

УДК 577.113+541.49

А.А. Эрнандес Сантьяго,

С.Н. Симонова,

А.О. Розвадовская, доцент, канд. физ-мат. наук

Севастопольский национальный технический университет

Стрелецкая балка, г. Севастополь, 99053, Украина;

E-mail: lantushenko@mail.ru

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕТЕРОАССОЦИИИ АНТРАЦИКЛИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ МЕТОДОМ ^1H ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

Представлены результаты исследования гетероассоциации антрациклиновых антибиотиков дауномицина, новатрона и ногаламицина в водном растворе методом 1М и 2М ^1H -ЯМР спектроскопии (500 МГц). Определены структурные и термодинамические параметры комплексообразования молекул, сделаны выводы о природе взаимодействий, ответственных за стабилизацию гетерокомплексов ароматических молекул.

Введение. Результаты многочисленных клинических исследований свидетельствуют о том, что комбинированная терапия, основанная на одновременном или последовательном введении нескольких лекарственных препаратов, является более эффективным по сравнению с монотерапией (использованием одного препарата) методом лечения различных типов раковых заболеваний [1]. Во-первых, может иметь место стимуляция процессов, приводящих к клеточной смерти за счет аккумуляции токсических эффектов, вызываемых каждым препаратом. Во-вторых, могут реализовываться различные механизмы действия биологически активных веществ (БАС) на опухолевые клетки. И, наконец, комбинированная терапия может предотвратить или замедлить развитие резистентности клетки к действию БАС. Однако к настоящему времени синергизм биологического действия химиотерапевтических лекарственных препаратов не получил удовлетворительного объяснения как на клеточном, так и на молекулярном уровне. Очевидно, что для решения этой задачи необходима информация об основных молекулярных мишенях действия БАС, особенностях их фармакокинетики, путей распределения препаратов в организме, а также четкое понимание биохимических и молекулярных механизмов взаимодействий между отдельными компонентами, используемыми в цикле комбинированной терапии.

Ароматические антрациклиновые антиопухолевые антибиотики, такие как доксорубин (DOX), дауномицин (DAU), ногаламицин (NOG), митоксантрон (новатрон, NOV) широко используются в клинической практике в качестве основных компонентов комбинированной химиотерапии, направленной на лечение различных типов раковых заболеваний человека [1]. Исследования показали, что при совместном использовании этих препаратов имеет место улучшение химиотерапевтического индекса, например, комбинация DOX + NOV успешно используется для лечения рака молочной железы [2], причем в зависимости от курса лечения данные препараты могут вводиться в организм как одновременно, так и последовательно.

Важно отметить, что исходные концентрации антрациклиновых антибиотиков в растворах, приготовленных для инъекции, зависят от конкретного курса химиотерапии и обычно составляют величины порядка миллимолей [1]. Хорошо известно, что молекулы DOX [3], DAU [4], NOV [5] и NOG [6] в миллимолярном диапазоне концентраций проявляют сильную тенденцию к самоассоциации в растворе, что выражается в образовании димеров и ассоциатов более высокого порядка, стабилизируемых за счет стэкинг-взаимодействия между ароматическими хромофорами молекул в агрегатах. Ранее было показано, что подобные взаимодействия вышеперечисленных антибиотиков наблюдаются и с другими ароматическими БАС в растворе, а именно кофеином [7], рибофлавином [8], фенантридиновыми красителями [9] и др. Такие взаимодействия в растворе могут иметь несколько следствий. Во-первых, скорость метаболической трансформации антибиотиков в гетерокомплексах может изменяться в сравнении с кинетикой трансформации свободного БАС в биологической жидкости. Недавно было высказано предположение, что данный механизм является доминирующим в процессе деградации DOX и некоторых ароматических карциногенов при связывании с рибофлавином [10]. Во-вторых, скорость всасывания препарата в смеси с другими ароматическими соединениями сразу после инъекции может меняться из-за взаимодействия между ароматическими антибиотиками и другими ароматическими молекулами, например метилксантинами, поступающими в организм с пищей [11]. Следовательно, можно сделать вывод, что изменения кинетики биологического действия ароматических антибиотиков *in vivo* являются вполне ожидаемыми, если курс комбинированной терапии включает одновременное введение различных препаратов.

