

ИССЛЕДОВАНИЕ САМОАССОЦИИ ХИНОЛОНОВОГО АНТИБИОТИКА НОРФЛОКСАЦИНА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ^1H ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

Методами ^1H ЯМР спектроскопии и молекулярной динамики проведено исследование самоассоциации антималарийного антибиотика норфлоксацина в водном растворе. Получены параметры самоассоциации антибиотика: равновесные константы, параметр кооперативности, энтальпия и энтропия. Определена наиболее вероятная пространственная структура димерного комплекса антибиотика в водном растворе. Анализ полученных параметров позволяет сделать вывод о повышенном гидрофобном вкладе в энергетику агрегации норфлоксацина.

Введение. Антибиотик норфлоксацин (NOR) является одним из наиболее эффективных современных антибактериальных препаратов, используемых в клинической практике, характеризуемый оптимальной фармакокинетикой, высокой биодоступностью, хорошей переносимостью и высокой активностью по отношению к возбудителям, резистентным к другим противомикробным средствам [1,2]. 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 [3]. Согласно современным представлениям молекулы норфлоксацина связываются с ДНК, формируя комплекс из нескольких молекул антибиотика, двойной спирали ДНК и ДНК-гиразы, причем образование такого комплекса происходит в тот момент, когда гираза осуществляет разрезание обеих цепей ДНК [4]. В работе [4] сделано предположение, что наиболее оптимальная геометрия агрегата молекул NOR, эффективно связывающегося с комплексом ДНК – фермент, имеет форму димера молекул антибиотика, в котором плоскости хромофоров молекул параллельны друг другу. По-видимому, в момент разрезания нитей ДНК образуется полость, размеры которой близки к размеру димера молекул NOR, что, в частности, позволяет объяснить наблюдаемый экспериментально кооперативный характер связывания антибиотика с комплексом гиразы и ДНК [4]. Из сказанного следует, что для объяснения молекулярного механизма биологического действия антибиотика норфлоксацина чрезвычайно важной является информация о возможных физических взаимодействиях, в которые вовлечен антибиотик в комплексе с гиразой и ДНК и, в частности, нековалентные взаимодействия молекул NOR друг с другом в димере.

По способу получения антибиотик норфлоксацин является синтетическим производным налидиксовой кислоты с атомом фтора в положении 6 пиперазин-замещенного ароматического хромофора молекулы (рисунк 1).

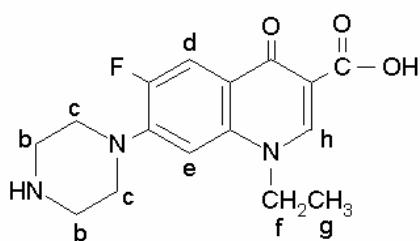


Рисунок 1 – Структурная формула хинолонового антибиотика норфлоксацина

Многочисленные исследования показали, что в водном растворе при домицелльных концентрациях, ароматические молекулы испытывают процесс агрегации или самоассоциации в большинстве случаев путем параллельного стэкинга ароматических хромофоров взаимодействующих молекул [5,6]. Отсюда следует, что и ароматический антибиотик NOR также может испытывать самоассоциацию в водном растворе, а

следовательно, образовывать димеры с параллельно ориентированными хромофорами, которые в момент действия гиразы на двойную спираль ДНК могут интеркалировать в образующуюся при релаксации ДНК полость, тем самым стабилизируя комплекс ДНК-фермент и ингибируя репликативную функцию ДНК. Таким образом, исследование самоассоциации антибиотика норфлоксацина является важным для объяснения механизма его биологической активности.

В настоящей работе методом ^1H ЯМР спектроскопии проведено исследование самоассоциации фторхинолонового антибиотика норфлоксацина, получены равновесные параметры реакций ассоциации в водно-солевом растворе, сделаны выводы о вкладе в процесс агрегации различных физических взаимодействий.

