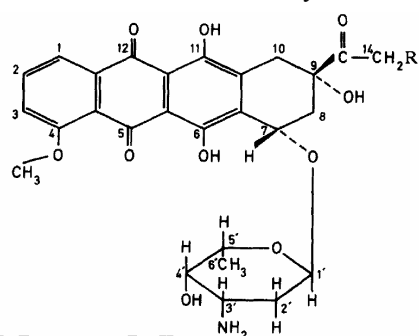


ИССЛЕДОВАНИЕ САМОАССОЦИИ АНТИОПУХОЛЕВОГО АНТИБИОТИКА ДОКСОРУБИЦИНА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ^1H ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

Представлены результаты исследования самоассоциации антибиотика доксорубина в водном растворе методом 1М и 2М ^1H -ЯМР спектроскопии (500 МГц). Определены структурные и термодинамические параметры самоассоциации, рассчитана наиболее вероятная пространственная структура 1:1 димера молекул антибиотика в растворе. Проведен сравнительный анализ параметров самоассоциации молекул доксорубина и дауномицина в идентичных экспериментальных условиях.

Введение. Антиопухолевые антибиотики доксорубин (DOX) и дауномицин (DAU) принадлежат к группе антрациклиновых антибиотиков и являются базовыми компонентами химиотерапии многих типов злокачественных опухолей [1]. Использование антибиотиков антрациклиновой серии в клинических условиях всегда сопровождается нежелательными побочными эффектами, наиболее опасной из которых является дозозависимая кардиотоксичность, что ограничивает их применение в терапии раковых заболеваний [2]. По своему химическому строению доксорубин и дауномицин практически идентичны



I Дауномицин R = H
II Доксорубин R = OH

Рисунок 1 – Структурные схемы молекул дауномицина и доксорубина

друг другу – основу этих молекул образует агликоновый хромофор с массивным положительно заряженным аминсахаром в положении 7, а различие определяется типом радикала в положении 14 (рисунок 1). Вместе с тем DOX характеризуется улучшенным химиотерапевтическим индексом по сравнению с DAU, что обуславливает более широкое применение этого антибиотика в терапии твердотельных опухолей [2].

На сегодняшний день считается, что интеркаляция в ДНК с последующим ингибированием матричного синтеза, является основной причиной антиканцерогенной активности антибиотиков антрациклиновой серии [3]. Ранее было показано, что корректный термодинамический анализ взаимодействия DAU/DOX с ДНК требует учета самоассоциации антибиотика, если используемые экспериментальные концентрации попадают в диапазон десятков μM и выше [4]. Кроме этого в работе [5] было указано на возможную

биологическую роль агрегации антрациклиновых антибиотиков, изменяющую характеристики их транспорта через клеточную мембрану. Исследования самоассоциации антрациклиновых антибиотиков, проведенные ранее, были преимущественно сконцентрированы на дауномицине в связи с его лучшей растворимостью и температурной стабильностью в сравнении, например, с доксорубином [4 и ссылки в ней]. Предварительное тестирование растворимости доксорубина показало, что антибиотик не растворяется в фосфатном буфере в концентрациях достаточных для проведения ЯМР-эксперимента, но в то же время хорошо растворим в HEPES и TRIS буферах. В связи с тем, что дейтерированная форма TRIS буфера содержит незначительное число остаточных пиков в протонном спектре ЯМР, в настоящей работе было проведено исследование самоассоциации антибиотика доксорубина в TRIS буфере методом 1М и 2М ^1H ЯМР-спектроскопии. С целью исключения возможного влияния типа буфера на параметры ассоциации, дополнительно были проведены измерения самоассоциации дауномицина в TRIS буфере в идентичных экспериментальных условиях.

Методика эксперимента. Антибиотики доксорубин и дауномицин ("Sigma") использовали без дополнительной очистки, лиофилизировали из D_2O с изотопной чистотой 99.95% D ("Sigma") и растворяли в дейтерированном 0.1М Tris-буфере (pD 7.3), содержащем 10^{-4} моль/л ЭДТА.

