

УДК 541.49+577.113

П.А. Болотин, Е.В. Глобина, С.Г. Осетров*, С.Ф. Барановский

Севастопольский национальный технический университет

Студгородок, г. Севастополь, Украина, 99053

** Севастопольский военно-морской институт им П.С. Нахимова*

ул. Дыбенко 1-А, кафедра физики, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: veselkov@sevgtu.sebastopol.ua

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕТЕРОАССОЦИИ КОФЕИНА С ФЕНАНТРИДИНОВЫМ КРАСИТЕЛЕМ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Изучена ассоциация ароматических молекул фенантридинового красителя бромистого этидия и кофеина в водном растворе методом спектрофотометрии в видимой области спектра. Исследованы концентрационные зависимости молярного коэффициента экстинкции взаимодействующих молекул. Экспериментальные результаты проанализированы с помощью димерной модели гетероассоциации молекул. Определены численные значения равновесных констант димеризации и гетероассоциации молекул. Проведен расчет относительного содержания различного типа ассоциатов в смешанном растворе, содержащем бромистый этидий и кофеин, в зависимости от содержания кофеина. Гетероассоциация молекул бромистого этидия и кофеина приводит к меньшей эффективной концентрации красителя в растворе и, соответственно, к уменьшению его биологической активности.

ВВЕДЕНИЕ

Для целенаправленного синтеза биологически активных ароматических систем важно знание молекулярных механизмов их ассоциации и комплексообразования с биополимерами [1]. Процесс ассоциации ароматических лигандов представляет собой образование стопочных агрегатов, стабилизированных вертикальным стэкинг-взаимодействием хромофоров молекул. Исследования агрегации ароматических молекул лигандов, проведенные различными методами, показали [1], что параметры ассоциации существенно зависят от строения хромофоров, а также от характера их боковых групп и цепей.

Молекулы фенантридинового красителя бромистого этидия (ЕВ) содержат три плоских ароматических кольца, две аминовые группы в положениях 3 и 8, гетероатом азота в положении 5, а также фенольное кольцо и этильную группу в хромофоре красителя (рисунок 1). Бромистый этидий относится к типичным мутагенам, действие которых объясняется интеркаляционным связыванием молекул красителя с двойной спиралью

ДНК [1], что приводит к ингибированию процессов репликации и транскрипции ДНК в клетке [2].

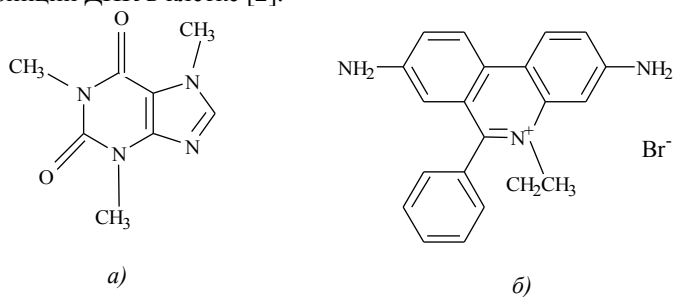


Рисунок 1 – Структурные формулы а) – кофеина;
б) – фенантридинового красителя бромистого этидия

Кофеин (1,3,7 триметилксантин) (рисунок 1) широко используется как психомоторный стимулятор [3]. Принято считать, что биологическая активность ароматического соединения кофеина (*CAF*) связана с его взаимодействием с биополимерами – белками и ДНК [3]. В то же время кофеин уменьшает цитотоксичное действие некоторых красителей, например, бромистого этидия, о чём свидетельствуют экспериментальные результаты исследований в клеточных системах [4]. В работе [5] сделан вывод о том, что кофеин является комплексообразователем – интерцептором ароматических биологически активных веществ, связывающихся с ДНК путём интеркаляции, уменьшая их эффективную концентрацию и, соответственно, биологическую активность. Изучение закономерностей процессов гетероассоциации кофеина с биологически активными веществами, определение характера равновесия между мономерными и ассоциированными формами важно для анализа механизма конкурентного связывания этих молекул с нуклеиновыми кислотами в растворе [6]. Следует также отметить, что кофеин является гидротропным агентом, т.е. увеличивающим растворимость биологически активных веществ в водном растворе [1], однако молекулярный механизм гидротропного действия *CAF* до сих пор не выяснен.