Методика эксперимента. Антибиотик норфлоксацин ("Sigma"), как и исследованные нами ранее ароматические молекулы [6], использовали без дополнительной очистки, лиофилизовали из D_2O с изотопной чистотой 99.95% D ("Sigma") и растворяли в дейтерированном 0.1M фосфатном буфере (pD 7.1, 0.1M Na^+), содержащем 10^{-4} моль/л ЭДТА. Концентрацию молекул антибиотика в водном растворе определяли спектрофотометрически – для NOR коэффициент экстинкции $\epsilon = 37500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 272 \text{ nm}$) [7].

1M - и 2M - ^1H -ЯМР спектры измерены на спектрометре "Bruker DRX" с резонансной частотой 500 МГц. Остаточный сигнал НОД насыщался в период детектирования. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов выполнены при температуре $T = 298\text{K}$ и 308K в интервале концентраций антибиотика от 0.8 до 0.045 ммоль/л; температурные зависимости химических сдвигов NOR измерены в диапазоне температур от 278K до 348K. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5 сульфокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид

тетраметиламмония (ТМА). Измерения проводились в стандартных ампулах с внешним диаметром 5 мм, минимальный объем используемого раствора 0.5 мл.

Отнесение сигналов в спектрах ^1H -ЯМР, отождествление химических и пространственных связей проводили, соответственно с помощью двумерных гомоядерных TOCSY и ROESY экспериментов

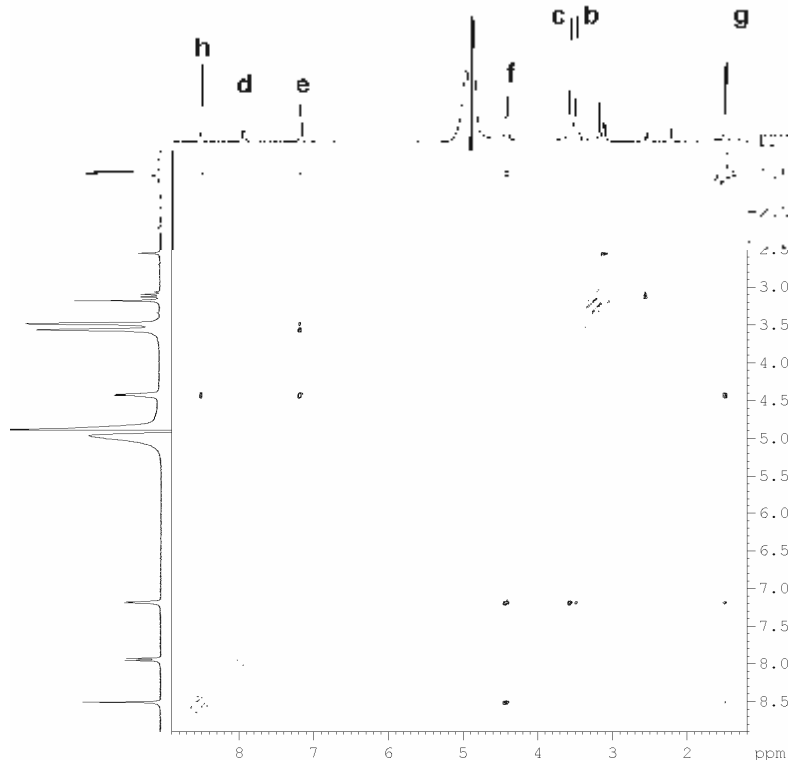


Рисунок 2 – 2D-ROESY спектр норфлоксацина в 0.1 М фосфатном буфере при $T=298\text{ K}$, $\text{pD } 7.1$, $C_{\text{NOR}}=0.8\text{ ммоль/л}$

Методика приготовления образцов и проведения экспериментов достаточно подробно описана в [6]. Спектры 2M-ROESY регистрировали при $T=288\text{ K}$ с использованием стандартной последовательности импульсов при времени смешивания $\tau_m=240\text{ мс}$ и ширине спектров $\text{SW}=5400\text{ Гц}$, 4096 точек в период детектирования (t_2) и 512 приращений времен эволюции (t_1). Спектры 2M-TOCSY измеряли при $T=303\text{ K}$ и времени смешивания $\tau_m=75\text{ мс}$. Стабилизацию температуры в процессе измерений осуществляли терморегулятором BVT-3000.

