

УДК 577.113:541.49

Д.Д. Андреюк, магистрант

Севастопольский национальный технический университет

ул. Университетская, 33, Севастополь, 99053, Украина

E-mail: andreiyuk_d@mail.ru

А.А. Эрнандес Сантьяго, д-р филос. (PhD)

А.М. Сервантес Тавера, д-р филос. (PhD)

Автономный университет Пуэбла, Мексика

Д.В. Овчинников, научный сотрудник

Санкт-Петербургский химико-технологический институт, Санкт-Петербург, Россия

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ТЕОБРОМИНА И ПАРАКСАНТИНА С АРОМАТИЧЕСКИМИ ЛИГАНДАМИ

В работе методом ^1H ЯМР спектроскопии изучена гетероассоциация диметилксантинов теобромина и параксантина с ароматическими антибиотиками и мутагенами в водно-солевом растворе. Получены равновесные константы ассоциации, магнитное экранирование и структуры 1:1 комплексов.

Ключевые слова: *гетероассоциация, диметилксантин, ароматический антибиотик, ароматический мутаген*

Введение

Цель. Провести методом ^1H ЯМР спектроскопии структурный анализ гетероассоциации в системах ТНВ/PARA-БАС.

Теобромин (ТНВ) и параксантин (PARA) являются представителями ряда ксантинов, к которым относятся также кофеин (CAF) и теофиллин (ТНР) (рисунок 1). Содержание данных веществ в организме человека достаточно велико и составляет порядка 2,5 мг на 1 кг тела человека [1]. Основными источниками поступления метилксантинов в организм человека являются кофе, шоколад, чай, а также некоторые другие напитки и продукты питания.

Кофеин является наиболее распространенным и известным представителем из ряда метилксантинов. Он поступает вместе с потребляемой человеком пищей в большом количестве. Основное действие кофеина заключается в стимулирующем воздействии на нервную систему. Кроме того, было установлено, что CAF ингибирует синтез ДНК, увеличивает конденсацию хроматина и вызывает другие клеточные эффекты. Природным метаболитом кофеина является теофиллин, который отличается количеством и положением метильных групп, что приводит к определенной специфичности медико-биологических и физико-химических свойств этого соединения. В частности, он также оказывает стимулирующее действие на центральную нервную систему, хотя и менее выраженное, чем кофеин; усиливает сократительную деятельность миокарда. Несколько расширяет периферические, коронарные и почечные сосуды, ингибирует агрегацию тромбоцитов. Особенно важной является способность теофиллина оказывать бронхорасширяющий эффект. Наряду с теофиллином в результате процессов метаболизма образуются теобромин и параксантин. По химическому строению и фармакологическим свойствам теобромин близок к другим алкалоидам пуринового ряда. Оказывает стимулирующее влияние на сердечную деятельность, несколько расширяет коронарные сосуды сердца и бронхи. По сравнению с кофеином теобромин вызывает слабое возбуждение ЦНС. Применяется главным образом при несильно выраженных спазмах сосудов головного мозга. Теофиллин, теобромин и параксантин являются диметилксантиновыми производными CAF и отличаются от него только расположением метильных групп (см. рисунок 1), что, однако, приводит к существенному различию фармакологического действия при попадании в организм.

Биологически активные ароматические соединения (БАС) составляют важнейшую группу лекарственных препаратов, широко используемых в медицинской практике [2]. В частности, антибиотики антрациклинового ряда (например, дауномицин – DAU, рисунок 1,д) применяют при лечении твердотельных опухолей и лейкемии, акридиновые (например, профлавин – PF, рисунок 1,е) и фенантридиновые (например, бромистый этидий – EB, рисунок 1,ж) красители проявляют ярко выраженную антибактериальную активность. Вместе с тем практически все ароматические препараты проявляют побочную токсичность при их использовании в лечебной практике. Уровень токсичности может быть снижен путем комбинирования ароматических препаратов и их совместного использования с некоторыми метилксантинами или витаминами [3,4].