В данной работе изучена самоассоциация *EB* и его гетероассоциация с *CAF* методом спектрофотометрии, весьма чувствительным к процессам агрегации ароматических молекул. При интерпретации экспериментальных данных использована димерная модель, в которой рассматриваются реакции димеризации для самоассоциации и образования 1:1 комплексов при гетероассоциации взаимодействующих молекул. Знание равновесных констант само- и гетероассоциации ароматических молекул *EB* и *CAF* позволяет рассчитать относительное содержание гетерокомплексов “*EB* – *CAF*” в водном растворе и тем самым сделать определенные выводы о

молекулярном механизме действия кофеина на биологически активные ароматические соединения.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Электронные спектры поглощения исследуемых растворов красителя – бромистого этидия («Sigma», США) и кофеина регистрировали на спектрофотометре СФ-46 в видимой области спектра ($400 \div 600$ нм) при $T=298\text{K}$. При титровании *EB* раствором кофеина использовали диапазон концентраций растворов *CAF* $1 \cdot 10^{-6} \div 2 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Измерения проводились в стандартных стеклянных кюветах с длиной оптического пути 2,0; 1,0; 0,5; 0,1 и 0,05 см, которые термостатировались в кюветном отделении спектрофотометра жидкостным термостатом с точностью $\pm 0,25^\circ\text{C}$. Растворы красителя и *CAF* готовились в 0,1-молярном Na-фосфатном буфере (pH = 6,7). Все растворы готовились с использованием бидистиллированной воды. Исследуемые навески красителя бромистого этидия и кофеина перед приготовлением растворов прогревались при 90°C в течение 30 минут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Самоассоциация бромистого этидия в водном растворе. При увеличении концентрации красителя в растворе спектры поглощения *EB* заметно меняются: наблюдается уменьшение интенсивности

мономерной полосы поглощения,

полосы что

свидетельствует об агрегации молекул в растворе [7]. На рисунке 2 показана экспериментальная концентрационная зависимость молярного коэффициента экстинкции красителя на длине волны $\lambda = 480$ нм соответствующей максимуму поглощения мономера *EB*. Как видно из рисунка, поглощение интенсивности света раствором бромистого этидия в видимой области спектра носит нелинейный характер и, следовательно, не подчиняется закону Бера. Это, очевидно, связано с образованием в водном растворе димеров *EB* и агрегатов красителя более высокого порядка.

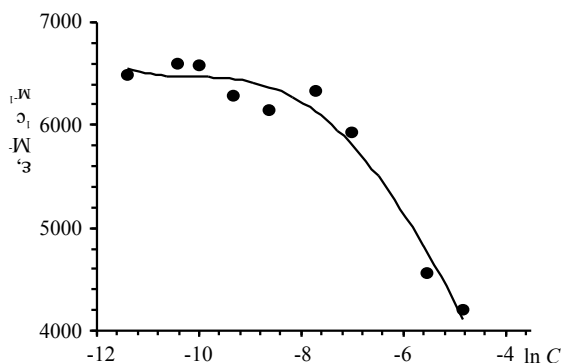


Рисунок 2 - Зависимость молярного коэффициента экстинкции ($\lambda_{\text{max}} = 480$ нм) бромистого этидия от логарифма концентрации

Для интерпретации экспериментальных данных использована следующая схема молекулярного равновесия в растворе:



где K – равновесная константа димеризации молекул, а D_1 и D_2 мономерная и димерная формы исследуемых молекул. Тогда зависимость поглощения раствора ε от концентрации красителя $[D_0]$ определяется следующим образом [1]:

$$\varepsilon = \varepsilon_d + (\varepsilon_d - \varepsilon_m) \frac{1 - \sqrt{1 + 8[D_0]K}}{4K[D_0]}, \quad (2)$$

где ε_m , ε_d – коэффициенты экстинкции мономерной и димерной форм красителя. Параметры модели ε_m , ε_d и K рассчитывались путем минимизации суммы квадратов отклонений экспериментальных значений молярных показателей поглощения ($\varepsilon_k^{эксп}$) от значений ε_k , рассчитанных по модели (2). Численная процедура решения "обратной" задачи осуществлялась методом Марквардта.