1М- и 2М- ^1H -ЯМР спектры измерены на спектрометре "Bruker DRX" с резонансной частотой 500 МГц. Остаточный сигнал HDO насыщался в период детектирования. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов выполнены при температуре $T = 303\text{K}$ в интервале концентраций от 3.5 до 0.1 ммоль/л; температурные зависимости химических сдвигов измерены в диапазоне температур от 278K до 318K для DOX и от 278K до 348K для DAU. Сравнительно узкий температурный диапазон для DOX выбран с учетом нестабильности антибиотика в растворе при температурах выше 320K. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5 сульфокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония (TMA). Измерения проводились в стандартных ампулах с внешним диаметром 5 мм, минимальный объем используемого раствора 0.5 мл. Стабилизацию температуры в процессе измерений осуществляли терморегулятором BVT-3000.

Результаты и обсуждение. Отнесение сигналов в спектре ^1H -ЯМР DOX и DAU получено на основании двумерных гомоядерных TOCSY и ROESY экспериментов. На рисунке 2 представлены концентрационные и температурные зависимости химических сдвигов необмениваемых ароматических протонов антибиотиков.

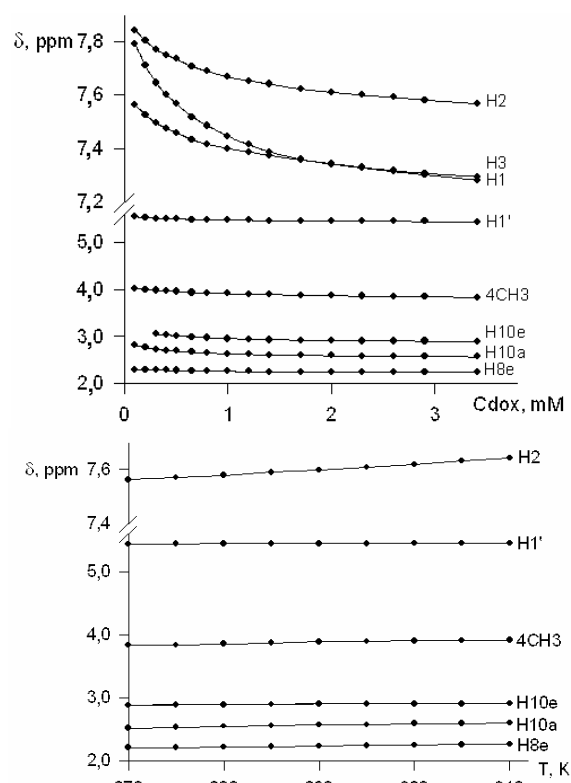


Рисунок 2 – Экспериментальные концентрационные ($T = 303\text{ K}$) и температурные ($C = 1.7\text{ mM}$) зависимости химических сдвигов протонов DOX в 0.1M Tris-буфере, pH 7.3

Для интерпретации экспериментальных данных, как и ранее [6], использовали модель бесконечномерной некооперативной самоассоциации молекул. В такой модели зависимость химического сдвига δ от концентрации x имеет вид:

$$\delta = \delta_m + \left(\delta_i - \delta_m \right) \cdot \frac{(2Kx_0 + 1) - \sqrt{(4Kx_0 + 1)}}{Kx_0}, \quad (1)$$

где δ_i – протонный химический сдвиг для молекулы антибиотика внутри ассоциата; δ_m – протонный химический сдвиг в мономере, т.е. при бесконечном разбавлении; K – равновесная константа самоассоциации; x_0 – общая концентрация молекул в растворе. Численная процедура нахождения параметров модели (1) δ_m , δ_i и K описана в [6]. Результаты расчетов параметров для рассматриваемых протонов антибиотиков приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры самоассоциации DAU и DOX в 0,1M TRIS-буфере pH 7.3

Протон		DAU	DOX
H1	δ_m	7,91	7,95
	δ_d	7,47	7,47
H2	δ_m	7,89	7,90
	δ_d	7,62	7,66
H3	δ_m	7,61	7,61
	δ_d	7,37	7,35
H1'	δ_m	5,55	5,57
	δ_d	5,47	5,47
4Me	δ_m	4,06	4,05
	δ_d	3,89	3,87
H10e	δ_m	3,10	3,16
	δ_d	2,89	2,95
H10a	δ_m	2,88	2,86
	δ_d	2,66	2,64
H8e	δ_m	2,28	2,32
	δ_d	2,23	2,27
σ		$1,34 \pm 0,06$	$1,3 \pm 0,2$
K , л/моль		1130 ± 170	1500 ± 400
$-\Delta H$, кДж/моль		$34,5 \pm 2,7$	$26,0 \pm 3,0$
$-\Delta S$, Дж/моль·K		55 ± 10	25 ± 8