Ранее было установлено, что механизм изменения медико-биологического действия ароматических БАС в присутствии CAF [3] и ТНР [5] осуществляется путем конкурентного комплексобразования их с биополимерами в клетке – ДНК, РНК или белками – а также

гетероасоціації САФ/ТНВ-БАС. Оскільки ТНВ і PARA являються фізіологічними производними САФ, можна передположити, що аналогічні механізми біологічного дії також будуть справедливі і в системах ТНВ/PARA-БАС. В нашіє час в літературі відсутній будь-яка інформація про гетероасоціації ТНВ/PARA з ароматичними БАС, що не дає можливості інтерпретації і кількісної оцінки ефектів дії цих диметилксантинів при спільному використанні з ароматичними лікарськими препаратами.

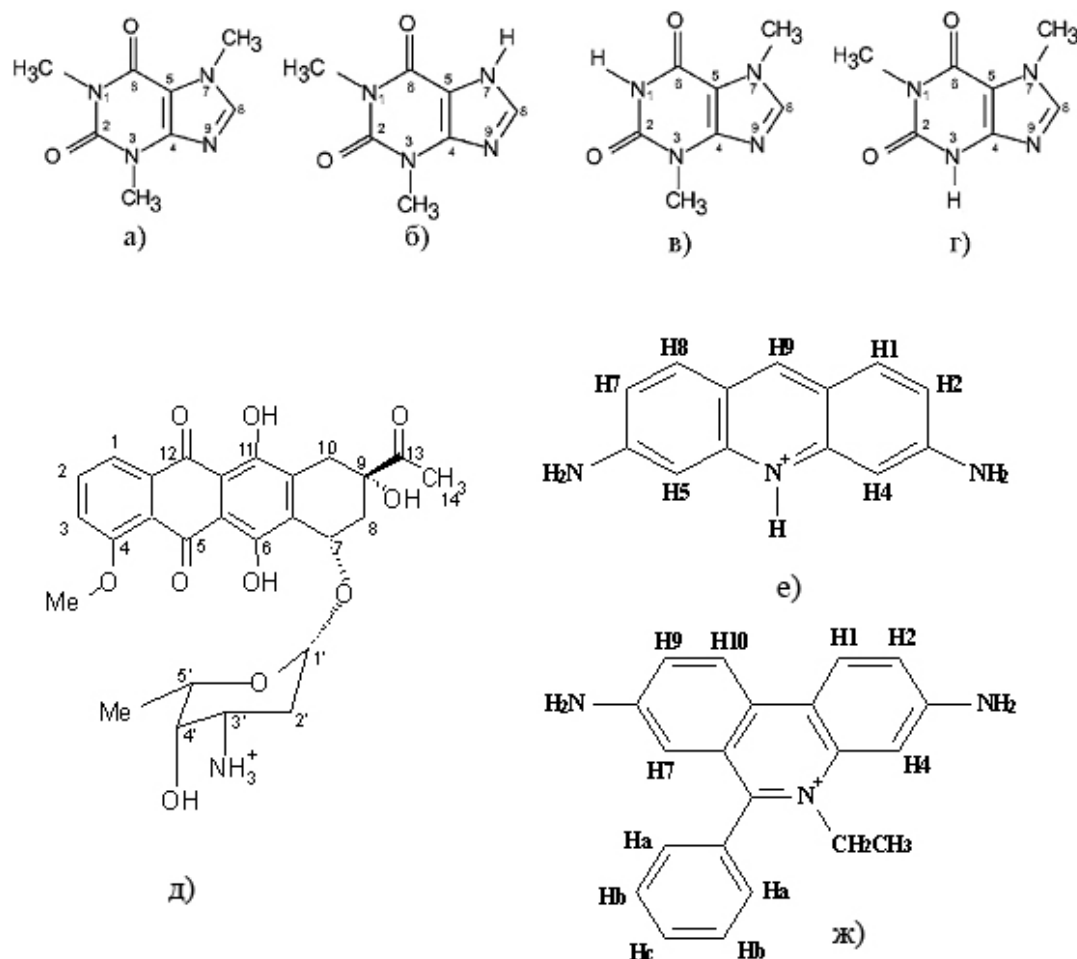


Рисунок 1 – Структурні формули досліджуваних сполук: а) – кофеїн; б) – теофілін; в) – теобромін; г) – параксантин; д) – дауномицин; е) – профлавін; ж) – бромистий етидій

В нашієй роботі методом ^1H ЯМР спектроскопії приведено структурний аналіз гетероасоціації в системах ТНВ/PARA-БАС.

