15]. Можно предположить, что гетероассоциация ароматических антибиотиков может давать определенный вклад в синергизм их медико-биологического действия при комбинированной терапии.

В настоящей работе проведено исследование гетероассоциации антиопухолевого антибиотика ногаламицина с антибиотиками дауномицином, митоксантроном и актиномицином D методом ¹H ЯМР спектроскопии. Получены структурные и термодинамические параметры комплексообразования антибиотиков и сделаны выводы о характере физических взаимодействий, ответственных за стабилизацию гетерокомплексов в растворе.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

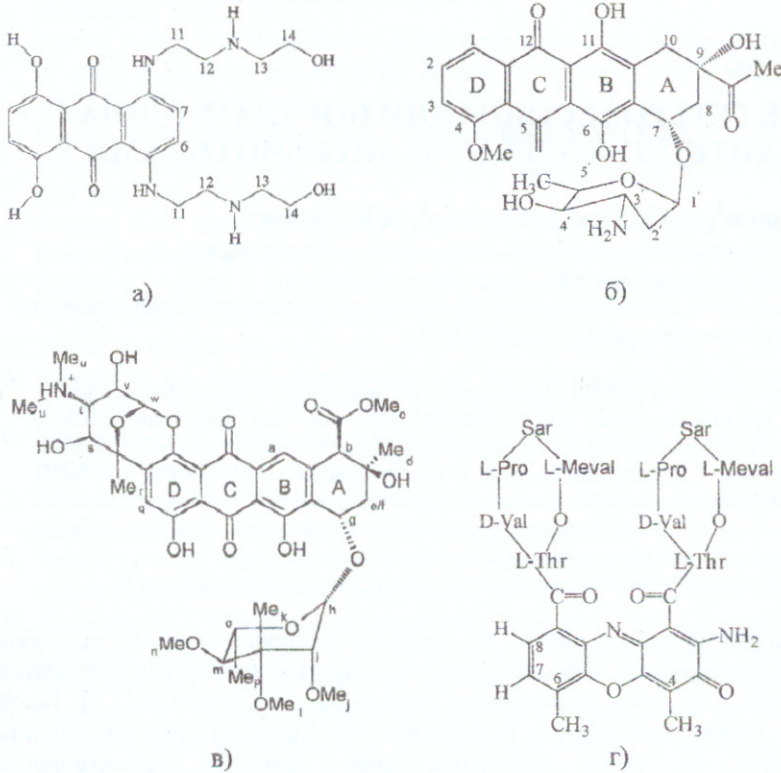


Рисунок 1 - Структурные формулы молекул новатрона (а), дауномицина (б), ногаламицина (в) и актиномицина D (г)

Антиопухолевые антибиотики дауномицин, ногаламицин, митоксантрон и актиномицин D (рис.1) фирмы "Sigma" растворяли в D_2O с изотопной чистотой 99.95% ("Sigma") и лиофилизовали. Растворы готовили путем добавления взвешенного количества образца в дейтерированном 0.1 М фосфатном буфере (pD = 7.1), содержащем 10^{-4} моль/л EDTA. 1М- и 2М- 1H ЯМР спектры измерены на спектрометре "Bruker DRX" с резонансной частотой 500 МГц. Концентрационные изменения протонных химических сдвигов молекул в смешанном растворе NOV-NOG и в NOG-DAU, NOG-AMD выполнены при фиксированной концентрации NOG ($C_{NOG} = 0.6$ мМ) и DAU/AMD ($C_{DAU} = 1.0$ мМ, $C_{AMD} = 0.22$ мМ) и варьируемой концентрации NOV и NOG соответственно (рис.2а, в качестве примера приведены

лишь зависимости для NOG-DAU и NOG-AMD). Температурные зависимости химических сдвигов протонов молекул в смешанных растворах измерены в диапазоне температур от 278К до 348К для системы NOG-DAU, от 306 до 348 К для NOV-NOG и от 278 до 311 К для NOG-AMD (рис.2б). Выбор рабочего интервала температур обусловлен необходимостью обеспечения условий растворимости исследованных молекул в растворе. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2 диметил-2-силапентан-5-сульфоикислота), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония (ТМА). Двумерные спектры гомоядерной корреляционной 1H ЯМР спектроскопии (2M-TOCSY и 2M-ROESY) использованы для полного отнесения сигналов необменивающихся протонов DAU, NOV, NOG и AMD. Методика приготовления образцов и проведения экспериментов описана в [16].