Экспериментальные результаты (рисунок 2) были проанализированы также с помощью бесконечномерной кооперативной модели самоассоциации, которая приводит к следующей зависимости химического сдвига δ от концентрации [6]:

$$\frac{\delta - \delta_m}{\delta_i - \delta_m} = 1 - \frac{x_1}{x_0} - \frac{\sigma K x_1^2}{x_0(1 - K x_1)}, \quad (2)$$

где x_1 – концентрация мономеров антибиотика в растворе и σ – параметр кооперативности. Кооперативная модель содержит четыре неизвестных параметра – δ_m , δ_i , σ и K , подлежащих определению по экспериментальным концентрационным зависимостям химического сдвига. Значения рассчитанных параметров представлены в таблице 1.

При вычислении термодинамических параметров использовали соотношение (3), в которых влияние температуры на значение $\delta(T)$ определяется температурной зависимостью равновесных констант само- и гетероассоциации молекул, согласно соотношению

$$K(T) = \exp\left(\frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT}\right), \quad (3)$$

в предположении, что величины ΔS^0 и ΔH^0 не зависят существенным образом от температуры в исследованном диапазоне температур [6].

Значения индуцированных протонных химических сдвигов, были использованы для определения начальной ориентации хромофоров молекул DOX и DAU в димерном комплексе, и далее методом молекулярной механики была рассчитана усредненная структура 1:1 комплекса молекул DOX и DAU в растворе (рисунки 3, 4). Распределение зарядов на атомных группах молекул DOX и DAU было взято из работы [7].

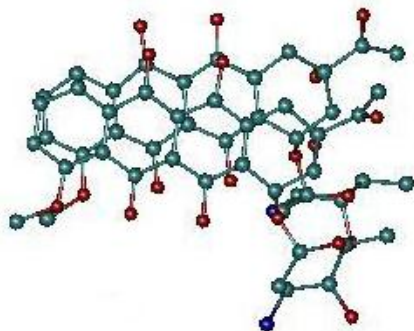


Рисунок 3 – Расчетная структура 1:1 димерного комплекса DAU вид сверху

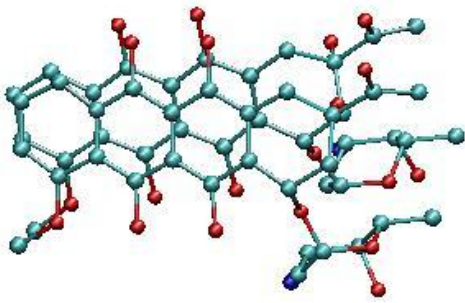


Рисунок 4 – Расчетная структура 1:1 димерного комплекса DOX вид сверху

Сравнение предельных (δ_m) и индуцированных (δ_d) химических сдвигов обоих антибиотиков позволяет сделать вывод о незначительном влиянии на величину δ (в пределах 0.06 ppm) замены группы Н у дауномицина на группу ОН у доксорубина в положении С14 антрациклинового хромофора. Кроме этого, относительное изменение химического сдвига не носит систематического характера как для протонов кольца А, так и для протонов кольца D хромофора антибиотиков, что можно было бы ожидать, учитывая принадлежность модифицируемой группы С14 кольцу А. Последнее дает основание предположить одинаковый характер стэкинга молекул обоих антибиотиков в растворе, что подтверждается подобием расчетных структур димерных комплексов DOX и DAU (рисунки 3, 4).

Незначительное влияние замены группы Н на ОН в положении С14 антрациклинового хромофора на характер стэкинга хромофоров DOX по сравнению с DAU также следует из сравнительного анализа фактора кооперативности агрегации, σ , совпадающий для обоих антибиотиков в пределах погрешности определения (таблица 1).