В результате расчетов получено усредненное значение равновесной константы димеризации молекул *EB* при $T=298\text{K}$: $K=(240 \pm 70)$ л/моль, которое хорошо согласуется с результатами полученными методом ЯМР-

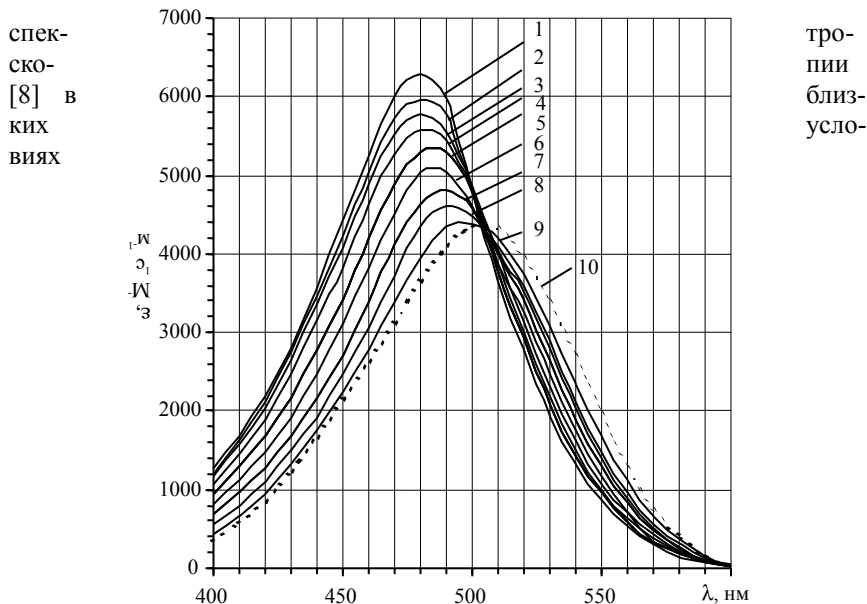


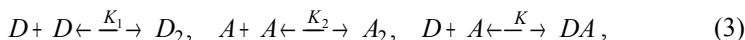
Рисунок 3 – Спектр гетероассоциации *EB-CAF* ($C_{EB} = 9 \cdot 10^{-5} \text{ M} = \text{const}$) при различных концентрациях кофеина: 1 - 0; 2 - $1 \cdot 10^{-6}$; 3 - $5 \cdot 10^{-6}$; 4 - $1 \cdot 10^{-5}$; 5 - $5 \cdot 10^{-4}$; 6 - $5 \cdot 10^{-3}$; 7 - $8 \cdot 10^{-3}$; 8 - $1 \cdot 10^{-2}$; 9 - $1,5 \cdot 10^{-2}$; 10 - $2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$

растворителя. Равновесная константа димеризации *CAF* $K = (20 \pm 6) \text{ л/моль}$ была рассчитана аналогичным образом по экспериментальным данным работы [9].

Гетероассоциация бромистого этидия и кофеина в водном растворе. На рисунке 3 представлены спектры бромистого этидия в смеси с кофеином в водном растворе при температуре 298 К. Как видно из рисунка, при увеличении концентрации кофеина мономерная полоса *EB* испытывает bathochromic shift с одновременным уменьшением интенсивности поглощения. На длине волны $\lambda = 505 \text{ нм}$ наблюдается изобестическая точка, характеризующая двухкомпонентное равновесие в растворе: мономерную форму молекул красителя и гетерокомплексов *EB* с молекулами кофеина. Молярный коэффициент экстинкции в изобестической точке $\varepsilon_{505} = 4,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ хорошо согласуется с данными работы [7].

Анализ ассоциации молекул *CAF* и *EB* проведён, как и в работе [7], по концентрационной зависимости молярного показателя поглощения *EB* на длине волны, соответствующей максимуму поглощения мономера красителя (рисунок 4).

Равновесие в растворе моделировалось схемой реакций, в которой учитывалось образование димерных самоассоциатов и 1:1 гетерокомплексов:



где K_1 , K_2 , K – константы равновесия для реакций димеризации лигандов D , A и образования гетерокомплекса DA соответственно. Уравнения материального баланса исследуемых молекул в состоянии равновесия имеют вид:

$$\begin{aligned} [D_0] &= [D] + 2K_1[D]^2 + K[D][A], \\ [A_0] &= [A] + 2K_2[A]^2 + K[A][D] \end{aligned} \quad (4)$$

где $[D_0]$, $[A_0]$ – исходные молярные концентрации красителя и кофеина соответственно; $[D]$, $[A]$ – равновесные молярные концентрации лигандов в мономерной форме.