Построение наиболее вероятных структур гетерокомплексов исследованных молекулярных систем производилось с помощью методов молекулярной механики с использованием программы XPLOR. Методика построения структур подробно описана в работе [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модель для анализа экспериментальных данных.

Для анализа экспериментальных данных, как и ранее [13,18], использовали модель молекулярной гетероассоциации, учитывающей образование трех типов гетерокомплексов веществ X и Y в растворе с одинаковой равновесной константой гетероассоциации K_C : XY, XYX и YXY.

$$\left\{ \begin{array}{l} x_0 = \frac{x_1}{(1 - K_X x_1)^2} \left[1 + K_C \frac{y_1}{1 - K_Y y_1} + \frac{K_C^2}{2} \frac{y_1^2}{(1 - K_Y y_1)^2} + K_C^2 \frac{x_1 y_1}{(1 - K_Y y_1)(1 - K_X x_1)} \right] \\ \delta_X = \frac{x_1}{x_0} \left[\delta_{mX} \left(2(1 + K_X x_1) - \frac{1}{(1 - K_X x_1)^2} \right) + 2\delta_{dX} \left(\frac{1}{(1 - K_X x_1)^2} - 1 - K_X x_1 \right) + \right. \\ \left. + \delta_{cX} \frac{K_C y_1}{(1 - K_X x_1)^2 (1 - K_Y y_1)} \left(1 + \frac{K_C y_1}{2(1 - K_Y y_1)} + \frac{K_C x_1}{1 - K_X x_1} \right) \right] \end{array} \right. , \quad (1)$$

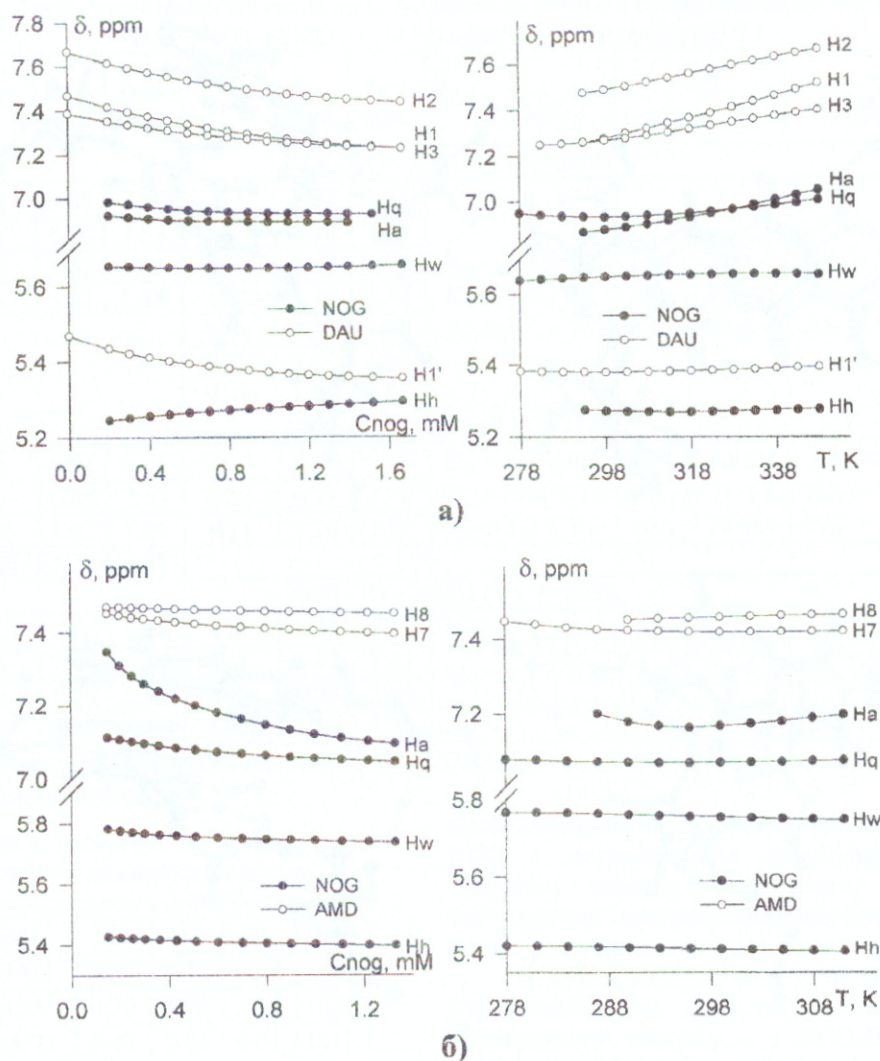


Рис.2 Концентрационные и температурные зависимости химических сдвигов протонов взаимодействующих молекул в системах NOG-DAU (а) и NOG-AMD (б)