Важно отметить, что гетероассоциация ароматических молекул в определенных случаях может привести к образованию высокостабильных гетерокомплексов в растворе, являющихся энергетически более выгодными, чем димерные самоассоциаты данных молекул. Наши предыдущие исследования показали, что комплексы антибиотиков дауномицина и новатрона дополнительно стабилизируются за счет межмолекулярной водородной связи в физиологических условиях [12]. Интенсивные межмолекулярные взаимодействия ароматических веществ могут в некоторых случаях приводить к изменению растворимости соответствующих препаратов в растворе. В качестве примера можно привести выпадение в осадок антиопухолевых антибиотиков DAU/DOX/NOV в присутствии дексаметазона/гепарина [1].

Учитывая все вышесказанное, можно сделать вывод, что физико-химические исследования особенностей взаимодействия между ароматическими антибиотиками при физиологических условиях очень важны главным образом для рациональной разработки режимов комбинированной химиотерапии на основе этих веществ. Для подобных исследований необходимо использовать смешанные растворы антибиотиков с исходными концентрациями веществ, соответствующими принятым в клинической практике. Для исследований ассоциации молекул в растворе в миллимолярном диапазоне концентраций одним из наиболее эффективных экспериментальных методов является ЯМР-спектроскопия.

В настоящей работе методом 1М и 2М ^1H ЯМР спектроскопии (500 МГц) исследована гетероассоциация ароматических антиопухолевых антибиотиков ногаламицина, дауномицина и новатрона в водном растворе. Для анализа процессов гетероассоциации ароматических БАС использована методика эксперимента, аналогичная примененной ранее [13] для изучения ассоциации ароматических веществ, основанная на анализе экспериментальных концентрационных и температурных зависимостей протонных химических сдвигов молекул.

Методика эксперимента. Антиопухолевые антибиотики дауномицин, ногаламицин и новатрон (рисунок 1) фирмы "Sigma" растворяли в D_2O с изотопной чистотой 99.95% ("Sigma") и лиофилизовали. Растворы готовили путем добавления взвешенного количества образца в дейтерированный 0.1 М фосфатный буфер (pD 7.1), содержащий 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 DAU-NOG выполнены при двух температурах, 303К и 313К, в интервале концентраций NOG от 1.67 до 0.2 мМ, при этом концентрация DAU поддерживалась постоянной ($C_{\text{DAU}} = p_0 = 1.0$ мМ). Для системы NOV-NOG концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул выполнены при одной температуре, 318К, в интервале концентраций NOV от 1.1 до 0 мМ при постоянной концентрации NOG ($C_{\text{NOG}} = p_0 = 0.6$ мМ). Температурные зависимости химических сдвигов протонов молекул в смешанных растворах измерены в диапазоне температур от 278К до 348К для системы NOG-DAU и от 306 до 348 К для NOV-NOG. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2 диметил-2-силапентан-5-сульфокислота), 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 и NOG. Методика приготовления образцов и проведения экспериментов описана в [13].

Результаты и обсуждение. Как и ранее [13], параметры гетероассоциации DAU – NOG и NOV-NOG определяли путём анализа зависимостей химических сдвигов необменивающихся протонов обоих ароматических соединений в смешанных растворах от концентрации (рисунки 2а, 3а) и температуры

