

УДК 536-33:541.49

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С АНТИБИОТИКОМ ТОПОТЕКАНОМ: АНАЛИЗ ПО ДАННЫМ ¹H ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ**А.А.Мосунов, А.С.Бучельников, М.П.Евстигнеев***Севастопольский национальный технический университет, Севастополь, Украина, 99053*e-mail: max_evstigneev@mail.ru

Поступила в редакцию 18 февраля 2011 г.

Принята 1 июня 2011 г.

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. Анализ проведен с учетом существования антибиотика в водной среде при физиологических рН в двух различных формах – лактонной и карбоксилатной. Получены равновесные константы гетероассоциации и индуцированные химические сдвиги протонов ТРТ (в лактонной и карбоксилатной формах) и БАС в составе комплексов. Установлено, что комплексообразование ТРТ-БАС носит характер стэкинга хромофоров, дополнительно стабилизируемого в случае профлавина межмолекулярными водородными связями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: топотекан, комплексообразование, гетероассоциация, интерцепторный, протекторный механизмы.

КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ АРОМАТИЧНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК З АНТИБІОТИКОМ ТОПОТЕКАНОМ: АНАЛІЗ ЗА ДАНИМИ ¹H ЯМР СПЕКТРОСКОПІЇ**А. А. Мосунов, А. С. Бучельников, М. П. Євстигнєєв***Севастопольський національний технічний університет, Севастополь, Україна, 99053*

У даній 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 дауноміцином, вітамінами флавін-моноклеотидом і нікотинамідом. Аналіз проведено з урахуванням існування антибіотика у водному середовищі при фізіологічних рН у двох різних формах - лактонної і карбоксилатної. Отримані рівноважні константи гетероасоціації і індуквані хімічні зсуви протонів ТРТ (у лактонній і карбоксилатній формах) і БАС у складі комплексів. Встановлено, що комплексоутворення ТРТ-БАС носить характер стекінгу хромофорів, додатково стабилизуемого у разі профлавина міжмолекулярними водневими зв'язками.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: топотекан, комплексоутворення, гетероасоціація, інтерцепторний, протекторний механізми.

COMPLEX FORMATION OF AROMATIC BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS WITH ANTIBIOTIC TOPOTECAN: ANALYSIS BY MEANS OF ¹H NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY**A.A.Mosunov, A.S.Buchelnikov, M.P. Evstigneev***Sevastopol National Technical University, 99053, Sevastopol, Ukraine*

In the present work with use of ¹H NMR spectroscopy data the analysis of heteroassociation of antibiotic topotecan (TPT) with aromatic biologically active compounds (BAC): caffeine, mutagens ethidium bromide and proflavine, antibiotic daunorubicin, vitamins flavin-mononucleotide and nicotinamide, is carried out. The analysis was performed taking into account the existence of the antibiotic in aqueous environment under physiological pH in two various forms – lactone and carboxylate. Equilibrium constants of heteroassociation and induced chemical shifts of TPT protons (in lactone and carboxylate forms) and the BACs within the complexes were obtained. It is found that the complex formation TPT-BAC is characterized by the stacking of the chromophores and additionally stabilized in case of proflavine by intermolecular hydrogen bond.

KEYWORDS: topotecan, complexation, heteroassociation, interceptor, protector mechanisms.

Ароматические биологически активные соединения (БАС) в настоящее время широко используются в качестве компонентов лекарственных препаратов для лечения многих видов заболеваний [1]. 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 [2]. Кроме этого, плоская структура хромофора способствует эффективному комплексообразованию ароматических молекул в водном растворе, характеризующему энергетически выгодной стопочной ориентацией хромофоров в составе комплексов (стэкинг-ассоциация), и проявляющейся в регистрируемых различными экспериментальными методами процессах само- и гетероассоциации ароматических БАС [3]. 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 на *in vivo* и *in vitro* уровнях изменения биологической активности ароматических БАС в присутствии других ароматических соединений (т.н. интерцепторный механизм действия) [3]. 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 [4] и витамином В₂ [5], причем авторы процитированных работ связывают этот эффект именно с процессами комплексообразования с ДНК и гетероассоциацией. Помимо кофеина и витамина В₂, существует также ряд свидетельств того, что активность ТРТ может изменяться в присутствии и других ароматических БАС [6], однако удовлетворительного объяснения этому факту дано не было. Учитывая указанную выше специфическую особенность ароматических молекул интеркалировать в ДНК и образовывать комплексы с другими ароматическими соединениями, можно предположить, что гетероассоциация ТРТ-БАС является одним из возможных механизмов, дающих вклад в наблюдаемый медико-биологический синергизм при их совместном использовании. Необходимо, однако, отметить, что до сих пор исследования гетероассоциации ТРТ-БАС не проводились за исключением единственной известной нам работы [4], в которой гетероассоциация с кофеином (в контексте интерцепторного механизма) была изучена методом спектрофотометрии и микрокалориметрии.