Методика експеримента

ЯМР-експеримент. Дауномицин ("Fluka"), профлавін, бромистий етидій, теобромін і параксантин фірми "Sigma" використовувалися без подальшої очистки. Образці розчиняли в D_2O з ізотопної чистотою 99,95% ("Sigma") і ліофілізували. Розчини готували шляхом додавання вваженого кількості зразка в дейтерійований 0,1 М фосфатний буфер (pD 7,1), що містить 10^{-4} моль/л EDTA. Всі експерименти проводилися при однаковій температурі $T = 298\text{K}$.

^1H ЯМР спектри виміряні на спектрометрі "Varian" з резонансною частотою 500 МГц. Відношення сигналів не обмінюваних протонів речовин реєструвалися з допомогою двовимірних гомоядерних TOCSY і ROESY експериментів. Концентраційні вимірювання протонних хімічних зсвігів молекул в сумішних розчинах Лиганд-метилксантин (ТНВ/PARA-DAU/PF/EB) виконані при фіксованій концентрації метилксантинів і варіюваної концентрації ліганду. В відмінність від параксантина, теобромін погано розчиним в мілімолярному діапазоні концентрацій. В зв'язі з цим, для визначення точної концентрації ТНВ в приготуваному розчині визначалися інтеграли піків збігаються протонів у PARA і ТНВ в сумішному розчині ТНВ-PARA, і далі по відношенню значень інтегралів і відомої концентрації PARA визначалася концентрація ТНВ (рисунки 2).

Все ЯМР измерения проведены в условиях быстрого обмена в масштабе времени ЯМР. Стабилизацию температуры в процессе измерений осуществляли терморегулятором BVT-3000. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2 диметил-2-силапентан-5-сульфокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония (ТМА), т.е. $\text{ДСС} = \text{ТМА} + 3,178$ (млн⁻¹).

Методика расчета структур комплексов. Расчет пространственных структур 1:1 комплексов метилксантин-лиганд в водном окружении, как и ранее [4], проводился методом молекулярной механики с использованием программы X-PLOR и силового поля Charmm22. Моделирование водного окружения выполнялось молекулами воды в виде TIP3P, помещенных в прямоугольный бокс (1100 молекул). Топология всех изучаемых молекул и параметризация их валентных взаимодействий была получена с помощью программы XPLO2D с использованием кристаллических структур из PDB банка.

Параметры невалентных взаимодействий между атомами соответствовали силовому полю MM3. До минимизации энергии исходные структуры 1:1 гетерокомплексов метилксантин-лиганд были построены исходя из анализа индуцированных химических сдвигов, $\Delta\delta$, протонов взаимодействующих молекул.