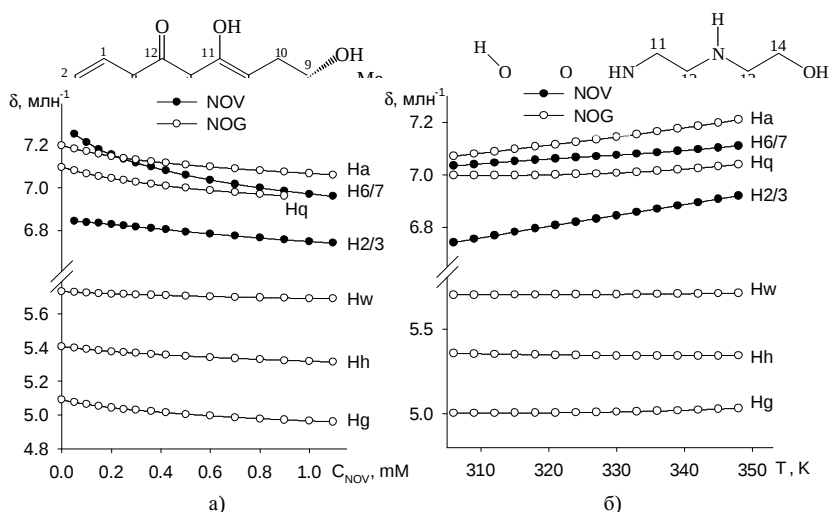


Рисунок 2 - а) - экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов протонов NOV и NOG при $T=318\text{K}$, $C_{\text{NOG}} = p_0 = 0.55$ мМ; б) - экспериментальные температурные зависимости химических сдвигов протонов NOV и NOG в смешанном растворе при $C_{\text{NOV}} = a_0 = 0.5$ мМ, $C_{\text{NOG}} = p_0 = 0.55$ мМ

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

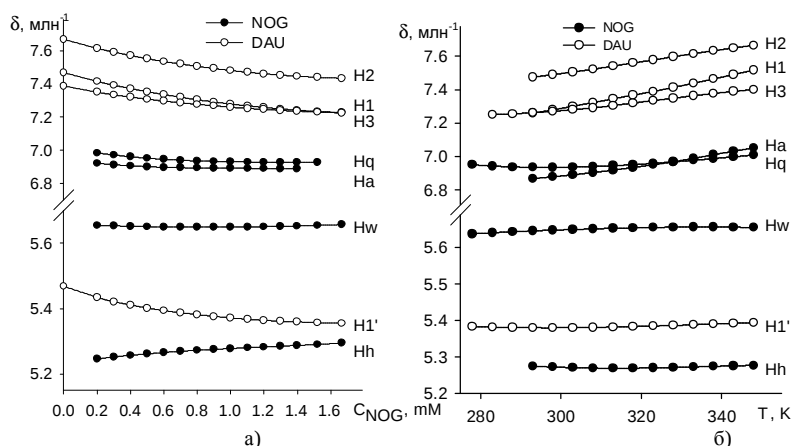
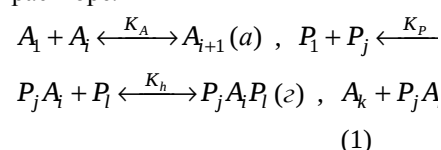


Рисунок 3 – а) - экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов протонов NOG и DAU при $T=303\text{K}$, $C_{\text{DAU}}=p_0=0.98\text{ mM}$; б) - экспериментальные температурные зависимости химических сдвигов протонов NOG и DAU в смешанном растворе при $C_{\text{NOG}}=a_0=0.8\text{ mM}$, $C_{\text{DAU}}=p_0=0.98\text{ mM}$

(рисунки 2б, 3б).

Анализ экспериментальных данных был проведен с использованием статистико-термодинамической модели гетероассоциации молекул [14], в которой учитывается образование бесконечных самоассоциатов, а также гетероассоциатов различного типа. При анализе экспериментальных данных использована следующая схема взаимодействия ароматических молекул в растворе:



Константы равновесия для реакций самоассоциации БАС (K_A и K_P) и гетероассоциации молекул (K_h) полагаются не зависящими от числа молекул в агрегатах и комплексах. В схеме (1) A_i и P_i соответствуют мономерам БАС, A_i , A_k , P_j , P_l – самоассоциатам, содержащим i , k молекул компоненты А и j , l молекул компоненты Р.

