

УДК 577.113

Е.А. Алескерова, магистрант**О.В. Рогова, канд. физ.-мат. наук, доцент****М.П. Евстигнеев, д-р физ.-мат. наук, профессор***Севастопольский национальный технический университет**ул. Университетская 33, г. Севастополь, Украина, 99053**E-mail: max_evstigneev@mail.ru***КОРРЕЛЯЦИЯ СТРУКТУРНОГО И ЭНТАЛЬПИЙНОГО ФАКТОРОВ ПРИ
ГЕТЕРОАССОЦИИ ФЛАВИН-МОНОНУКЛЕОТИДА С АРОМАТИЧЕСКИМИ
МОЛЕКУЛАМИ**

В работе на примере гетероассоциации производного витамина В₂ флавин-мононуклеотида с различными ароматическими биологически активными соединениями установлена корреляция энергетического (энтальпия) и структурного (площадь перекрытия хромофоров в комплексе) факторов. Предложена методика априорной оценки величины энтальпии реакции гетероассоциации.

Ключевые слова: гетероассоциация, флавин-мононуклеотид, энтальпия, энтропия, площадь перекрытия

Введение

Биологически активные соединения (БАС) широко применяются в медицинской практике и образуют важнейшую группу фармацевтических препаратов. К БАС относятся ароматические антибиотики антрациклиновой группы (дауномицин, доксорубин, ногаламицин, митоксантрон и др.), являющиеся высокоэффективными для лечения твердотельных опухолей и лейкемии; антибиотики хинолоновой серии (норфлоксацин, офлоксацин и др.), проявляющие широкий спектр антибактериальной активности; ароматические витамины (рибофлавин, никотинамид и др.), используемые как антиоксиданты в химиотерапии, и ряд других ароматических препаратов [1].

Для класса ароматических молекул хорошо известна их способность к комплексообразованию в водной среде, приводящая к формированию линейных агрегатов, в которых молекулы располагаются параллельно друг другу [2]. Комплексообразование однотипных соединений называется самоассоциацией, разнотипных – гетероассоциацией.

Гетероассоциация различных БАС является предметом активных исследований последние два десятилетия в связи с биологической значимостью этого процесса [2]. Для класса ароматических БАС гетероассоциация может выступать базовым молекулярным механизмом изменения биологической активности лекарственных препаратов, используемых в комбинации. Так, например, комбинированная терапия, основанная на одновременном или последовательном введении нескольких лекарственных препаратов, является более эффективным методом лечения раковых заболеваний, чем монотерапия (использование одного препарата). Следовательно, изучение закономерностей совместного действия биологически активных ароматических молекул и регуляции медико-биологической активности при их комбинированном использовании связано со всесторонним анализом процессов само- и гетероассоциации ароматических молекул. Для этого, в свою очередь, необходима детальная информация о структуре и энергетике образования комплексов различных комбинаций ароматических соединений.

Поскольку структура образованного комплекса молекул и соответствующие термодинамические параметры являются характеристиками конкретной реакции комплексообразования, вполне ожидаемым является наличие корреляции между структурой и энергетикой в реакциях гетероассоциации ароматических БАС. В связи с этим целью настоящей работы является поиск корреляции структурного и энергетического параметров на примере гетероассоциации производного витамина В₂ – флавиномононуклеотида (FMN) – с ароматическими БАС: актиномицином D (AMD), кофеином (CAF), дауномицином (DAU), бромистым этидием (EB), норфлоксацином (NOR), новатроном (NOV), профлавином (PF). Интерес к системе Витамин-БАС заключается в том, что множество *in vitro* и *in vivo* данных указывает на выраженную детоксификацию биологической системы, содержащей токсичный ароматический препарат, вследствие введения витамина В₂, причем ключевым моментом данного эффекта выступает именно гетероассоциация [2].

Результаты и обсуждение

Гипотеза о существовании взаимосвязи структурного и энтальпийного факторов.