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-мононуклеотидом (FMN) и никотинамидом (NMD). Основной физико-химической особенностью молекулы топотекана является наличие лактонного кольца E, гидролизующегося при нейтральных pH из лактонной (Lact) в карбоксилатную (Carb) форму (рис. 1), причем в окрестности физиологического pH~7 соотношение двух форм в водном растворе примерно 50:50, и именно лактонная форма обладает выраженным биологическим действием [7]. Подавляющее большинство известных нам литературных данных по антибиотику ТРТ было получено на лактонной, либо карбоксилатной формах в «чистом виде», т.е. при кислых или слабо щелочных pH, отличных от стандартных физиологических условий. Вместе с тем, при

введении данного препарата в организм необходимо учитывать одновременное существование этих двух форм антибиотика. В связи с этим в настоящей работе было проведено исследование комплексообразования в системах ТРТ-БАС при нейтральных рН с учетом одновременного сосуществования в растворе Lact и Carb форм антибиотика.

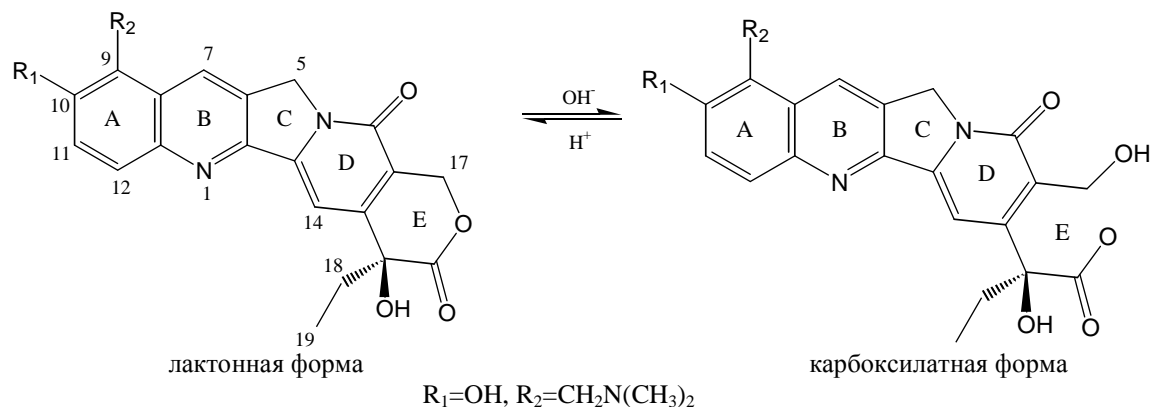


Рис. 1. Гидролиз топотекана из лактонной в открытую форму в зависимости от кислотности среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ЯМР эксперимент

Все исследуемые соединения (рис. 2) были приобретены у фирмы “Sigma”, за исключением топотекана (фирма “Molekula”), растворялись в D_2O с изотопной чистотой 99.95% (“Sigma”) и лиофилизировались. 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 измерения протонных химических сдвигов молекул в смешанном растворе выполнялись при температуре 298К, поддерживая постоянной концентрацию ТРТ (0.77 mM) на уровне, соответствующем пределу растворимости антибиотика в выбранных условиях, и варьируя концентрацию БАС в диапазоне, соответствующем их растворимости. Такая экспериментальная стратегия была выбрана по причине сравнительно узкого рабочего диапазона концентраций ТРТ (<2mM) и необходимости отслеживания одновременно двух наборов пиков спектра ТРТ, соответствующих лактонной и карбоксилатной формам. Исключением из этого стала лишь система ТРТ-FMN, исследованная в кислой (pD 5.78) и слабощелочной (pD 7.4) среде с целью выделения Lact и Carb форм в «чистом виде» и, следовательно, допускающая варьирование концентрации ТРТ при фиксированной концентрации FMN (1.165 mM).

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-сульфо кислота), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония (ТМА).

Выделение различных структурных форм топотекана

Как указывалось во введении, исследуемые системы ТРТ-БАС являются трехкомпонентными: Lact-Carb-БАС, что находит отражение в наличии трех четко выраженных наборов пиков в ЯМР спектрах всех рассмотренных систем (в качестве примера на рис. 3 изображен фрагмент ЯМР спектра системы ТРТ-PF). Равновесие двух форм антибиотика в растворе зависит от типа добавленного ароматического соединения, в связи с чем в настоящей работе концентрации Carb и Lact форм ТРТ определялись по соотношению интенсивностей их сигналов (интегралов от пика) при условии постоянства общей концентрации ТРТ в растворе. Интегрирование пиков производилось по трем ароматическим протонам антибиотика: Н7, Н14, Н11, которые, как правило, могли быть наиболее надежно идентифицированы в ЯМР спектрах, и полученные результаты далее усреднялись.