В такой модели зависимость наблюдаемого химического сдвига протонов компоненты А от концентрации молекул в смешанном растворе может быть записана в виде [14]:

$$\delta_A = \frac{a_1}{a_0} \left[\delta_{mA} \left(2(1 + K_A a_1) - \frac{1}{(1 - K_A a_1)^2} \right) + 2\delta_{dA} \left(\frac{1}{(1 - K_A a_1)^2} - 1 - K_A a_1 \right) + \delta_{hA} \frac{K_h p_1}{(1 - K_A a_1)^2 (1 - K_P p_1)} \left(1 + \frac{K_h p_1}{2(1 - K_P p_1)} + \frac{K_h a_1}{1 - K_A a_1} \right) \right] \quad (2)$$

Соответствующее выражение для химического сдвига протонов компонента Р δ_P может быть получено из (2) путем замены символов a на p и p на a . Здесь величины δ_{mA} , δ_{dA} , δ_{hA} и δ_{mP} , δ_{dP} , δ_{hP} – протонные химические сдвиги молекул в мономерной, димерной формах и в гетероассоциатах соответственно. Значения протонных химических сдвигов δ_{mA} , δ_{dA} , δ_{mP} , δ_{dP} и равновесных констант K_A , K_P для взаимодействующих молекул определены из независимых экспериментов при исследовании самоассоциации молекул в идентичных экспериментальных условиях [4–6]. Тогда из (2) следует, что наблюдаемые протонные химические сдвиги взаимодействующих молекул в смешанном растворе являются функциями неизвестных δ_h и K_h , которые можно найти, используя экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов различных протонов ароматических молекул (рисунки 2а, 3а). Вычислительная процедура расчёта параметров подробно описана в [9,14]. Полученные в результате расчётов параметры гетероассоциации DAU с NOG при температурах 303K и 313K и NOV-NOG при $T=318\text{K}$ представлены в таблицах 1 и 2 соответственно. Прежде всего следует отметить, что как и для большинства других молекулярных систем, исследованных ранее [5,13,14], величина константы гетероассоциации DAU с NOG и NOV с NOG принимает промежуточное значение между равновесными константами самоассоциации молекул. Превышение константы гетероассоциации над константами самоассоциации наблюдалось ранее только для систем, в которых имела место дополнительная стабилизация гетерокомплексов за счет образования межмолекулярной водородной

Таблица 1 – Значения параметров гетероассоциации ногаламицина (А) и дауномицина (Р) в 0.1 М фосфатном буфере рD 7.1

Т, К	Протоны NOG (А)	δ_{hA} , млн ⁻¹	δ_{dA} , млн ⁻¹	δ_{mA} , млн ⁻¹	Протоны DAU (Р)	δ_{hP} , млн ⁻¹	δ_{dP} , млн ⁻¹	δ_{mP} , млн ⁻¹	$K \cdot 10^3$, М ⁻¹
303	Hq	6.85	7.10	7.28	H2	7.27	7.53	7.83	$K_A = 5.9 \pm 1.2$ $K_P = 0.6 \pm 0.1$ $K_h = 2.7 \pm 1.2$
	Ha	6.80	7.20	7.53	H1	6.98	7.33	7.78	
	Hw	5.62	5.73	5.81	H3	7.10	7.26	7.55	
	Hh	5.22	5.41	5.48	H1'	5.27	5.43	5.52	
					4OMe	3.73	3.83	4.02	
					H10e	2.65	2.86	3.05	

					H10a	2.46	2.64	2.81	
313	Hq	6.81	7.10	7.28	H2	7.25	7.53	7.83	K _A = 4.0±0.8 K _P = 0.4±0.1 K _h = 1.8±0.8
	Ha	6.79	7.20	7.53	H1	6.91	7.33	7.78	
	Hw	5.62	5.73	5.81	H3	7.08	7.26	7.55	
	Hh	5.20	5.41	5.48	H1'	5.22	5.43	5.52	
					4OMe	3.72	3.83	4.02	
					H10e	2.63	2.86	3.05	
					H10a	2.46	2.64	2.81	

Таблица 2 – Значения параметров гетероассоциации новатрона (A) и ногаламицина (P) в 0.1 М фосфатном буфере, рD 7.1, T=318 K

Протоны NOV (A)	δ_{HA} , МЛН ⁻¹	δ_{DA} , МЛН ⁻¹	δ_{mA} , МЛН ⁻¹	Протоны NOG (P)	δ_{HP} , МЛН ⁻¹	δ_{DP} , МЛН ⁻¹	δ_{mP} , МЛН ⁻¹	K·10 ³ , М ⁻¹
H6/7	7.11	7.18	7.68	Hq	6.98	7.10	7.28	K _A = 12.4±4.0 K _P = 3.3±0.6 K _h = 5.2±2.5
H2/3	6.77	6.91	7.30	Ha	6.85	7.20	7.53	
H11	3.70	3.69	3.96	Hw	5.67	5.73	5.81	
				Hh	5.25	5.41	5.48	

связи [14]. Последнее дает основание предположить, что в системах DAU-NOG и NOV-NOG 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.