Выше было показано, что ассоциация ароматических систем происходит по типу образования «стопок» молекул стабилизированных стэкинг-взаимодействиями ароматических хромофоров. Энергия

Гиббса реакции комплексообразования молекул определяется суммой энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий ($\Delta G_{\text{вдв}}$), энергии электростатических взаимодействий ($\Delta G_{\text{эл}}$), энергии гидрофобных взаимодействий ($\Delta G_{\text{гид}}$), и специфической энтропийной составляющей ($\Delta G_{\text{энтр}}$), обусловленной изменением трансляционных, ротационных и вибрационных степеней свободы при образовании молекулярных комплексов [3]:

$$\Delta G = \Delta G_{\text{вдв}} + \Delta G_{\text{эл}} + \Delta G_{\text{гид}} + \Delta G_{\text{энтр}}. \quad (1)$$

При этом каждое из слагаемых в (1) имеет в общем случае энтропийную (ΔS) и энтальпийную (ΔH) составляющие:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (2)$$

Основной вклад в энтропию реакции комплексообразования дают гидрофобные взаимодействия и энтропийная составляющая $\Delta G_{\text{энтр}}$, причем $\Delta G_{\text{гид}}$ считается наиболее важной в энергетике комплексообразования в водной среде [4]. Энергия гидрофобных взаимодействий к настоящему времени изучена сравнительно неплохо и установлена её связь со структурным параметром – ΔS_{ASA} , соответствующим изменению площади поверхности молекул при комплексообразовании, доступной для рас творителя, в виде:

$$\Delta G_{\text{гид}} = \gamma \Delta S_{\text{ASA}}, \quad (3)$$

где γ – микроскопический коэффициент поверхностного натяжения.

В свою очередь, вклад в энтальпию комплексообразования дают преимущественно ван-дер-ваальсовы и электростатические силы. Учитывая, что связь структурного и энтропийного факторов устанавливается соотношением (3), а энтропия и энтальпия в (2) связаны хорошо известным для процессов в водной среде эффектом энтальпийно-энтропийной компенсации [5], отсюда вытекает, что ΔH реакции комплексообразования также должна коррелировать со структурой молекулярного комплекса. Рассмотрим эту связь более подробно.

В настоящее время можно считать общепризнанным, что для стэкинга ароматических систем в условиях водного растворителя, близкого по параметрам к физиологической среде, энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий доминирует над энергией электростатических взаимодействий и дает основной вклад в энтальпию реакции ассоциации [6]. Энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий определяется квантово-механическим диполь-дипольным взаимодействием орбитальных электронов [7]:

$$\Delta E \propto \frac{p_1^2 \cdot p_2^2}{r^6}, \quad (4)$$

где p_1 и p_2 – дипольные моменты взаимодействующих электронов первой и второй молекул соответственно. Известно, что дипольный момент определяется как произведение величины заряда на дипольный вектор l , следовательно, квадрат дипольного момента в (4) прямо пропорционален квадрату дипольного вектора:

$$\Delta E \propto \frac{l_1^2 \cdot l_2^2}{r^6}. \quad (5)$$

Поскольку l – это, фактически, характерная длина диполя, следовательно, l_1^2 и l_2^2 в (5) тождественны характерным площадям взаимодействующих атомов. Мысленно суммируя (5) по всем атомам, образующим плоский хромофор ароматической молекулы, получим пропорциональность между энергетикой ван-дер-ваальсовых взаимодействий и площадями S_1 , S_2 хромофоров взаимодействующих молекул в комплексе:

$$\Delta E \propto \frac{S_1 \cdot S_2}{r^6}. \quad (6)$$

Согласно выражениям (4) и (5), энергия атом-атомных ван-дер-ваальсовых взаимодействий убывает прямо пропорционально шестой степени расстояния. Даже не прибегая, к строгим выкладкам, нетрудно показать, что основной вклад дают только те части хромофоров молекул, которые находятся друг под другом, т.е. перекрываются в комплексе. На рисунке 1 эта ситуация поясняется схематично. Если молекулы сдвинуть друг относительно друга, то взаимодействие крайних колец друг с другом будет малозначимым из-за увеличения расстояния с r_1 до r_2 . В то же время, перекрывающиеся части хромофоров молекул на расстоянии r_1 будут взаимодействовать наиболее эффективно.