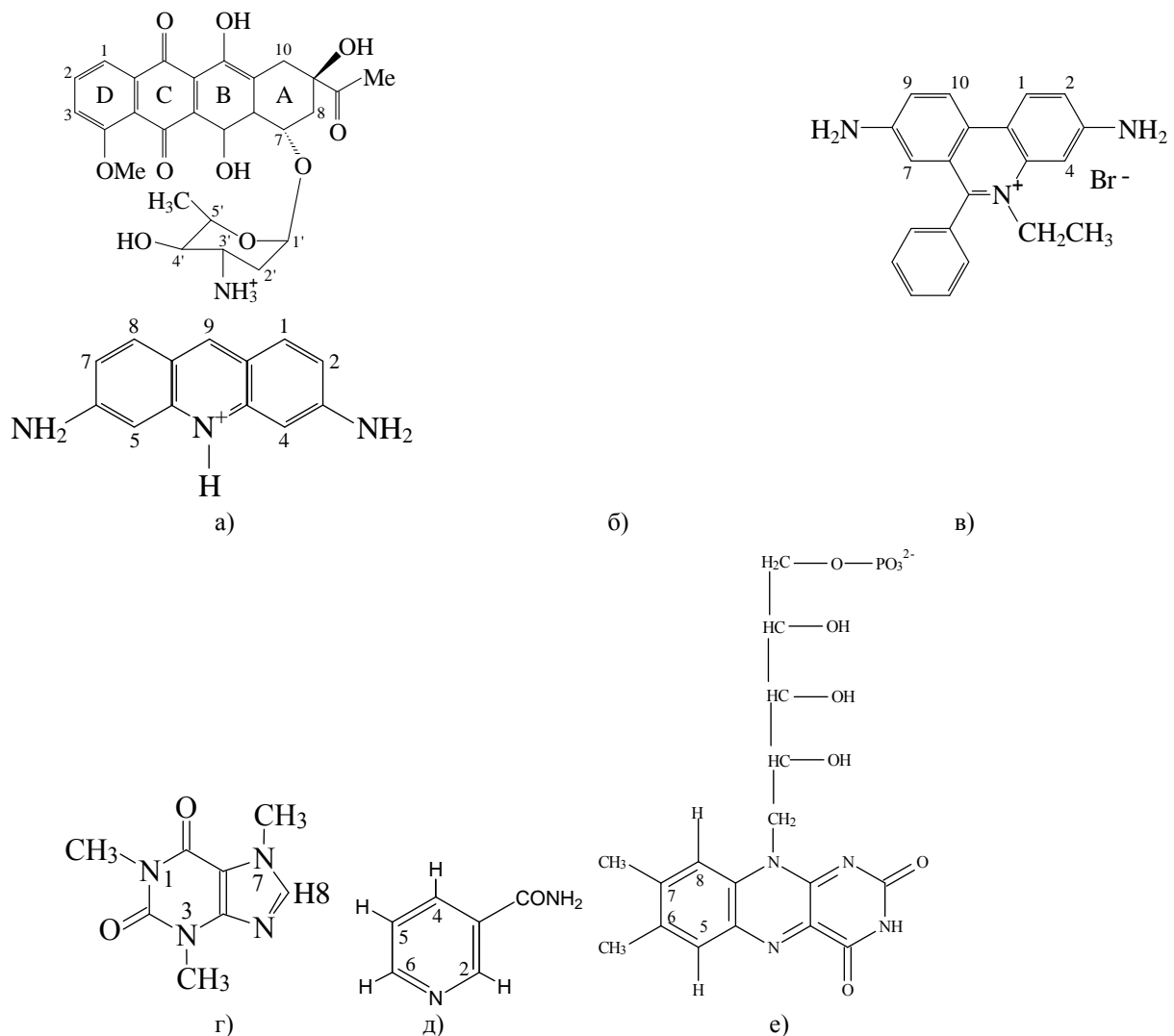


Рис. 2. Структурные формулы исследованных молекул БАС: а) дауномицин, б) бромистый этидий, в) профлавин, г) кофеин, д) никотинамид, е) флавиномононуклеотид.