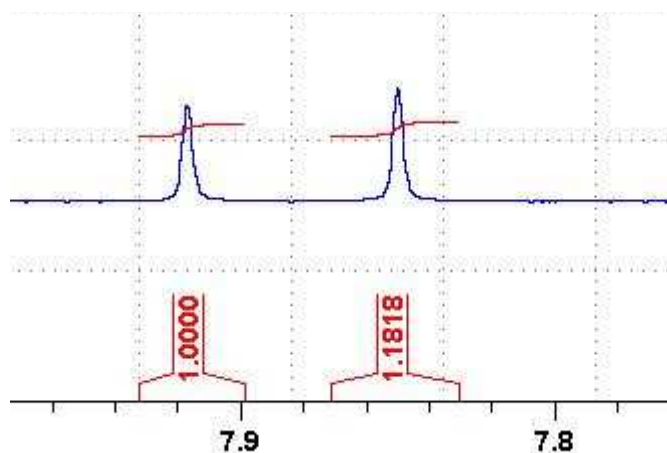


Рисунок 2 – Соотношение значений интегралов пиков протонов THB и PARA

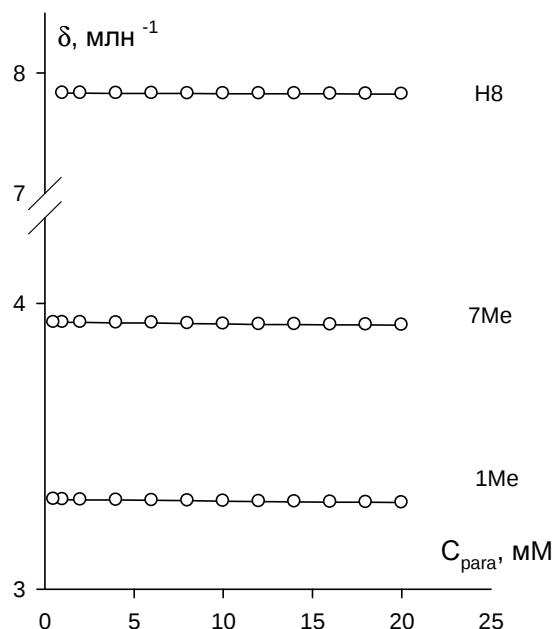


Рисунок 3 – Экспериментальные зависимости химических сдвигов протонов параксантина от концентрации

Результаты и обсуждение

Самоассоциация PARA и THB. Поскольку типичные концентрации ароматических молекул, используемые в ЯМР эксперименте, как правило, относятся к миллимолярному диапазону, необходимо учитывать самоассоциацию исследуемых диметилксантинов в водной среде. В настоящей работе

самоасоціація THB і PARA досліджувалась в однакових експериментальних умовах (pD 7,1, 0,1 М Na-фосфатний буфер), аналогічних досліджуваним раніше ароматическим соединениям (DAU, PF, EB) [4,5].

Експериментальні концентраційні залежності хімічних зсигналів протонів PARA представлені на рисунку 3. ЯМР дані по самоасоціації PARA були проаналізовані в рамках нескінченномерної некооперативної моделі, в якій полагается, що ароматическі молекули в розчині агрегують з однаковою константою самоасоціації K [6]. В зв'язі з обмеженою розчинністю THB (< 2 мМ) повноцінний аналіз самоасоціації цього соединения, к сожалению, не удалось провести. Залежність спостережуваних хімічних зсигналів, δ , від концентрації ароматических молекул, x_0 (рисунк 3) описується виразом (1):

$$\delta = \delta_m + (\delta_d - \delta_m) \cdot \frac{2 \cdot K \cdot x_0 + 1 - \sqrt{4K \cdot x_0 + 1}}{K \cdot x_0}, \quad (1)$$

де δ_m , δ_d – хіміческі зсигнали відповідно в мономерній і димерній формах (або на краях агрегата) ксантину в розчині, x_1 – концентрація мономерів [6].

Концентраційні залежності апроксимувалися при допомозі чисельної процедури шляхом варіації параметрів $K/\delta_m/\delta_d$ для знаходження мінімуму функції невязки

$$\Delta = \sum_i (\delta_i - \delta_{ei})^2, \quad (2)$$

де δ_i і δ_e – розраховані по (1) і експериментальні значення протонного хіміческого зсигналу на поточної i -й концентрації, відповідно. Концентраційна залежність для THB (не приведена) є надзвичайно слабкою, що, з однієї сторони, не дозволяє отримати надійне значення константи самоасоціації і параметра δ_d , а з іншої сторони, свідчить про мале значення K . В зв'язі з цим самоасоціацією THB в подальшому аналізі гетероасоціації можна пренебріти. Єдинствений параметр, який може бути виведений з експериментальних даних по самоасоціації теоброміна – це граничний хіміческій зсигнал в мономері, δ_m , отримуваний шляхом екстраполяції експериментальних концентраційних кривих в область нульової концентрації. Розраховані значення параметрів самоасоціації THB і PARA, а також екстрапольоване значення δ_m (THB), приведені в таблиці 1. Для порівняння в цій же таблиці приведені відповідні параметри інших ксантинів – THP і CAF.

Таблиця 1 – Значення розрахованих параметрів самоасоціації метилксантинів

Ліганд	δ_m , мМ ⁻¹				δ_d , мМ ⁻¹			
	H8	7Me	3Me	1Me	H8	7Me	3Me	1Me
THB	7,90	3,94	3,49	—	—			
PARA	7,83	3,94	—	3,32	7,80	3,89	—	3,26
THP [5]	8,02	—	3,58	3,37	7,81	—	3,28	3,12
CAF [3]	7,89	3,95	3,54	3,35	7,83	3,82	3,33	3,16

Аналіз розрахованих значень хіміческого зсигналу δ_m дозволяє зробити деякі висновки про особливості магнітного екранування ароматических протонів метилксантинів. Значення δ_m 7Me групи практично ідентичні у THB і PARA (см. таблицю 1), т.е. положення метильної групи (1 або 3) не впливає на хіміческій зсигнал 7Me групи. В той же час хіміческі зсигнали 1Me групи у THP і CAF також достатньо близькі один до одного, відповідно, наявність 7Me групи не впливає на хіміческій зсигнал 3Me групи. Розраховані параметри самоасоціації (см. таблицю 1) можуть бути далі використані для аналізу гетероасоціації.