Из всего сказанного следует, что энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий ΔE , а, следовательно, энтальпия реакции комплексообразования ароматических молекул должна быть пропорциональна площади перекрытия хромофоров ΔA в составе гетерокомплекса:

$$\Delta H = k \Delta A, \quad (7)$$

где k – некоторый коэффициент пропорциональности.

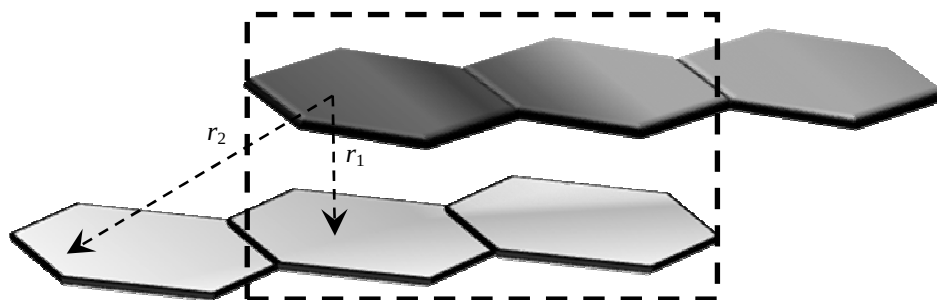


Рисунок 1 – Схематическое изображение гетерокомплекса

Таким образом, выражение (7) на эмпирическом уровне устанавливает взаимосвязь между энтальпийным и структурным фактором при ассоциации ароматических молекул и является ключевым в настоящей работе.

Необходимо отметить, что аналогичная выражению (7) корреляция ΔH и ΔA была ранее установлена для простых углеводородов [8], однако в качестве ΔA рассматривался совершенно иной параметр – $\Delta SASA$. В таблице 1 представлены результаты расчета $\Delta SASA$ для гетерокомплексов Лиганд-FMN, выполненного с помощью программы GETAREA [9]. Коэффициент корреляции $\Delta SASA$ и экспериментальной энтальпии гетероассоциации ΔH_{het} (см. Таблица 1) составил менее 0.3, что свидетельствует о неприменимости метода оценки энтальпии, предложенного в работе [8], для класса ароматических соединений.

Подтверждение гипотезы о корреляции ΔH и ΔA при гетероассоциации витамина и ароматических БАС.

Расчет площади перекрытия ΔA_{het} в гетерокомплексах Лиганд-FMN проводился в программе GEUP 3 [www.f1cd.ru/soft/base/geup/geup_321] на основании структур 1:1 комплексов, опубликованных в работе [10]. В качестве примера на рисунке 2 приведена исходная структура комплекса FMN-AMD и рабочее окно GEUP, в котором можно рассчитать площадь перекрытия хромофоров (заштрихованная область). На основании известной длины химической связи C-C определяется масштаб рисунка и оценивается значение площади перекрытия в $\text{\AA}^2$.

Таблица 1 – Расчетные значения структурных и энергетических параметров при само- и гетероассоциации ароматических БАС с FMN

Молекула	ΔA_{self} , $\text{\AA}^2$	α	ΔA_{het} , $\text{\AA}^2$	$\Delta SASA$, $\text{\AA}^2$	$ \Delta H_{het} $, кДж/моль		$ \Delta H_{self} $, кДж/моль
					расчет	эксп. [10]	эксп. [10]
AMD	9,47	1,98	10,62	485,66	28	34±6	32 ± 6
CAF	5,13	1,84	6,32	287,77	19	24±3	21 ± 1
DAU	9,37	2,02	12,32	374,70	34	36±5	34 ± 6
EB	11,22	1,91	14,84	325,39	31	33±2	23 ± 3
NOR	6,82	1,62	9,02	379,83	21	26±2	18 ± 4
NOV	13,62	1,51	16,25	309,46	27	55±6	31 ± 3
PF	11,94	1,78	13,78	285,74	36	41±3	38 ± 4
FMN	14,63	1,46	—	—	—	—	31 ± 5