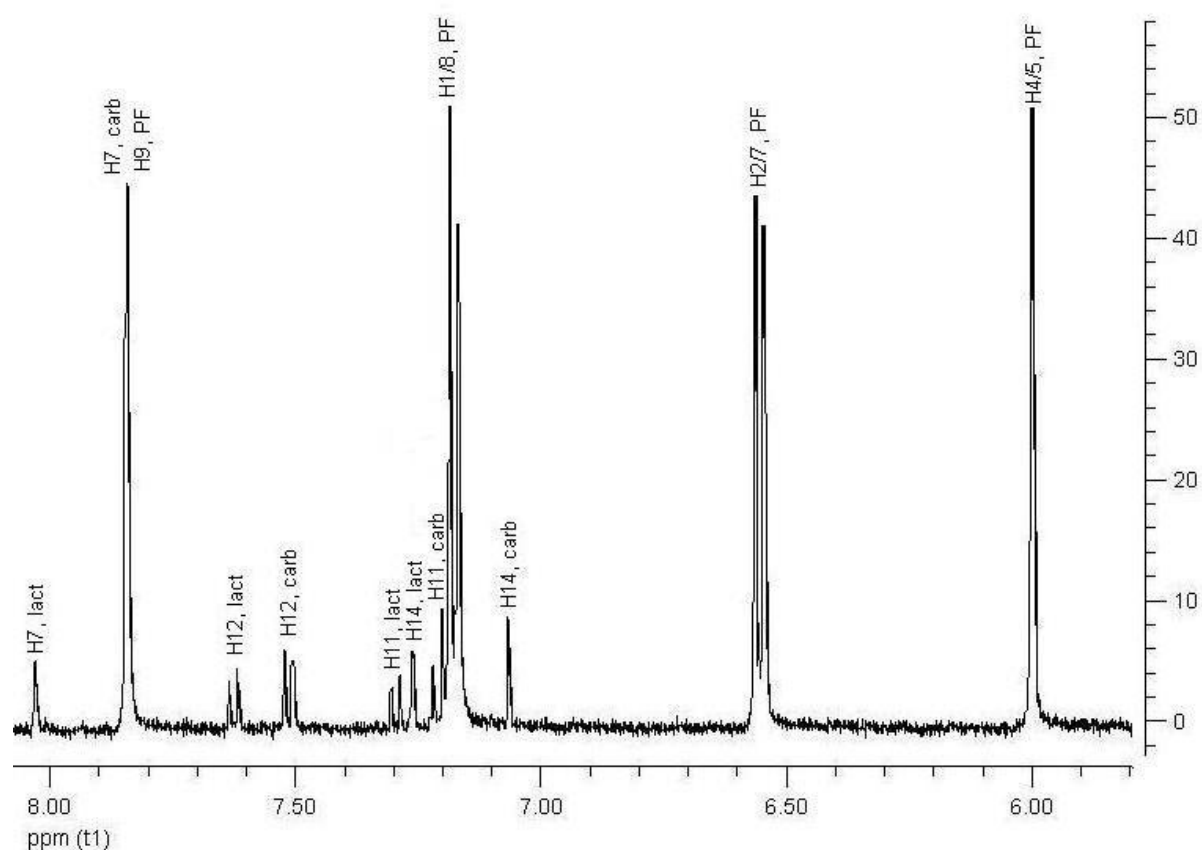


Рис. 3. Фрагмент экспериментального одномерного спектра смешанного раствора топотекана и профлавина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе определение параметров гетероассоциации ТРТ-БАС производилось по полному набору ароматических протонов как антибиотика, так и БАС. В качестве примера на рис. 4 приведены экспериментальные концентрационные зависимости сигналов протонов профлавина и топотекана в смешанном растворе PF-ТРТ (характер изменения кривых для всех других исследованных систем является аналогичным). Из рис. 4 следует, что по мере увеличения концентрации PF (при фиксированной концентрации ТРТ), ароматические протоны обоих 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 [3]. На возможность гетероассоциации ТРТ посредством стэкинга ароматических хромофоров также указывают результаты работ [8,9], в которых монотонное смещение химических сдвигов протонов антибиотика в область сильного поля было отмечено при исследовании самоассоциации ТРТ и его комплексообразования с олигонуклеотидами. Принимая во внимание высокие концентрации взаимодействующих молекул, используемые в ЯМР эксперименте (миллимоли) и предполагающие агрегацию более высокого порядка, чем димеры, полученный результат дает основание для использования модели комплексообразования ТРТ-БАС, учитывающий вероятность образования всех возможных типов гетерокомплексов в трехкомпонентной системе Carb-Lact-БАС. Однако существование ТРТ в растворе в двух различных формах накладывает свое ограничение на выбор модели, используемой для анализа двух наборов экспериментальных кривых: по протонам ТРТ и по протонам БАС.