Сравнение равновесных констант самоассоциации DOX и DAU (K) свидетельствует о незначительном превышении K_{DOX} над K_{DAU} , попадающем в пределы погрешности расчета констант, и о существенном различии термодинамических параметров (ΔH , ΔS) самоассоциации DOX от DAU. Многочисленные исследования самоассоциации ароматических молекул, проведенные ранее различными методами, свидетельствуют о том, что основной вклад в энергетику реакций самоассоциации дают дисперсионные и гидрофобные взаимодействия агрегирующих ароматических молекул [6]. Если считать, что интенсивность дисперсионных взаимодействий приблизительно одинакова в димере DAU и DOX, что следует из подобия структур (рисунки 3 и 4) и близости предельных и индуцированных химических сдвигов исследуемых антибиотиков (таблица 1), то можно предположить, что именно в гидрофобном вкладе проявляется химическое различие молекул DOX и DAU. Замена группы Н на ОН у доксорубина способную к образованию водородной связи, очевидно изменяет энергетику гидратации DOX по сравнению с DAU. Димеризация плоских ароматических молекул как известно, приводит к частичному высвобождению молекул воды из объема образующегося димерного комплекса и соответствующему положительному гидрофобному вкладу как в энтропию, так и в энтальпию реакции самоассоциации [6]. Большая степень гидратации DOX означает большую структурированность воды в окрестности мономеров, что, соответственно должно привести к большему положительному гидрофобному вкладу в ΔH и ΔS в процессе высвобождения молекул при образовании димера DOX в сравнении с димером

DAU. Последнее позволяет объяснить видимые различия расчетных значений термодинамических параметров реакции самоассоциации молекул DOX и DAU (таблица 1).

Важно подчеркнуть, что предложенная в настоящей работе причина различия энергетических параметров самоассоциации DOX и DAU связана исключительно со способностью ОН-группы DOX образовывать водородные связи на воду. Это дает основание предположить, что именно донорно-акцепторные свойства этой группы ответственны за наблюдаемое различие биологической активности антибиотиков DOX и DAU *in vivo*, что, по-видимому, должно играть большую роль при связывании антрациклиновых антибиотиков с ДНК и белками. Последнее находит подтверждение в том, что константа комплексообразования DOX с полимерной ДНК по данным разных авторов почти на порядок превышает константу комплексообразования для DAU [8].

Равновесная константа самоассоциации, полученная в настоящей работе методом ЯМР, почти на порядок меньше константы самоассоциации доксорубина полученной различными авторами спектрофотометрическим методом [9]. Следует отметить, что аналогичный разброс констант ассоциации имеет место и для дауномицина [4], если используются различные экспериментальные методики и диапазоны концентраций. Важно лишь то, что во всех без исключения случаях K_{DOX} превышает K_{DAU} [4,9 и ссылки в них], что находится в полном согласии с выводами настоящей работы.

Библиографический список

1. Chu E. Physicians' cancer chemotherapy drug manual / E. Chu, V.T. DeVita. — London: Jones and Bartlett Publ., 2003. — 512 p.
2. Hortobagyi G.N. Anthracyclines in the treatment of cancer / G.N. Hortobagyi // *Drugs*. — 1997. — V. 54. Suppl. 4. — P. 1–7.
3. Arcamone F. Anthracyclines and Anthracenedione - based Anticancer Agents / F.Arcamone, S. Penco / Ed. J.W. Lown. — N. Y., 1988. — 43 p.
4. Chaires J.B. Self-association of daunomycin / J.B. Chaires, N. Dattagupta, D.M. Crothers // *Biochemistry*. — 1982. — V. 21. — P. 3927–3932.
5. Dalmark M. Molecular associations between Doxorubicin (Adriamycin) and DNA-derived bases, nucleosides, nucleotides, other aromatic compound and proteins in aqueous solution / M. Dalmark, P. Johansen // *Mol. Pharm.* — 1982. — V. 22. — P. 158–165.
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. Nakata Y. An extended conformational analysis of doxorubicin / Y. Nakata, A.J. Hopfinger // *FEBS Lett.* — 1980. — V. 117. — № 1. — P. 259–264.
8. Rizzo V. Fluorescence stopped-flow kinetic analysis of anthracycline-DNA interaction / V. Rizzo, N. Sacchi, L. Valentini // *Biochem.Pharm.* — 1988. — V. 37. — P. 1819–1820.
9. 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.

Поступила в редакцию 19.01.2005 г.