Из таблицы 2 видно, что экранирование протонов NOG и DAU в гетерокомплексе ($\Delta\delta_h = \delta_m - \delta_h$) значительно выше, чем в соответствующих димерных самоассоциатах $\Delta\delta_d = \delta_m - \delta_d$. Данный факт может быть связан с уменьшением расстояния между хромофорами ароматических молекул в гетерокомплексе. Вероятно, повышенное экранирование также обуславливает необычный ход концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов Hw и Hh – смещение положения резонанса этих протонов в область слабого поля при увеличении концентрации NOG (рисунок 3а). При низких концентрациях NOG молекулы преимущественно находятся в гетероассоциатах с DAU и, следовательно, испытывают сильное экранирование. При увеличении концентрации NOG происходит смещение динамического равновесия в сторону образования самоассоциатов NOG, что приводит к деэкранированию протонов NOG и смещению их резонансных сигналов в область слабого поля. Данный эффект имеет место только для протонов Hw, Hh, которые обладают наименьшим экранированием в димере, и ранее не наблюдался при исследовании самоассоциации ногаламицина [6].

Термодинамика гетероассоциации молекул DAU-NOG и NOV-NOG в водном растворе. Термодинамический анализ гетероассоциации DAU-NOG и NOV-NOG проводился на основе экспериментальных температурных зависимостей протонных химических сдвигов молекул, представленных на рисунках 2б, 3б. С использованием аддитивной модели для описания наблюдаемого протонного химического сдвига и формализма Вант-Гоффа [14] были рассчитаны энтальпия ΔH_{het}^0 и энтропия ΔS_{het}^0 реакций гетероассоциации.

При вычислении термодинамических параметров использовали соотношение (2), в котором влияние температуры на значение $\delta(T)$ определяется температурной зависимостью равновесных констант самоассоциации и гетероассоциации молекул согласно соотношению

$$K_i(T) = \exp(\Delta S_i^0/R - \Delta H_i^0/RT), \quad (3)$$

в предположении, что величины ΔS_i^0 и ΔH_i^0 не зависят существенным образом от температуры в исследованном диапазоне температур [14].

Усредненные расчетные значения свободной энергии Гиббса ΔG_{het}^0 , энтальпии ΔH_{het}^0 и энтропии ΔS_{het}^0 реакций гетероассоциации представлены в таблице 3. Известно, что экзотермические реакции характерны для процессов агрегации, включающих в себя стэкинг-взаимодействие в водном растворе ароматических систем с делокализованными π -электронами. Дисперсионные взаимодействия характеризуются как отрицательной энтальпией, так и отрицательной энтропией [15]. Довольно большие отрицательные значения энтальпии и энтропии реакции гетероассоциации ароматических молекул DAU-NOG и NOV-NOG позволяют заключить, что дисперсионные взаимодействия играют существенную роль при образовании гетерокомплексов этих молекул.

Таблица 3 – Термодинамические параметры гетероассоциации DАU – NOG и NOV-NOG в 0.1 М фосфатном буфере рD 7.1, T=298K

Система	$-\Delta G^{\circ}_{\text{het}}$ кДж/моль	$-\Delta H^{\circ}_{\text{het}}$ кДж/моль	$-\Delta S^{\circ}_{\text{het}}$ Дж/(моль·К)
NOG-DAU	21.6±1.1	33±4	40±8
NOV-NOG	23.3±1.0	34±4	36±7

Следует отметить, что энтальпия реакции гетероассоциации DAU и NOG была рассчитана также независимо из значений равновесных констант гетероассоциации при двух различных температурах, $T_1 = 303\text{ K}$ и $T_2 = 313\text{ K}$, которые определены исходя из концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов молекул, соответствующее значение $\Delta H^{\circ}_{\text{het}}$ гетероассоциации DAU и NOG в пределах погрешности хорошо согласуется с приведенным в таблице 3.