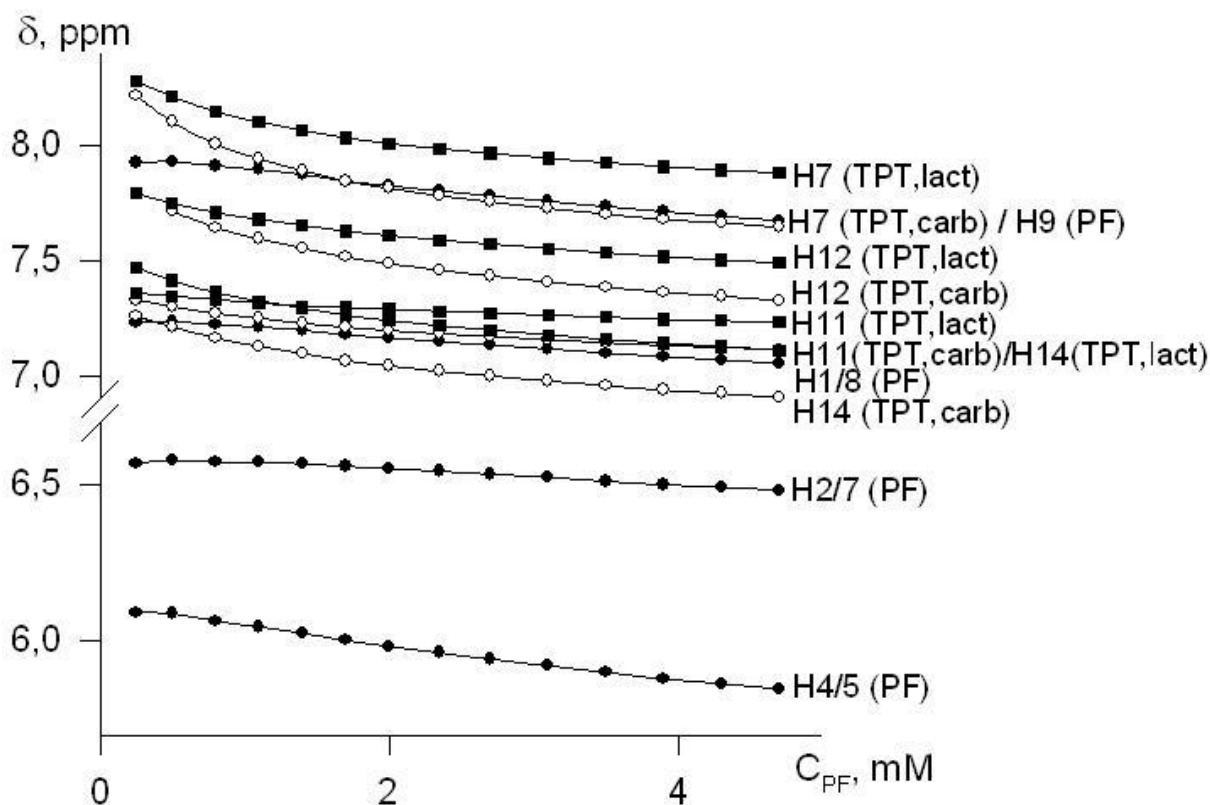


Рис. 4. Экспериментальные концентрационные зависимости сигналов протонов топотекана и профлафина в смешанном растворе PF-TPT.

Для анализа концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов карбоксилатной и лактонной форм топотекана использовалась матричная модель N -компонентной гетероассоциации [10] при условии $N=3$. Данная модель предоставляет конечные выражения для расчета протонного химического сдвига и закона сохранения массы в матричном виде, что позволяет реализовать вычислительное ядро модели в среде MatLAB, оптимизированной под матричные вычисления и, следовательно, существенно сокращающей общее время расчета. Входными данными для расчета выступали экспериментальные концентрационные кривые, предельные (δ_m) и индуцированные в димере (δ_d) химические сдвиги Lact и Carb форм, константы самоассоциации Lact и Carb форм (K_s) – из работы [11], а также параметры самоассоциации молекулы БАС – из работы [3]. Искомыми параметрами, определяемыми из условия минимума функции невязки (суммы квадратов отклонения расчетных от экспериментальных значений химических сдвигов), выступали константы гетероассоциации БАС-Lact, БАС-Carb и индуцированные химические сдвиги в составе этих комплексов (δ_c). Алгоритм проведения вычислительного эксперимента в точности соответствует стандартной схеме анализа гетероассоциации, детально описанной в работе [3]. Следует, однако, отметить, что исследование трехкомпонентной системы с учетом агрегации высокого порядка не является тривиальным и ранее не проводилось. С целью верификации результатов вычислений, для отдельных протонов дополнительно проводился аналогичный расчет но в рамках значительно более ресурсоемкой N -компонентной стохастической модели [12]. Подтверждение надежности расчетных параметров гетероассоциации осуществлялось путем реализации различных стратегий расчета: 1) расчет по каждому протону, 2) расчет по

всем протонам сразу, но для одного вещества, 3) расчет по всем протонам всех трех веществ сразу для полной системы Carb-Lact-БАС.

Результаты расчетов химических сдвигов протонов ТРТ в составе комплексов с БАС представлены в таблице 1. Расчетные значения констант гетероассоциации были получены с большой погрешностью ~50% и по этой причине не приведены в таблице 1. Этот результат является вполне ожидаемым, поскольку ранее неоднократно отмечалось, что в стандартной реакции бимолекулярной гетероассоциации $X+Y \leftrightarrow XY$ расчет по протонам вещества, концентрация которого поддерживается постоянной (в данном случае - топотекан), как правило сопровождается высокой погрешностью определения констант комплексообразования.

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 параметров комплексообразования Carb-БАС и Lact-БАС, и, следовательно, рассматривающей ТРТ как однокомпонентную систему (более подробное обсуждение адекватности такого подхода будет дано ниже). Учитывая сказанное, расчет параметров комплексообразования ТРТ-БАС по протонам БАС в настоящей работе проводился в рамках двухкомпонентной модели [13], в строгом виде учитывающей специфические эффекты, возникающие при учете гетероассоциации более высокого порядка, чем димеры. Входные параметры модели такие же, как и в использованной выше матричной модели, выходные параметры - константа гетероассоциации (K_c) и химический сдвиг (δ_c) в составе комплекса ТРТ-БАС. Алгоритм минимизации отклонения расчетных от экспериментальных кривых аналогичен использованному выше при анализе протонов топотекана. Результаты расчетов параметров гетероассоциации ТРТ-БАС по протонам БАС представлены в таблице 2.