где x_0 (или y_0), x_1 (или y_1) – общая и мономерная концентрации веществ X и Y , соответственно; K_X , K_Y – равновесные константы самоассоциации X и Y ; δ_{mX} (или δ_{mY}), δ_{dX} (или δ_{dY}), δ_{cX} (или δ_{cY}) – химический сдвиг в мономере, в димере и в 1:1 комплексе соответственно. В модели (1) параметры K_X (или K_Y), δ_{mX} (или δ_{mY}), δ_{dX} (или δ_{dY}) известны из ранее проведенных экспериментов по самоассоциации исследуемых веществ [19-21]. Следовательно, модель (1) содержит два неизвестных параметра K_{cX} (или K_{cY}), δ_{cX} (или δ_{cY}), которые могут быть найдены при помощи итерационной процедуры подгонки моделируемого (1) к экспериментально наблюдаемому химическому сдвигу (рис.2а) в зависимости от концентрации одной из компонент в растворе [13]. Термодинамические параметры – энтальпия ΔH и энтропия ΔS – могут быть найдены путем аналогичной вычислительной процедуры с использованием температурных кривых (рис.2б) и выражений (1), в которых равновесные константы само- и гетероассоциации аппроксимируются соотношением Вант-Гоффа [13]

$$K(T) = \exp(\Delta S / R - \Delta H / RT)$$

Расчетные параметры гетероассоциации NOG-DAU/NOV/AMD приведены в табл.1.

Анализ структуры гетерокомплексов ногаламицина с антибиотиками.

Предельные и индуцированные химические сдвиги молекул взаимодействующих веществ (табл.1) были использованы для расчета величины экранирования ($\Delta\delta_c = \delta_m - \delta_c$) ароматических протонов антибиотиков в составе 1:1 гетерокомплексов (табл.2), а также для построения структур 1:1 гетерокомплексов ногаламицина с антибиотиками в водном растворе (рис.3).