Результаты и обсуждение. Отнесение сигналов в спектре ^1H -ЯМР NOR получено на основании двумерных гомоядерных TOCSY и ROESY (рисунок 2) экспериментов и находится в хорошем согласии с опубликованными данными [7].

На рисунке 3 представлены концентрационные и температурные зависимости химических сдвигов необменивающихся ароматических протонов хромофора NOR. При увеличении концентрации антибиотика наблюдается смещение резонансов протонов NOR в область более сильного поля, как это обычно имеет место при образовании стопочных ассоциатов ароматических молекул в растворе [5,6]. Для интерпретации экспериментальных данных, как и ранее [6], использовали модель бесконечномерной некооперативной самоассоциации молекул, в которой константы равновесия K_j для реакций



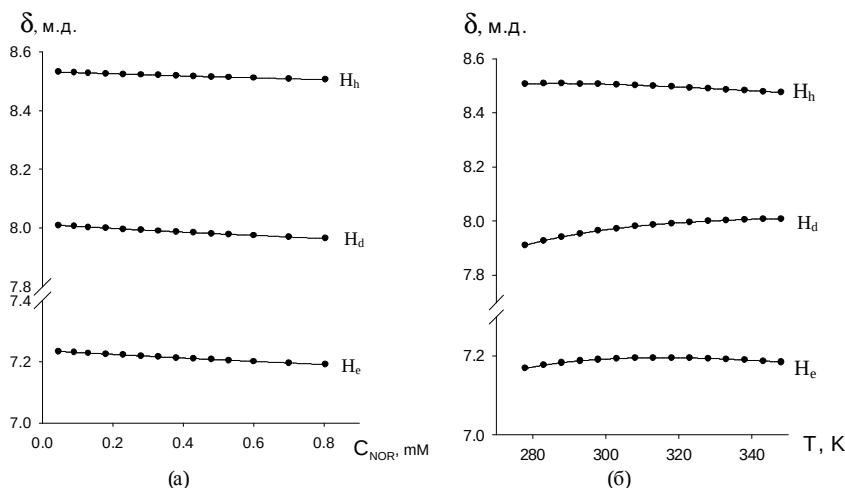


Рисунок 3 – Экспериментальные зависимости химических сдвигов протонов норфлоксацина в водном растворе от: а) концентрации при $T = 298\text{ K}$; б) температуры при концентрации антибиотика $C_0 = 0.8\text{ ммоль/л}$

предполагаются одинаковыми при всех значениях j : $K_1 = K_2 = \dots = K_j = K$. В такой модели зависимость химического сдвига δ от концентраций имеет вид [6]:

$$\delta = \delta_m + (\delta_i - \delta_m) \cdot \left\{ \left[(2Kx_0 + 1) - (4Kx_0 + 1)^{1/2} \right] / 2Kx_0 \right\}, \quad (2)$$

где δ_i – протонный химический сдвиг для молекулы антибиотика внутри ассоциата, δ_m – протонный химический сдвиг в мономере, т.е. при бесконечном разбавлении. Параметры δ_m , δ_i и K модели (2) находились из условия минимизации квадратичной функции невязки. Результаты расчетов параметров для рассматриваемых протонов антибиотика приведены в таблице 1.