Табл. 1. Расчетные значения химических сдвигов протонов Lact и Carb форм топотекана в составе гетерокомплексов с ароматическими БАС при $T=298K$.

Протон ТРТ	δ_c , млн ⁻¹		$\Delta\delta_c$, млн ⁻¹	
	Lact	Carb	Lact	Carb
PF				
H7	8,25	8,11	0,56	0,63
H12	7,80	7,66	0,42	0,49
H11	7,47	7,30	0,18	0,26
H14	7,32	7,13	0,36	0,48
EB				
H7	8,32	8,29	0,49	0,45
H12	7,46	7,37	0,76	0,78
H14	7,41	7,23	0,27	0,38
DAU				

H7	7,30	7,28	0,51	0,46
H12	7,13	7,20	1,09	0,95
FMN				
H7	8,66	8,50	0,15	0,24
H12	8,04	7,91	0,18	0,24
H11	7,06	7,47	0,05	0,09
H14	7,48	7,42	0,20	0,19
CAF				
H7	7,48	7,44	1,33	1,30
H12	7,55	7,55	0,67	0,60
H11	7,47	-	0,18	-
H14	7,36	7,54	0,08	0,07

Примечания: 1) для EB и DAU расчет по протонам H11 и H11/H14 топотекана, соответственно, не является надежным в связи с перекрытием этих сигналов с сигналами протонов БАС; 2) расчет по протонам ТРТ в системе ТРТ-NMD не является надежным в связи с их малым экранированием от одноколечного витамина

Табл. 2. Расчетные значения параметров гетероассоциации топотекана с ароматическими БАС при $T=298\text{K}$.

Протон БАС	δ_c , млн ⁻¹	$\Delta\delta_c$, млн ⁻¹	K_s , л/моль	K_c , л/моль	f_c
PF-ТРТ					
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-ТРТ					
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-ТРТ					
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			
H8e	2,45	-0,17			
H1'	5,50	0,05			

NMD-TPT					
H2	8,56	0,37	0,73±0,05	45±10	1,2
H6	8,50	0,20			
H4	7,86	0,38			
H5	7,53	0,06			
FMN-TPT (pD 5.78)					
H8	7,40	0,59	265±38	1300±200	24,2
H5	7,26	0,74			
7Me	2,23	0,36			
6Me	2,16	0,33			
FMN-TPT (pD 7.4)					
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					
H8	7,72	0,17	11,8±0,3	320±30	7,7
7Me	3,82	0,13			
3Me	3,30	0,24			
1Me	3,15	0,20			

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ параметров гетероассоциации на основании данных магнитного экранирования протонов топотекана

Анализ абсолютных (δ_c) и индуцированных ($\Delta\delta_c = \delta_m - \delta_c$) значений химических сдвигов протонов ТРТ в комплексах с ароматическими БАС (см. Таблицу 1) позволяет сделать вывод о преимущественном экранировании протонов антибиотика ($\Delta\delta_c > 0$) в обеих формах. Этот результат соответствует ожидаемому экранированию протонов в составе стэкинг-комплексов ароматических молекул и согласуется с отмеченным выше замечанием о том, что экспериментальные концентрационные зависимости протонных химических сдвигов ТРТ монотонно смещаются в область сильного поля (т.е. преимущественно экранируются). Представление о стэкинг-ассоциации также согласуется с выводами единственной известной нам работы по гетероассоциации с участием ТРТ [4], независимо подтверждающей стэкинг ТРТ и САФ по характерным батохромному и гипохромному сдвигам электронного спектра поглощения ТРТ, а также по достаточно высокому отрицательному значению энтальпии реакции гетероассоциации.

Другая закономерность, вытекающая из анализа значений $\Delta\delta_c$, заключается в том, что характер изменения индуцированного химического сдвига по исследованным протонам ТРТ оказывается качественно аналогичным в Lact и Carb формах. Это означает, что существенного различия в структурах 1:1 гетерокомплексов Lact-БАС и Carb-БАС, по-видимому, нет. Этот вывод также косвенно подтверждается тем, что константы самоассоциации этих двух форм антибиотика совпадают в пределах погрешности их определения [11]. Более того, расхождение констант гетероассоциации Lact-БАС и Carb-БАС (получаемые, как указывалось выше, с большой погрешностью)

оказывается в среднем намного меньше чем погрешность их определения, что также косвенно свидетельствует о несущественном различии в структуре и энергетике комплексообразования двух форм топотекана с ароматическими БАС. Этот результат, в целом, дает возможность не дифференцировать равновесие молекул топотекана в растворе на лактонную и карбоксилатную формы при анализе данных эксперимента по протонам БАС, не «чувствующих» это различие в силу усредненного характера химического сдвига. Следует, однако, отметить, что среди всех рассматриваемых протонов ТРТ наибольшее различие в $\Delta\delta_c$ наблюдается для протона Н14. Этот протон наиболее близок к кольцу Е, претерпевающему гидролиз, что, по-видимому, и оказывает влияние на расчетные значения магнитного экранирования.