Наблюдаемый экспериментальный коэффициент экстинции при условиях проведения эксперимента может быть представлен в виде:

$$\varepsilon = \varepsilon_{m1}f_{m1} + \varepsilon_{d1}f_{d1} + \varepsilon_{m2}f_{m2} + \varepsilon_{d2}f_{d2} + \varepsilon_{k1}f_1 + \varepsilon_{k2}f_2, \quad (5)$$

где ε_{m1} , ε_{d1} , ε_{m2} , ε_{d2} , ε_{k1} , ε_{k2} – молярные показатели поглощения лигандов D и A в мономерной, димерной формах и в составе гетерокомплекса; f_{m1} , f_{d1} , f_1 , f_{m2} , f_{d2} , f_2 – равновесные молярные доли молекул в мономерной, димерной форме и в составе гетерокомплекса соответственно ($f_{m1} + f_{d1} + f_{k1} = 1$, $f_{m2} + f_{d2} + f_{k2} = 1$). Величины параметров самоассоциации ε_{m1} , ε_{d1} , ε_{m2} , ε_{d2} , K_1 и K_2 определялись из независимых экспериментов в аналогичных условиях растворителя. Таким образом, в уравнение (5) входят параметры ε_{k1} , ε_{k2} и K , которые можно определить по экспериментальной концентрационной зависимости молярного коэффициента экстинции в смешанном растворе (рисунок 4). Полосы поглощения красителя и кофеина находятся в различных областях спектра, поэтому выражение (5) можно записать для молекул бромистого этидия в виде:

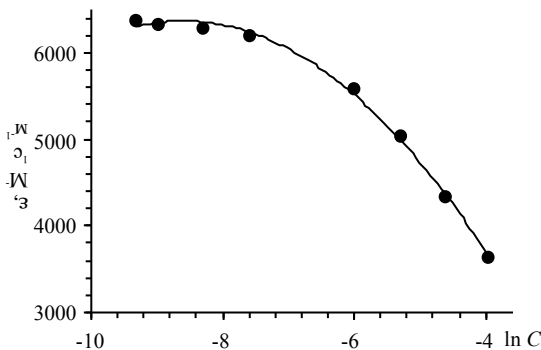


Рисунок 4 – Зависимость молярного коэффициента экстинции водных растворов гетерокомплексов *EB-CAF* от логарифма концентрации *CAF*

$$\varepsilon = \varepsilon_{m1} \frac{[D]}{[D_0]} + \varepsilon_{d1} \frac{2K_1[D]^2}{[D_0]} + \varepsilon_{k1} \frac{K[D][A]}{[D_0]}. \quad (6)$$

Из формулы (6) следует, что экспериментальный коэффициент экстинции *EB* в смешанном растворе является функцией ε_{m1} , ε_{d1} , ε_{k1} , K , $[D]$ и $[A]$.

Концентрации мономеров ароматических лигандов $[D]$ и $[A]$ в свою очередь зависят от K_1 , K , $[D_0]$ и $[A_0]$ и могут быть найдены из решения системы уравнений (4). Таким образом, в (6) входят два неизвестных параметра ϵ_{k1} и K , которые можно найти, используя экспериментальную концентрационную зависимость коэффициента экстинкции красителя. Вычислительная процедура минимизации функции невязки предусматривает предварительное определение равновесных концентраций $[D]$ и $[A]$ при вариации каждого из искомых параметров. Это требовало на каждом итерационном цикле обращения к подпрограмме решения нелинейной алгебраической системы уравнений (4) методом Ньютона-Рафсона. Анализ расчетных значений $[D]$ и $[A]$ позволяет задавать физически обоснованный диапазон изменения величины K и тем самым конкретизировать поиск минимума невязки. Вычисления проведены в широком диапазоне изменения искомых параметров. Помимо этого, варьировалось количество экспериментальных точек в области максимума поглощения мономера красителя. Во всех случаях наблюдался один явно выраженный минимум, так что параметры определялись однозначно для данного набора экспериментальных точек. Полученная в результате расчетов величина константы гетероассоциации (78 ± 14) л/моль, принимает промежуточное значение между равновесными константами димеризации *EB* и *CAF*.