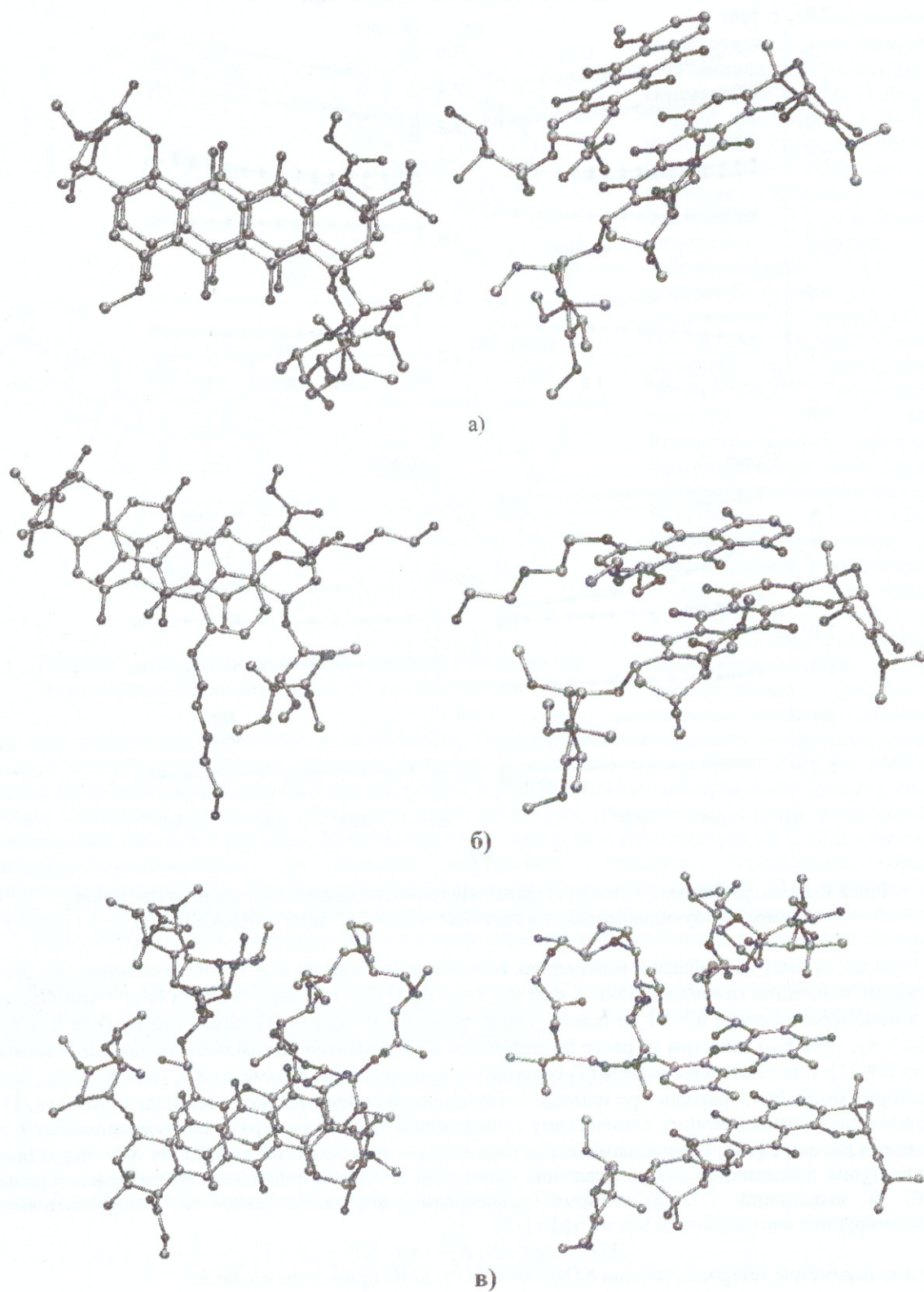


Рис.3. Структуры 1:1 гетерокомплексов нוגаламицина с антибиотиками:
(а) дауномицином, (б) митоксантроном, (в) актиномицином D

¹H ЯМР исследование гетероассоциации ногаламицина с ароматическими ...

Таблица 1. Параметры гетероассоциации ногаламицина (NOG) с ароматическими антибиотиками DАU, NOV, AMD в 0.1M Na-фосфатном буфере, рD 7.1

Протоны X	δ_{CX} , ppm	δ_{mX} , ppm	Протоны Y	δ_{CY} , ppm	δ_{mY} , ppm	K, $10^3 M^{-1}$	$-\Delta H$, кДж/моль	$-\Delta S$, Дж/моль·К
NOG (X) – DАU (Y), T=303K								
Hq	6.85	7.28	H2	7.27	7.83	$K_X = 5.9 \pm 1.2$ $K_Y = 0.6 \pm 0.1$ $K_C = 2.7 \pm 1.2$	$\Delta H_X = 30 \pm 4$ $\Delta H_Y = 34 \pm 6$ $\Delta H_C = 33 \pm 4$	$\Delta S_X = 27 \pm 4$ $\Delta S_Y = 60 \pm 15$ $\Delta S_C = 40 \pm 8$
Ha	6.80	7.53	H1	6.98	7.78			
Hw	5.62	5.81	H3	7.10	7.55			
Hh	5.22	5.48	H1'	5.27	5.52			
			4Me	3.73	4.02			
			H10e	2.65	3.05			
			H10a	2.46	2.81			
NOG (X) – NOV (Y), T=318K								
Hq	6.98	7.28	H6/7	7.11	7.68	$K_X = 3.3 \pm 0.6$ $K_Y = 12.4 \pm 4.0$ $K_C = 5.2 \pm 2.5$	$\Delta H_X = 30 \pm 4$ $\Delta H_Y = 31 \pm 3$ $\Delta H_C = 34 \pm 4$	$\Delta S_X = 27 \pm 4$ $\Delta S_Y = 19 \pm 5$ $\Delta S_C = 36 \pm 7$
Ha	6.85	7.53	H2/3	6.77	7.30			
Hw	5.67	5.81	H11	3.70	3.96			
Hh	5.25	5.48						
NOG (X) – AMD (Y), T=303K								
Hq	6.86	7.28	H8	7.37	7.51	$K_X = 5.9 \pm 1.2$ $K_Y = 1.1 \pm 0.2$ $K_C = 3.6 \pm 0.6$	$\Delta H_X = 30 \pm 4$ $\Delta H_Y = 32 \pm 6$ $\Delta H_C = 35 \pm 6$	$\Delta S_X = 27 \pm 4$ $\Delta S_Y = 47 \pm 11$ $\Delta S_C = 47 \pm 15$
Ha	7.49	7.53	H7	7.17	7.51			
Hw	5.80	5.81	6Me	1.93	2.59			
Hh	5.36	5.48	4Me	1.43	2.25			

Примечание: параметры самоассоциации (K, ΔH , ΔS) NOG, DАU, NOV, AMD взяты из работ [20], [20], [21], [19] соответственно.