Для дополнительного подтверждения вывода о структурном и термодинамическом подобии систем Lact-БАС и Carb-БАС в настоящей работе был проведен эксперимент по титрованию топотекана витамином флавин-мононуклеотидом в условиях, заведомо предполагающих доминирование в растворе какой-либо одной из форм антибиотика: рD 5.78 – лактонная форма, рD 7.4 – карбоксилатная форма (таблица 2). Как и предполагалось, константы гетероассоциации в этих системах совпадают в пределах погрешности. Интересно отметить, что в среднем лактонная форма создает заметно большее экранирование протонов лиганда, чем карбоксилатная (см. таблицу 2). Этот результат находится в согласии с установленным в работе [11] бóльшим экранированием ароматических протонов в димере Lact, нежели Carb форм. По-видимому, полученные результаты являются следствием вполне ожидаемого снижения насыщенности электронной системы ароматического хромофора ТРТ при гидролизе лактонного кольца.

Анализ данных по магнитному экранированию протонов ТРТ, представленных в таблице 1, позволяет выделить еще одну важную особенность исследуемых систем. Протоны ТРТ Н11, Н12, Н7 и Н14 «разбросаны» по четырем кольцам хромофора антибиотика, в то время как ароматические БАС в структуре хромофора содержат от одного (NMD) до четырех (DAU) колец. Трехколечные лиганды PF, EB FMN характеризуются тем, что наиболее сильно удаленные друг от друга протоны Н11, Н7 и Н14 оказываются экранированными, но в то же время едва ли могут быть «перекрыты» хромофорами этих лигандов для обеспечения наблюдаемого в эксперименте химического сдвига. Это означает, что, по всей вероятности, существует два варианта посадки указанных БАС на ТРТ, в каждом из которых перекрывается либо кольцо А, либо кольцо D топотекана – т.н. «двухсайтовое» связывание. Детальный структурный и термодинамический анализ двухсайтового связывания ТРТ-FMN был выполнен в работе [14], продемонстрировавшей незначительное различие в параметрах образования двух типов комплексов FMN с ТРТ. Расчеты по двухсайтовой модели [14] в настоящей работе показали, что равновесные константы гетероассоциации ТРТ с EB и PF также не различаются в пределах погрешности (данные не приведены). Дальнейшее надежное определение структур двух типов комплексов на основании полученных данных достаточно проблематично, и, на наш взгляд, не представляет особого интереса.

Анализ параметров гетероассоциации на основании данных магнитного экранирования протонов БАС

Анализ расчетного экранирования по протонам БАС (см. таблицу 2) свидетельствует об эффекте экранирования ($\Delta\delta_c > 0$) и подтверждает сделанный выше вывод о стэкинг-характере комплексообразования ТРТ-БАС. 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, меньшее расстояние в гетерокомплексе. Ранее похожий эффект наблюдался при замене аминогрупп PF на массивные диметильные группы акридинового оранжевого [15], а также при последовательной замене боковых групп бромистого этидия на азидо-группы [16], в исследовании гетероассоциации указанных соединений с антибиотиком дауномицином.

Расчетные константы гетероассоциации по всем исследованным системам принимают промежуточные положения между константами самоассоциации ТРТ ($K_{\text{ТРТ}}=3800 \text{ M}^{-1}$ [11]) и соответствующего лиганда. Считается, что основной вклад в энергетику комплексов ароматических молекул дают гидрофобные, ван-дер-ваальсовы и электростатические взаимодействия [17]. Однако в некоторых системах может наблюдаться дополнительная стабилизация комплексов за счет межмолекулярных водородных связей или взаимодействий по типу «перенос заряда» [3,18]. Для оценки вероятности дополнительной стабилизации гетерокомплексов X-Y по сравнению с самоассоциатами ароматических соединений X и Y в работе [18] был предложен

критерий $f_c = \frac{K_c}{K_x + K_y + K_c}$, причем для реакций комплексообразования в водной

среде, удовлетворяющих условию $f_c > 35\%$, с высокой степенью вероятности может ожидать дополнительная стабилизация гетерокомплексов за счет межмолекулярных водородных связей. Как следует из таблицы 2, 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, выходящего за рамки настоящей работы.

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.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе выполнен анализ гетероассоциации антибиотика топотекана с ароматическими биологически активными соединениями в контексте интерцепторного механизма действия БАС на связывание ТРТ с ДНК. Впервые анализ комплексообразования ТРТ проведен с учетом существования антибиотика в водной среде при физиологических pH одновременно в двух различных формах – лактонной и карбоксилатной. Получены равновесные константы гетероассоциации и индуцированные химические сдвиги протонов ТРТ (в лактонной и карбоксилатной формах) и БАС в составе комплексов. Установлено, что комплексообразование ТРТ-БАС носит характер стэкинга хромофоров, дополнительно стабилизируемого в случае PF межмолекулярными водородными связями.