Экспериментальные результаты (рисунок 3,а) были проанализированы также с помощью бесконечномерной кооперативной модели самоассоциации, в которой равновесные константы реакций (1) предполагаются равными для всех $j \geq 2$ ($K_2 = K_3 = \dots = K_j = K$) и $K_1 = \sigma K$, где σ – параметр кооперативности [5,6]. Такая модель приводит к следующей зависимости химического сдвига δ от концентрации [6]:

$$(\delta - \delta_m) / (\delta_i - \delta_m) = 1 - x_1 / x_0 - \sigma K x_1^2 / [x_0(1 - Kx_1)], \quad (3)$$

где x_0 , x_1 – исходная концентрация и концентрация мономеров антибиотика в растворе соответственно. Кооперативная модель содержит четыре неизвестных параметра – δ_m , δ_i , σ и K , подлежащих определению по экспериментальным концентрационным зависимостям химического сдвига. Процедура расчета параметров подробно изложена в [6]. Значения рассчитанных параметров представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры самоассоциации молекул норфлоксацина в водном растворе (0.1 М фосфатный буфер рD = 7.1)

T = 298K							
Бесконечномерная некооперативная модель				Бесконечномерная кооперативная модель			
Протон	δ_m , м.д.	δ_i , м.д.	K, л/моль	δ_m , м.д.	δ_i , м.д.	K, л/моль	σ
H _h	8.53	8.26	130 ± 14	8.53	8.27	133 ± 15	0.97 ± 0.06
H _d	8.01	7.52		8.01	7.51		
H _e	7.24	6.68		7.24	6.68		
H _f	4.45	4.11		4.45	4.11		
H _c	3.58	3.42		3.58	3.42		
H _b	3.49	3.41		3.49	3.41		
H _g	1.50	1.34		1.50	1.33		
T = 308K							
Протон	δ_m , м.д.	δ_i , м.д.	K, л/моль	δ_m , м.д.	δ_i , м.д.	K, л/моль	σ
H _h	8.53	8.27	100 ± 16	8.53	8.26	105 ± 10	0.98 ± 0.06
H _d	8.02	7.58		8.02	7.58		
H _e	7.23	6.77		7.23	6.75		
H _f	4.44	4.10		4.44	4.14		
H _c	3.58	3.41		3.58	3.41		
H _b	3.49	3.39		3.49	3.39		
H _g	1.50	1.35		1.50	1.34		
Термодинамика процесса самоассоциации							
-ΔG ⁰ , кДж/моль			-ΔH ⁰ , кДж/моль		-ΔS ⁰ , Дж/(моль·K)		
12.0 ± 1.6			18.0 ± 3.6		20 ± 5		

Определение термодинамических параметров самоассоциации NOR проводили, как и в работе [6], на основе экспериментальных температурных зависимостей химических сдвигов протонов антибиотика (рисунок 3,б) с использованием формализма вант-Гоффа для описания температурной зависимости равновесной константы самоассоциации молекул. Процедура расчета термодинамических параметров реакций ассоциации, энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS), аналогична процедуре расчета параметров агрегации по концентрационным зависимостям. Расчетные значения термодинамических параметров самоассоциации NOR представлены в таблице 1.