Гетероасоціація PARA/THB з ароматическими лігандами. Динамічне рівновагу в розчині, що містить два типи взаємодіючих ароматических молекул X (ліганд) і Y (метилксантин), може бути описано в загальному випадку з урахуванням нескінченномерної самоасоціації обох компонентів і їх гетероасоціації, що призводить до формування різних типів гетерокомплексів в розчині, в яких хіміческі зсигнали X і Y компонентів описуються виразом (3) [4].

$$\left\{ \begin{aligned} \delta_x &= \frac{x_1}{x_0} \cdot \left[\delta_{mX} \left(2(1+K_X x_1) - \frac{1}{(1-K_X x_1)^2} \right) + 2\delta_{dX} \left(\frac{1}{(1-K_X x_1)^2} - 1 - K_X x_1 \right) + \right. \\ &\quad \left. + \delta_{hX} \frac{K_h y_1}{(1-K_X x_1)^2 (1-K_Y y_1)} \left(1 + \frac{K_h y_1}{2(1-K_Y y_1)} \right) \right], \\ \delta_y &= \frac{y_1}{y_0} \cdot \left[\delta_{mY} \left(2(1+K_Y y_1) - \frac{1}{(1-K_Y y_1)^2} \right) + 2\delta_{dY} \left(\frac{1}{(1-K_Y y_1)^2} - 1 - K_Y y_1 \right) + \right. \\ &\quad \left. + \delta_{hY} \frac{K_h x_1}{(1-K_Y y_1)^2 (1-K_X x_1)} \left(1 + \frac{K_h x_1}{2(1-K_X x_1)} \right) \right], \end{aligned} \right. \quad (3)$$

где δ_h – химический сдвиг протонов в гетерокомплексе и K_h – равновесная константа гетероассоциации. Величины δ_m , δ_d и равновесные константы самоассоциации K_X , K_Y для соединений PARA/THB/DAU/EB/PF известны из исследования самоассоциации (см. таблицу 1 и работы [6, 7]). Мономерные концентрации x_1 и y_1 могут быть получены из решения уравнения закона сохранения массы в каждой экспериментальной точке в соответствии с выражением (4):

$$\left\{ \begin{aligned} x_0 &= \frac{x_1}{(1-K_X x_1)^2} \left[1 + K_h \frac{y_1}{1-K_Y y_1} + \frac{K_h^2}{2} \cdot \frac{y_1^2}{(1-K_Y y_1)^2} + K_h^2 \frac{x_1 y_1}{(1-K_Y y_1)(1-K_X x_1)} \right] \\ y_0 &= \frac{y_1}{(1-K_Y y_1)^2} \left[1 + K_h \frac{x_1}{1-K_X x_1} + \frac{K_h^2}{2} \cdot \frac{x_1^2}{(1-K_X x_1)^2} + K_h^2 \frac{x_1 y_1}{(1-K_Y y_1)(1-K_X x_1)} \right] \end{aligned} \right. \quad (4)$$

Выражения (3), (4) являются функцией двух неизвестных величин, δ_h и K_h , которые могут быть определены из концентрационных зависимостей δ_e с использованием процедуры минимизации функции невязки (2), аналогично рассмотренному выше методу анализа самоассоциации.

Концентрационные зависимости протонных химических сдвигов исследуемых метилксантинов (THB, PARA) и лигандов (DAU, PF, EB) в смешанном растворе представлены на рисунке 4. Поведение протонных химических сдвигов является качественно подобным для всех других систем метилксантин-лиганд, изучаемых в данной работе, а также систем с THP и CAF, исследованных ранее в работах [3, 5]. В смешанном растворе экспериментальные ^1H ЯМР кривые демонстрируют возрастание экранирования протонов метилксантина при постепенном добавлении лиганда в раствор (см. рисунок 4). Подобное заключение было также сделано ранее для гетероассоциации THP и CAF с различными ароматическими БАС, содержащими два или три сопряженных ароматических кольца, что было интерпретировано как результат стопочной ассоциации ароматических молекул [5]. Отсюда следует, что гетероассоциация в системах THB/PARA-БАС также протекает по типу стопочной ассоциации.