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

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Chu E., DeVita V.T. Physicians' cancer chemotherapy drug manual. - L.: Jones and Bartlett Publ., 2003. - 512 p.
2. Graves D.E., Velea L.M. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids // *Curr. Org. Chem.* - 2000. - V.4. - P.915-928.
3. Evstigneev M.P. DNA-binding aromatic drug molecules: Physico-chemical interactions and their biological roles. - Lambert Academic Publishing., 2010. - 96 p.
4. Traganos F., Kapuscinski J., Gong J., Ardelt B., Darzynkiewicz R. J., Darzynkiewicz Z. Caffeine prevents apoptosis and cell cycle effects induced by camptothecin or topotecan in HL-60 cells // *Cancer Res.* - 1993. - V.53. - P.4613 - 4618.
5. Lantushenko A.O., Mosunov A.A., Darzhinkevich Z., Evstigneev M.P. Protektornoe dejstvie vitamina B2 po otnosheniju k antibiotiku topotekanu in vitro // *Fizika zhivogo.* - 2007. - T.15. - S.18-23.
6. Bernacki R.J., Pera P., Gambacorta P., Brun Y, Greco W.R. In vitro antitumour activity of 9-Nitro-camptothecin as a single agent and in combination with other antitumour drugs // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* -2000. - P.293-297.
7. Gabr A., Kuin A., Aalders M. Cellular pharmacokinetics and cytotoxicity of camptothecin and topotecan at normal and acidic pH // *Cancer Res.* - 1997. - V.57. - P.4811-4816.
8. Mazzini S., Bellucci M.C., Dallavalle S., Fraternali F., Mondelli R Mode of binding of camptothecins to double helix oligonucleotides // *Org. Biomol. Chem.* - 2004. - V.2. - P.505-513.
9. Bocian W., Kaweck R., Bednarek E., Sitkowski J., Pietrzyk A., Williamson M.P., Hansen P. E., Kozerski L. Multiple binding modes of the camptothecin family to DNA oligomers // *Chem. Eur. J.* - 2004. - V.10. - P. 5776-5787.
10. Buchel'nikov A.S., Evstigneev V.P. Modelirovanie mnogokomponentnogo ravnovesija biologicheski aktivnyh aromatcheskih molekul v vodnom rastvore // *Vestnik SevNTU (serija Fizika i matematika).* - 2009. - Vyp. 99. - S.3-11.
11. Mosunov A.A., Simonova S.N., Rozvadovskaja A.O. Issledovanie samoassociacii antibiotika topotekana // *Vestnik SevGTU (serija Fizika i matematika).* - 2007. - T.85. - S.54-58.
12. Evstigneev M.P., Evstigneev V.P., Davies D.B. A method for analysis of multicomponent systems of interacting aromatic molecules in solution // *J. Chem. Phys.* - 2007. - V. 127. - P. 154511-7.
13. Evstigneev V.P., Mosunov A.A., Evstigneev M.P. Reshenie zadachi ob odnomernoj nekooperativnoj samosborke nevalentnogo tipa v dvuhkomponentnoj sisteme // *Him. fizika (napravlena v pechat').*
14. Evstigneev V.P. Mnogokomponentnye vzaimodejstvija aromatcheskih biologicheski aktivnyh soedinenij i DNK v vodnom rastvore: dis. kandidata fiz.-mat. nauk: 03.00.02 / Evstigneev Vladislav Pavlovich. - H., 2009.
15. Davies D.B., Veselkov D.A., Kodintsev V.V., Evstigneev M.P., Veselkov A.N. ¹H NMR investigation of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution: factors involved in the stabilization of complexes of daunomycin and acridine drugs // *Molecular Phys.* - 2000. - Vol.98, №23. - P.1961-1971.
16. Veselkov A.N., Lantushenko A.O., Evstigneev M.P., Veselkov D.A., Djevis D.B. Sravnitel'nyj analiz geteroassociacii azido-analogov jetidija s antibiotikom daunomicinom v vodnom rastvore po dannym ¹H-JaMR spektroskopii // *Ukr. himich. zhurnal.* - 2002. - T.68. - S.78 - 83.
17. Kostjukov V.V., Tverdohlib N.M., Jevstygnejev M.P. Energetychnyj analiz kompleksoutvorennja aromatychnyh molekul u vodnomu rozchyni // *Ukr.fizych.zhurn.* - 2011. - T.56, №1. - S.38-49.
18. Kostjukov V.V., Mosunov A.A., Ermolaev M.A., Sykhonos P.A., Evstigneev M.P. Additional stabilization of hetero-complexes of aromatic molecules: H-bonds or charge-transfer? // *J.Mol.Str.* - 2011. - V. 985. - P.403-406