Антибиотик норфлоксацин по отношению к исследованным ранее в нашей лаборатории ароматическим соединениям [6,8], наиболее близок по структуре хромофора к кофеину (CAF), являющемся метилксантиновым производным. Если считать, что основной вклад в энергетику ассоциации молекул ароматического класса дает именно стэкинг хромофоров в агрегате, то можно предположить, что параметры агрегации норфлоксацина должны быть близки к таковым для кофеина [8]. Анализ результатов представленных в таблице 1, показывает, что равновесная константа самоассоциации NOR практически на порядок превышает константу самоассоциации кофеина в аналогичных экспериментальных условиях ($K_{CAF} = 11.8 \pm 0.3$ л/моль, $T = 298K$, [8]). Это свидетельствует о том, что в димере молекул NOR имеет место дополнительная стабилизация комплекса по отношению к 1:1 комплексу молекул кофеина. Сравнение структур NOR и CAF показывает, что молекула антибиотика содержит массивное боковое неароматическое кольцо соответствующее которому в структуре CAF отсутствует. Ранее в нашей лаборатории было показано, что наличие массивных боковых привесков в структуре молекулы, как правило, приводит к существенному возрастанию равновесной константы самоассоциации за счет повышенного гидрофобного вклада при образовании димеров и агрегатов более высокого порядка [6]. Примером может служить фенантридиновый краситель бромистый этидий, содержащий в структуре молекулы боковое фенольное кольцо, наличие которого определяет значительный гидрофобный вклад в энергетику самоассоциации красителя [6]. Следует отметить, что гидрофобные взаимодействия, связанные с вытеснением молекул растворителя в свободный раствор при образовании агрегата, уменьшают степень структурированности растворителя в окрестности агрегата и дают положительный вклад как в энтропию, так и в энтальпию реакции самоассоциации [9]. Соответствующее относительное уменьшение ΔH и ΔS по абсолютной величине ранее наблюдалось практически для всех исследованных в нашей лаборатории ароматических молекул красителей и антибиотиков, содержащих массивные боковые группы и, в частности, для бромистого этидия [6]. Сравнение термодинамических параметров агрегации NOR (см. таблицу) и CAF ($\Delta H_{CAF} = -(21.0 \pm 0.4)$ кДж/моль, $\Delta S_{CAF} = -(50 \pm 1)$ Дж/моль·К [8]) свидетельствует о том, что термодинамические параметры ассоциации NOR ниже по абсолютной величине, чем аналогичные параметры ассоциации CAF. Этот факт, а также относительно высокое значение константы самоассоциации NOR (см. таблицу) позволяет сделать вывод, что при образовании агрегатов молекул антибиотика существенный вклад в энергетику ассоциации дают гидрофобные взаимодействия. Вместе с тем значения энтальпии и энтропии самоассоциации NOR отрицательны, что характерно для дисперсионных взаимодействий, возникающих в димерах ароматических молекул и обусловленных взаимодействием быстронаведенных электрических дипольных моментов ароматических токов хромофоров молекул [9].

Влияние массивных боковых привесков в структуре молекулы на процесс ассоциации может быть также количественно оценено при помощи параметра кооперативности агрегации σ . Из таблицы 1 следует, что σ практически равно 1, что свидетельствует о некооперативности процесса самоассоциации. В работе [6] при исследовании агрегации акридиновых красителей было показано, что выраженная кооперативность образования агрегатов более высокого порядка, чем димеры ($\sigma = 0.4 \dots 0.5$), обусловлена отсутствием массивных боковых групп, которые могли бы создавать стерические препятствия для посадки третьей и более молекул на димер. Появление в структуре хромофора объемных боковых привесков, как, например, фенольное кольцо бромистого этидия, приводило к возрастанию фактора кооперативности до единицы, а для антибиотиков антрациклинового ряда – до 1,3 и выше [10]. В случае антибиотика норфлоксацина близость параметра кооперативности к единице свидетельствует о взаимной компенсации кооперативного вклада от повышенной гидрофобности молекулы и антикооперативного вклада от массивного бокового кольца NOR, при образовании агрегатов более высокого порядка, чем димеры.

Расчет структуры димерного комплекса норфлоксацина в водном растворе выполнен методами молекулярной механики с использованием программы X-PLOR (версия 3.851). Водное окружение моделировалось молекулами воды в виде TIP3P, размещенными в прямоугольном боксе (1100 молекул). Топология молекул NOR и параметризация их валентных взаимодействий получены с помощью программы XPLO2D с использованием кристаллических структур из PDB-банка данных. Параметры невалентных взаимодействий между атомами соответствуют силовому полю MM3. На рисунке 4 представлена найденная в результате расчетов наиболее вероятная структура димерного комплекса антибиотика.