Анализ расчетных значений констант гетероассоциации (таблица 2) свидетельствует об относительно небольшой зависимости величины K_h от числа и положения метильных групп в ксантиновом хромофоре. Наибольшее в среднем сродство ксантины демонстрируют к профлаvinу, что, по-видимому, обусловлено отсутствием массивных боковых групп в структуре красителя в сравнении с EB и DAU (см. рисунок 1).

Таблица 2 – Значение равновесных констант гетероассоциации (M^{-1}) метилксантинов с ароматическими лигандами

Система	DAU	PF	EB
THB	160±40	250±30	170±20
PARA	110±20	155±15	102±9
THP[5]	190±30	180±20	102±6
CAF[3]	72±4	160±17	62±4

Расчетные значения индуцированных химических сдвигов, $\Delta\delta_h = \delta_m - \delta_h$, в 1:1 гетерокомплексах представлены в таблицах 3-5. Как видно из таблиц, протоны THB и PARA систематически экранируются ($\Delta\delta_h > 0$) в гетерокомплексах со всеми изучаемыми лигандами, что соответствует ранее опубликованным результатам по гетероассоциации THP и CAF [3,5] и подтверждает сделанный выше на основании анализа концентрационных кривых вывод о стопочном характере гетероассоциации ксантинов с ароматическими лигандами. Аналогичное экранирование также имеет место для протонов молекул PF и EB, однако для некоторых протонов антибиотика DAU экранирование имеет отрицательное значение для всех без исключения метилксантинов, представленных в таблице 3. Незначительное дезэкранирование протонов DAU в гетерокомплексе с теофиллином [5] ранее интерпретировалось как следствие

существенного различия размеров антрациклина и кофеина, что приводит к выпаданию этих протонов из конуса экранирования молекулы ТНР и, следовательно, дает дезэкранирование в комплексе.

На основании расчетных значений $\Delta\delta_h$ (см. таблицы 3-5) могут быть заданы начальные структуры гетерокомплексов для последующей минимизации методами молекулярного моделирования.