Значения констант реакций само- и гетероассоциации *EB* и *CAF*, определенные в настоящей работе, были использованы для расчёта относительного

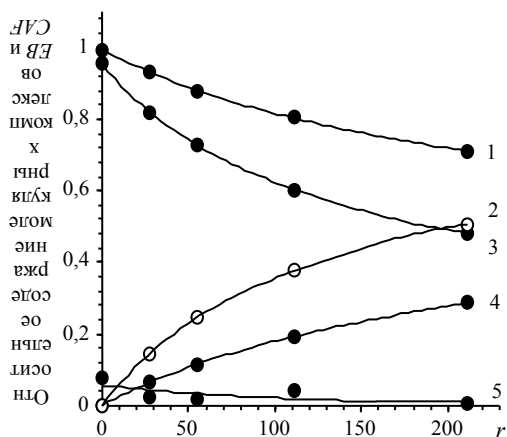


Рисунок 5 — Зависимость относительного содержания молекулярных комплексов *EB* и *CAF* в водном растворе ($pH=6.7$; $T=298K$; $C_{EB}=9 \cdot 10^{-5} = \text{const}$) от соотношения концентраций *CAF* и *EB* $r=[A_0]/[D_0]$: 1- мономер *CAF*; 2- гетерокомплекс *EB-CAF*; 3- мономер *EB*; 4- димер *CAF*; 5- димер *EB*

ного содержания различных молекулярных форм в зависимости от отношения концентраций *CAF* и *EB* $r=[A_0]/[D_0]$ в водном растворе (рисунок 5). Как видно из рисунка, с увеличением r наблюдается рост концентрации гетерокомплексов, димерных комплексов *CAF* и соответствующее падение относительного содержания мономеров кофеина и красителя. Удельный вес димеров *EB* мал и практически не меняется во всем диапазоне изме-

нения r (рисунок 5, кривая 5). При $r \geq 200$ содержание гетероассоциатов в растворе превышает эффективную концентрацию свободного красителя (более 50% молекул *EB* находится в составе гетерокомплексов), что, очевидно, должно приводить к уменьшению биологической активности бромистого этидия, обладающего мутагенными свойствами.

Библиографический список

1. Veselkov A.N. Anti-Cancer drug design: Biological and Biophysical aspects of synthetic phenoxazine derivatives / A.N. Veselkov, D.B. Davies. — Sevastopol: SevNTU Press, 2002. — 260 p.
2. Neidle S. The molecular basis for the action of some DNA-binding drugs / S. Neidle // Prog. Med. Chem. — 1979. — V. 16. — P. 151–221.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т. 2. / М.Д. Машковский. — М., 1985. — С. 107.
4. Kimura H. Decrease in sensitivity to ethidium bromide by caffeine, dimethylsulfoxide or 3-aminobenzamide due to reduced permeability / H. Kimura, T. Aoyama // J. Pharmacobiodyn. — 1989. — № 12. — P. 589–595.
5. Traganos F. Caffeine modulates the effects of DNA-intercalating drug in vitro: A flow cytometric and spectrophotometric analysis of caffeine interaction with novatrone, doxorubicin, ellipticine and doxorubicin analogue ADI98 / F. Traganos, J. Karpuscinski, Z. Darzynkiewicz // Cancer Res. — 1991. — V. 51. — P. 3682–3689.
6. Hetero-association of caffeine and aromatic drugs and their competitive binding with a DNA oligomer / D.B. Davies, D.A. Veselkov, L.N. Djimant, A.N. Veselkov // Eur. J. Biophys. — 2001. — V. 30. — P. 354–366.
7. Zdunek M. Thermodynamical model of mixed aggregation of ligands with caffeine in aqueous solution. Part II / M. Zdunek, J. Piosik, J. Karpuscinski // Biophysical Chemistry. — 2000. — V. 84. — P. 77–85.
8. Исследование самоассоциации бромистого этидия в водном растворе методом ^1H -ЯМР-спектроскопии / А.Н. Веселков, Л.Н. Дымант, С.Ф. Барановский., П.А. Болотин, Х.Е. Паркес, Д. Дэвис // Хим. физика. — 1994. — Т. 13. — № 11. — С. 70–78.
9. Michael F. Self-association of caffeine in aqueous solution: an FT - IR study / F. Michael, C. Manuel, I. Nerea // Can. J. Chem. — 1990. — V. 68. — P. 1293–1299.

Поступила в редакцию 19.04.2004 г.