Плоскости хромофоров молекул практически параллельны друг другу и расположены на расстоянии ~0,34 нм. Рассчитанная структура комплекса отвечает минимуму потенциальной энергии этой системы, определенной методом молекулярного моделирования.

Выводы. Проведенные в настоящей работе исследования методом ^1H ЯМР спектроскопии

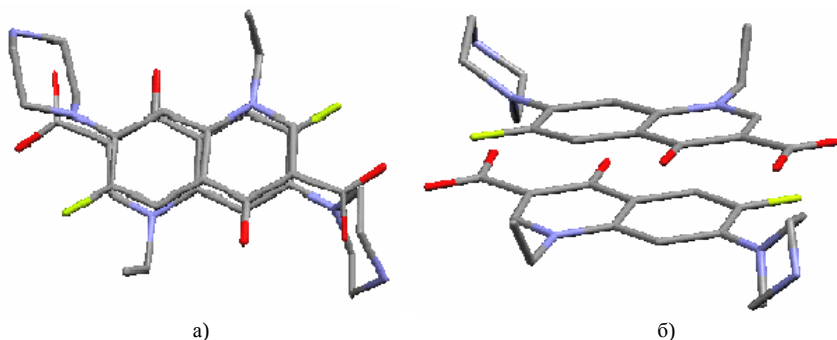


Рисунок 4 – Пространственная структура димера антибиотика норфлоксацина:

а) – вид сверху, перпендикулярно плоскостям хромофоров антибиотика;

б) – вид на молекулярный ассоциат сбоку

самоассоциации фторхинолонового антибиотика норфлоксацина свидетельствуют о повышенной тенденции к самоассоциации этого антибиотика в физиологическом растворе. Это дает основание утверждать, что димеризация молекул NOR вблизи комплекса гираза – ДНК действительно может происходить, что в свою очередь коррелирует с существующим представлением об интеркаляции димера молекул NOR в комплекс гираза-ДНК с последующим блокированием процесса репликации ДНК [4].

Библиографический список

1. Christian J.S. The quinolone antibiotics / J.S. Christian // *Obstetrics and Gynecology*. — 1996. — V. 3. — P. 87–92.
2. Appelbaum P.C. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives / P.C. Appelbaum, P.A. Hunter // *Int. J. Antimicrob. Agents*. — 2000. — V. 16. — P. 5–15.
3. Mechanism of quinolone inhibition of DNA gyrase / L.L. Shen, W.E. Kohlbrenner, D. Weigl, J. Baranowski // *J. Biol. Chem.* — 1989. — V. 264. — P. 2973–2978.
4. Shen L.L. Molecular mechanisms of DNA gyrase inhibition by quinolone antibacterials // *Adv. Pharmacol.* — 1994. — V. 29A. — P. 285–304.
5. Martin R.B. Comparisons of indefinite self-association models / R.B. Martin // *Chem. Rev.* — 1996. — V. 96. — P. 3043–3064.
6. Davies D.B. ^1H NMR investigation of self-association of aromatic drug molecules in aqueous solution / D.B. Davies, L.N. Djimant, A.N. Veselkov // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* — 1996. — V. 92. — P. 383–390.
7. ^1H NMR studies of selective interactions of norfloxacin with double stranded DNA / K. Sandström, S. Wärmländer, M. Leijon, A. Gröslund // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2003. — V. 304. — P. 55–59.
8. 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.
9. Ross R.D Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability / R.D. Ross, S. Subramanian // *Biochemistry*. — 1981. — V. 20. — P. 3096–3102.
10. Исследование самоассоциации молекул антрациклиновых антибиотиков в водном растворе методом ^1H -ЯМР-спектроскопии / Р.Дж. Итон, Д.А. Веселков, С.Ф. Барановский, С.Г. Осетров и др. // *Хим. физика*. — 2000. — Т. 19 — С. 98–104.

Поступила в редакцию 4.02.2005 г.