Таблица 2. Расчетное экранирование протонов ногаламицина в составе 1:1 гетерокомплексов с антибиотиками

Система	Hq	Ha	Hw	Hh
NOG-DAU	0.43	0.73	0.19	0.26
NOG-NOV	0.30	0.68	0.14	0.23
NOG-AMD	0.42	0.04	0.01	0.12

экранирование протона Hq (0.43ppm), а в системе NOG-AMD оно наименьшее (0.04ppm) и значительно меньше экранирования протона Hq (0.42ppm). По-видимому, эта особенность обуславливает тот факт, что кривая протона Ha лежит ниже кривой Hq в системе NOG-DAU и выше в системе NOG-AMD (рис.2). В то же время слабое экранирование протона Ha в системе NOG-AMD является следствием смещения хромофоров NOG и AMD друг по отношению к другу (рис.3в), а повышенное экранирование Ha в системе NOG-DAU обусловлено сильным перекрыванием ароматических хромофоров в комплексе (рис.3а). Приведенные на рис.3 структуры также позволяют объяснить существенно различный характер изменений концентрационных кривых для протонов Hw и Hh – смещение положения резонанса этих протонов в область слабого поля в системе NOG-DAU и в область сильного поля в системе NOG-AMD – при увеличении концентрации NOG (рис.2). При низких концентрациях NOG молекулы преимущественно находятся в гетероассоциатах с DАU или AMD и, следовательно, испытывают сильное экранирование в NOG-DAU комплексе и слабое экранирование в NOG-AMD комплексе. При увеличении концентрации NOG происходит смещение динамического равновесия в сторону образования самоассоциатов NOG, что приводит к дезэкранированию протонов NOG и смещению их резонансных сигналов в область слабого поля в системе NOG-DAU. Данный эффект ранее не наблюдался при исследовании самоассоциации ногаламицина [20]. Интересно отметить, что расчетная структура гетерокомплекса NOG-DAU (рис.3в) характеризуется практически нулевым углом разворота хромофоров, в то время как в структуре димеров дауномицина и ногаламицина угол разворота составлял более 10 градусов [20]. По-видимому, это связано с отсутствием электростатического отталкивания сближенных в пространстве одноименно заряженных групп в структуре комплекса NOG-DAU в сравнении с димерами DАU и NOG [20].

Сравнительный анализ величины $\Delta\delta$ для протонов NOG в исследованных молекулярных системах позволяет сделать определенные суждения об особенностях комплексобразования молекул и о структуре гетерокомплексов в растворе.

Из табл.2 следует, что экранирование протона Ha ногаламицина существенно зависит от типа молекулярной системы – в NOG-DAU оно имеет наибольшее значение (0.73ppm) и превышает

Структура гетерокомплекса NOG-AMD (рис.3в) в настоящей работе получилась отличной от построенной ранее для аналога NOG – антибиотика дауномицина – в комплексе с AMD [22]. Последнее обусловлено стерическими препятствиями, создаваемыми положительно заряженным аминсахаром ногаламицина при образовании гетерокомплекса с AMD. Влияние аминсахара NOG также является ответственным за противоположную ориентацию хромофора NOV в комплексе с NOG (рис.3б) по сравнению со структурой комплекса DAU-NOV [17].

Анализ параметров гетероассоциации ногаламицина с антибиотиками.

Величина равновесной константы гетероассоциации NOG с DAU, NOV и AMD принимает промежуточное значение между равновесными константами самоассоциации молекул (табл.1). Превышение константы гетероассоциации над константами самоассоциации наблюдалось ранее только для систем, в которых имела место дополнительная стабилизация гетерокомплексов за счет образования межмолекулярной водородной связи [17,18]. Последнее дает основание предположить что во всех исследованных системах гетерокомплекс стабилизирован в основном за счет стэкинг взаимодействий хромофоров ароматических молекул, включающих в себя как дисперсионные взаимодействия ароматических токов молекул в комплексе, так и гидрофобные взаимодействия хромофоров при образовании агрегата. Аналогичный вывод следует и из анализа термодинамических параметров гетероассоциации (табл.1): отсутствие явного превышения ΔH_c , ΔS_c над соответствующими параметрами самоассоциации свидетельствует об отсутствии дополнительной стабилизации гетерокомплексов водородной связью, как это наблюдалось ранее в работах [17,18]. Вместе с тем в работе [17] при исследовании комплексообразования с митоксантроном аналога ногаламицина – антибиотика DAU – был установлен факт образования Н-связи в комплексе DAU-NOV. Как было отмечено выше, структура комплекса NOG-NOV отличается от DAU-NOV противоположной ориентацией хромофоров в гетерокомплексе, что объясняет отсутствие Н-связи в комплексе NOG-NOV.