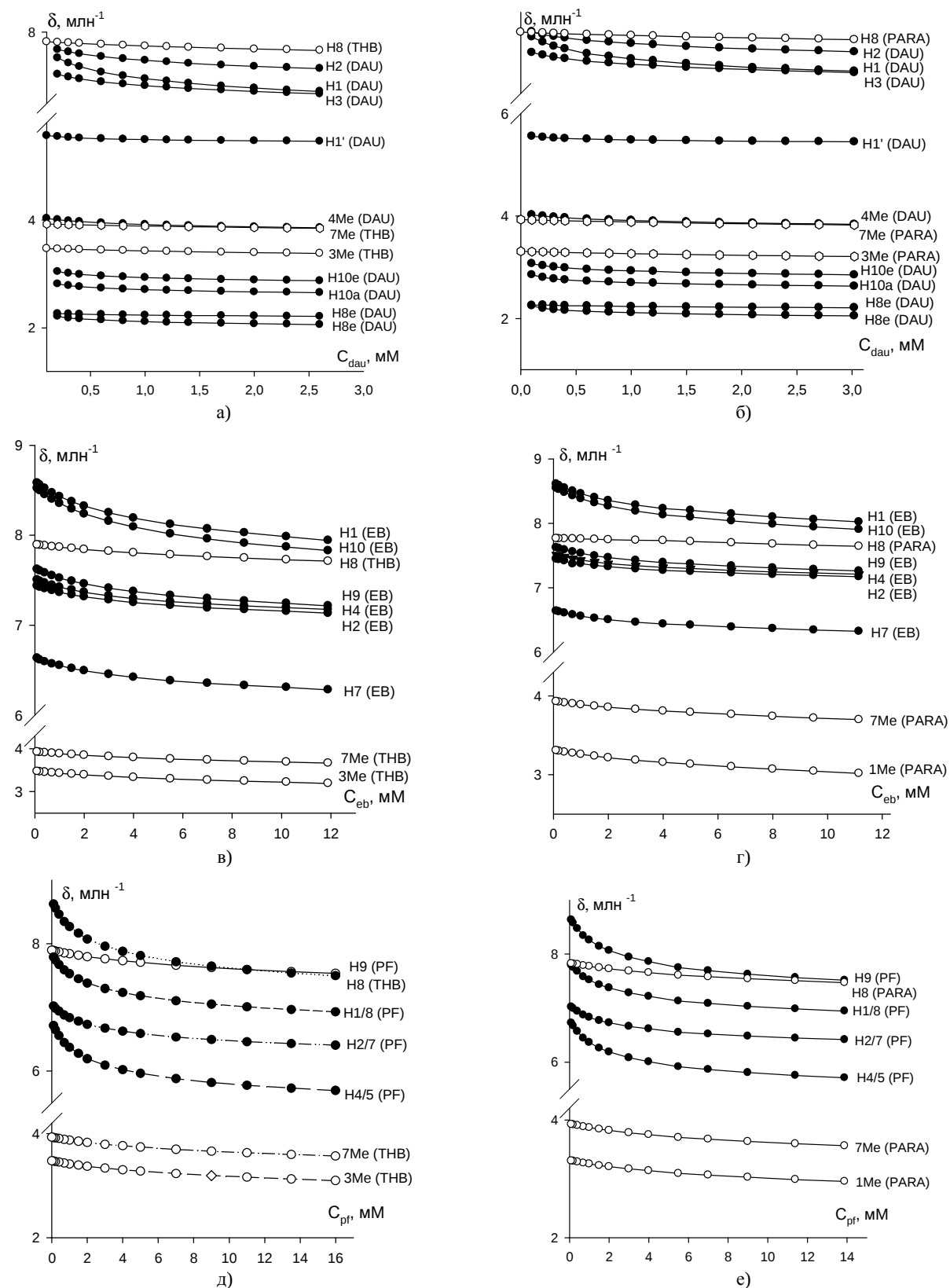


Рисунок 4 – Экспериментальные зависимости химических сдвигов протонов PARA и THB от концентрации EB/PF/DAU в смешанном растворе: а) THB-DAU; б) PARA-DAU; в) THB-EB; г) PARA-EB; д) THB-PF; е) PARA-PF

Таблиця 3 – Значення індуктованих хімічних зсувів протонів метилксантинов і дауномицина при гетероасоціації

Система	Протоны DAU								Протоны ксантина			
	H2	H1	H3	4Me	H1'	H10e	H10a	H8e	H8	7Me	3Me	1Me
DAU+THB	-0,02	0,06	-0,02	-0,01	-0,07	0,01	-0,02	0,03	0,36	0,30	0,37	—
DAU+PARA	-0,07	-0,01	-0,08	-0,04	-0,68	-0,31	-0,18	0,01	0,71	0,75	—	0,72
DAU+THP[5]	0,03	0,25	0,03	0,02	-0,06	0,01	-0,03	0,004	0,46	—	0,55	0,47
DAU+CAF[3]	—								1,34	2,59	1,48	1,54

Таблиця 4 – Значення індуктованих хімічних зсувів протонів метилксантинов і профлавіна при гетероасоціації

Система	Протоны PF				Протоны ксантина			
	H9	H1/8	H2/7	H4/5	H8	7Me	3Me	1Me
PF+THB	0,34	0,20	0,10	0,40	0,62	0,62	0,66	—
PF+PARA	0,31	0,17	0,06	0,35	0,86	0,89	—	0,85
PF+THP[5]	0,53	0,31	0,16	0,61	0,54	—	0,63	0,57
PF+CAF[3]	0,60	0,34	0,16	0,66	0,86	3,08	0,88	0,81

Таблиця 5 – Значення індуктованих хімічних зсувів протонів метилксантинов і бромистого етидія при гетероасоціації

Система	Протоны EB						Протоны ксантина			
	H1	H10	H4	H2	H7	H9	H8	7Me	3Me	1Me
EB+THB	0,15	0,45	0,25	0,16	0,14	0,14	0,38	0,53	0,59	—
EB+PARA	0,35	0,39	0,22	0,16	0,13	0,16	0,54	0,68	—	0,85
EB+THP[5]	0,54	0,56	0,32	0,23	0,20	—	0,53	—	0,66	0,77
EB+CAF[3]	0,92	0,93	0,46	0,40	0,30	—	0,80	2,79	1,10	1,28

Профиль экранирования по протонам лиганда практически одинаков для PARA и THB, что свидетельствует о подобиі структур комплексов этих ксантинов с ароматическими лигандами. Высокое экранирование протонов ксантина означает расположение молекул PARA и THB прямо над ароматической частью хромофоров лигандов. Результаты минимизации исходных структур по энергии представлены на рисунке 5.