В заключение можно сделать вывод, что ароматические молекулы антрациклиновых антибиотиков могут образовывать энергетически прочные гетероассоциаты друг с другом в водном растворе и тем самым оказывать влияние на эффективность медико-биологического действия при одновременном использовании этих антибиотиков в клинической практике. Данный факт необходимо учитывать при разработке оптимального режима комбинированной химиотерапии.

Библиографический список

1. Chu E. Physicians' cancer chemotherapy drug manual / E. Chu, V.T. DeVita. — L.: Jones and Bartlett Publ., 2003. — 512 p.
2. Weekly low-dose mitoxantrone plus doxorubicin as 2nd-line chemotherapy for advanced breast-cancer / M. Bontenbal, A.S.T. Planting, C.J. Rodenburg et al. // Breast Cancer Res. and Treat. — 1992. — V. 21(2). — P. 133–138.
3. Self-association of doxorubicin and related-compounds in aqueous solution / M. Menozzi, L. Valentini, E. Vannini, F. Arcamone // J. Pharm. Sci. — 1984. — V. 73. — P. 766 – 770.
4. NMR investigation of the complexation of daunomycin with deoxytetranucleotides of different base sequence in aqueous solution / D.B. Davies, R. Eaton, S. Baranovsky, A.N. Veselkov // J. Biomol. Str. Dyn. — 2000. — V. 17. — P. 887. — 901.
5. Self-association of antitumour agent Novantrone (Mitoxantrone) and its hetero-association with Caffeine / D.B. Davies, D.A. Veselkov, M.P. Evstigneev, A.N. Veselkov // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2. — 2001. — P. 61 – 67.
6. Исследование самоассоциации антрациклиновых антибиотиков дауномицина и ногамицина в водном растворе методом ^1H ЯМР спектроскопии / Р.Дж. Итон, Д.А. Веселков, С.Ф. Барановский и др. // Хим. физика. — 2000. — Т. 19. — №2. — С. 98 – 104.
7. Piosik J. The modulation by xanthines of the DNA-damaging effect of polycyclic aromatic agents. Part II. The stacking complexes of caffeine with doxorubicin and mitoxantrone / J. Piosik, M. Zdunek, J. Kapuscinsky // Biochem. Pharm. — 2002. — V. 63. — P. 635 – 646.
8. Kharash E.D. The molecular basis for complexation of adriamycin with flavin-monomonucleotide and adenine-dinucleotide / E.D. Kharash, R. Novak // Arch. Biochem. Biophys. — 1981. — V. 212. — P. 20 – 36.
9. NMR determination of the hetero-association of phenanthridines with daunomycin and their competitive binding to a DNA oligomer / D.B. Davies, D.A. Veselkov, A.N. Veselkov // Eur. Biophys. J. — 2002. — V. 31. — P. 153 – 162.
10. The riboflavin-induced photooxidation of doxorubicin / A. Ramu, M.M. Mehta, J. Liu et al. // Cancer Chem. Pharmac. — 2000. — V. 46. — P. 449 – 458.
11. Okore V.C. A model study on caffeine-paracetamol interactions / V.C. Okore, A.C. Osuji // Acta Pharm. — 2001. — V. 51. — P. 139–145.
12. ^1H NMR structural and thermodynamical analysis of the hetero-association of daunomycin and novatrone in aqueous solution / A.N. Veselkov, M.P. Evstigneev, A.O. Rozvadovskaya et al. // J. Mol. Str. — 2004. — V. 701. — P. 31 – 37.
13. 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. Biophys. J. — 2001. — V. 30. — P. 354 – 366.
14. ^1H NMR investigation of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution: drug-mutagen complex formation / D.B. Davies, D.A. Veselkov, V.V. Kodintsev et al. // Mol. Phys. 2000. — V. 98. — № 23. — P. 1961.
15. Ross R.D. Thermodynamics of protein association reaction: forces contributing to stability / R.D. Ross, S. Subramanian // Biochemistry. — 1981. — V. 20. — P. 3096 – 3102.

Поступила в редакцию 20.01.2005 г.