Таким образом, проведенный структурный и термодинамический анализ гетероассоциации NOG с антибиотиками DAU, NOV, AMD показал, что антибиотик ногаламицин в водном растворе способен образовывать достаточно прочные гетероассоциаты с другими ароматическими антиопухолевыми антибиотиками. Этот факт необходимо учитывать при разработке оптимальных режимов комбинационной химиотерапии раковых заболеваний, основу которых могут составлять рассмотренные комбинации антибиотиков.

Выражаем благодарность Королевскому Обществу Великобритании (Royal Society) за предоставленный грант (ЕМП) на проведение ЯМР исследований в Беркбек колледже.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chu E., DeVita V.T. Physicians' cancer chemotherapy drug manual. L.: Jones and Bartlett Publ., 2003. 512p.
2. Stockley I.H. Stockley's Drug Interactions, 6 ed. L.: Pharm.Press, 2002. 1080p.
3. Blagosklonny M.V. // Leukemia. 1999. V.13. P.2031.
4. Dunst J., Ahrens S., Paulussen M., Rube C., Winkelmann W., Zoubek A., Harms D., Jurgens H. // Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 1998. V.42. P.379.
5. Bontenbal M., Planting A.S.T., Rodenburg C.J., Dees A., Verweij J., Bartels C.C.M., Alexievafigusch J., Vanputten W.L.J., Klijn J.G.M. // Breast Cancer Res. and Treatm. 1992. V.21. P.133.
6. Schaich M., Illmer T., Aulitzky W., Bodenstein H., Clemens M., Neubauer A., Repp R., Schakel U., Soucek S., Wandt H., Ehninger G. // Haematologica. 2002. V.87. P.808.
7. Bernier J.-L., Lohez M., Helbecque N., Hénichart J.-P. // Chem.-Biol. Inter. 1989. V.70. P.103.
8. Graves D.E., Velea L.M. // Curr. Org. Chem. 2000. V.4. P.915.
9. Blau L., Bittman R. // Mol. Pharm. 1975. V.11. P.716.
10. Davis L.M., Harvey J.D., Baguley B.C. // Chem.-Biol. Inter. 1987. V.62. P.45.
11. Chaires J.B., Dattagupta N., Crothers D.M. // Biochemistry. 1982. V.21. P.3927.
12. Angerman S.N., Danyluk S.S., Victor T.A. // Biochemistry. 1972. V.11. P.2402.
13. Veselkov A.N., Evstigneev M.P., Veselkov D.A., Davies D.B. // Biophys. Chem. 2005. V.117. P.10.
14. Larsen R.W., Jasuja R., Hetzler R., Muraoka P.T., Andrada V.G., Jameson D.M. // Biophys. J. 1996. V.70. P.443.
15. Ramu A., Mehta M.M., Liu J., Turyan I., Aleksic A. // Cancer Chemother. Pharm. 2000. V.46. P.449.
16. Davies D.B., Veselkov D.A., Djimant L.N., Veselkov A.N. // Eur. Biophys. J. 2001. V.30. P.354.
17. Veselkov A.N., Evstigneev M.P., Rozvadovskaya A.O., Hernandez Santiago A., Zubchenok O.V., Djimant L.N., Davies D.B. // J. Mol. Struct. 2004. V.701. P.31.
18. Davies D.B., Veselkov D.A., Kodintsev V.V., Evstigneev M.P., Veselkov A.N. // Mol.Phys. 2000. V.98. P.1961.
19. Davies D.B., Djimant L.N., Veselkov A.N. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1996. V.92. P.383.
20. Игон Р.Дж., Веселков Д.А., Барановский С.Ф., Осетров С.Г., Дымант Л.Н., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н. // Хим.физика. 2000. Т.9. С.98.
21. Веселков Д.А., Евстигнеев М.П., Дымант Л.Н., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н. // Хим.физика. 2001. Т.20. С.27.
22. Евстигнеев М.П., Розвадовская А.О., Зубченко О.В., Мухина Ю.В., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н. // Журн.орг.химии (в печати).