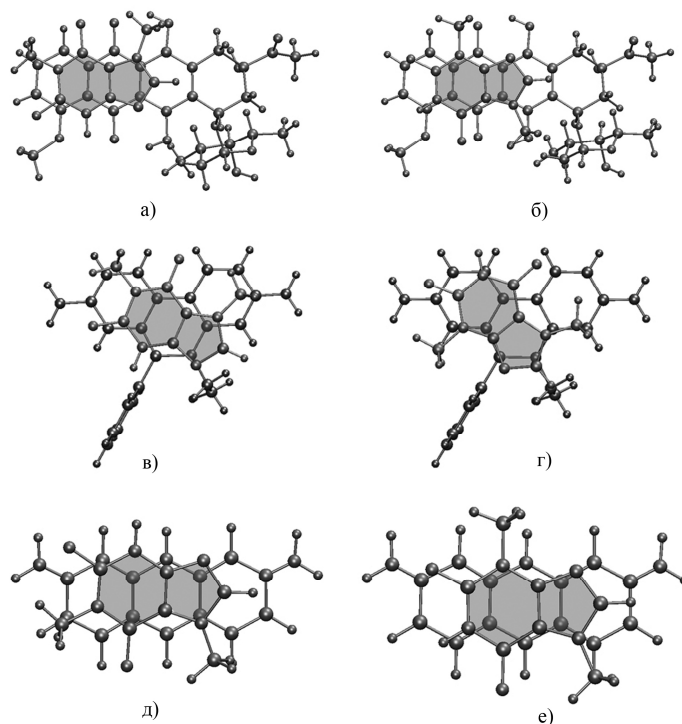


Рисунок 5 – Расчетные структуры 1:1 гетерокомплексов: а) PARA-DAU; б) THB-DAU; в) PARA-EB; г) THB-EB; д) PARA-PF; е) THB-PF

Заключение

Таким образом, результаты проведенного анализа само- и гетероассоциации физиологически важных метаболитов кофеина – теобромину и параксантина – с биологически активными соединениями свидетельствуют о том, что взаимодействие в системе лиганд-диметилксантин происходит в соответствии со стопочным характером агрегации. Полученные параметры гетероассоциации в дальнейшем могут быть использованы для количественного анализа эффектов действия протекторного и интерцепторного механизмов при совместном связывании ароматических БАС и диметилксантинов с ДНК.

Библиографический список

1. Report of fourth international caffeine workshop / P. Dews, H.C. Grice, A. Neims [et al.] // *Fd. Chem. Toxicol.* — 1984. — Vol. 22. — P. 163–169.
2. Stockley I.H. *Stockley's Drug Interactions* / I.H. Stockley. — 6th ed. — L.: Pharm. Press, 2002. — 1080 p.
3. Davies D.B. 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.
4. Evstigneev M.P. Complexation of anthracycline drugs with DNA in the presence of caffeine / M.P. Evstigneev, V.V. Khomich, D.B. Davies // *Eur. Biophys. J.* — 2006. — V. 36. — P. 1–11.
5. Structural and thermodynamic analysis of the hetero-association of theophylline with aromatic drug molecules // D.D. Andrejuk, A.A. Hernandez Santiago, V.V. Khomich [et al.] // *J. Mol. Str.* — 2008. — V. 889. — P. 229–236.
6. Davies D.B. ¹H NMR investigation of self-association of aromatic drug molecules in aqueous solution. Structural and thermodynamical analysis / D.B. Davies, L.N. Djimant, A.N. Veselkov // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* — 1996. — V. 92. — № 3. — P. 383–390.
7. Quantitation of the molecular mechanisms of biological synergism in a mixture of DNA-acting aromatic drugs / M.P. Evstigneev, A.O. Lantushenko, V.P. Evstigneev [et al.] // *Biophys. Chem.* — 2008. — V. 132. — P. 148–158.

Поступила в редакцию 11.03.2009 г.