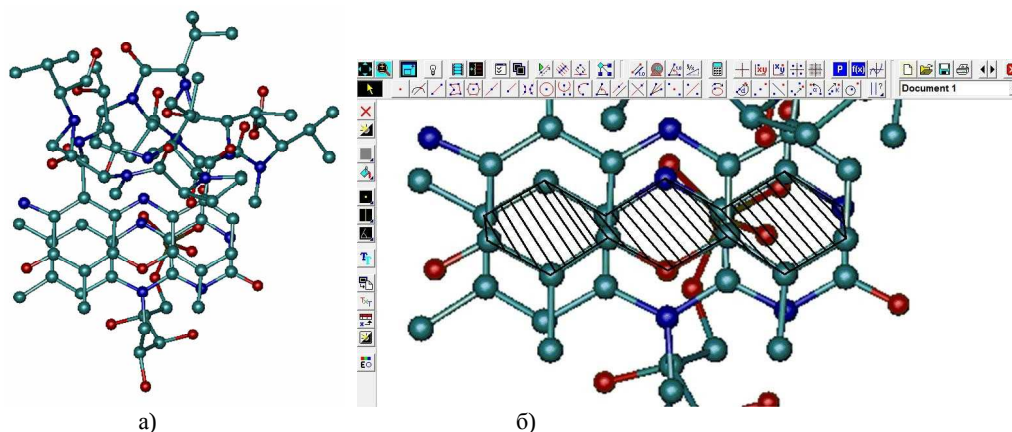


Рисунок 2 – Структура гетерокомплекса FMN-AMD: а) пространственная структура гетерокомплекса FMN-AMD; б) фрагмент структуры гетерокомплекса FMN-AMD в рабочем окне программы GEUP

В таблице 1 представлены результаты расчета параметра ΔA_{het} для различных систем Лиганд-FMN. Коэффициент корреляции ΔA_{het} с экспериментальной энтальпией гетероассоциации ΔH_{het} составил 0,71 (см. также рисунок 3), что свидетельствует о существенной взаимосвязи этих параметров и является подтверждением гипотезы о корреляции структурного и энтальпийного факторов, высказанной в предыдущем подразделе и сформулированной в форме выражения (7). Важно также подчеркнуть, что связь (7) основывается на допущении о том, что ван-дер-ваальсовы силы доминируют в энтальпии ассоциации ароматических молекул. Однако есть и другие источники энтальпийного характера, не подчиняющиеся уравнению (7): это, прежде всего, межмолекулярные водородные связи и энтальпия гидратации комплекса, которые в совокупности могут приводить к ухудшению корреляции (7).

Оценка значения энтальпии гетероассоциации на основании известной структуры гетерокомплекса.

На основании подтвержденной выше состоятельности выражения (7) для класса ароматических соединений, представляется возможным создать методику оценки энтальпии гетероассоциации ароматических соединений, используя лишь структурный параметр ΔA_{het} .

Основной сложностью применения выражения (7) является выбор коэффициента k . Для процессов гетероассоциации ароматических соединений X и Y неизвестный коэффициент может быть исключен из рассмотрения, используя независимые экспериментальные данные по структуре и термодинамике самоассоциации молекул X и Y . Поскольку k фактически отражает вклад в энтальпию со стороны обеих молекул в комплексе, то для комплекса ароматических соединений выражение (7) целесообразно трансформировать в (8а) для димера однотипных молекул (самоассоциата) и в (8б) для 1:1 гетерокомплекса молекул X и Y :

$$\Delta H_{\text{self}} = \alpha^2 \cdot \Delta A_{\text{self}} \quad (\text{а}), \quad \Delta H_{\text{het}} = \alpha_X \alpha_Y \Delta A_{\text{het}} \quad (\text{б}), \quad (8)$$

где α – коэффициент, характеризующий энергетический вклад от данной молекулы.

Тогда, на основании известных из эксперимента значений ΔH_{self} (см. работу [10]) и структур димеров ΔA_{self} рассчитывается коэффициент α для всех типов исследуемых молекул $\alpha = \sqrt{\frac{\Delta H_{\text{self}}}{\Delta A_{\text{self}}}}$ (см.

таблицу 1). Далее с использованием выражения (8б) и известных параметров α и ΔA_{het} рассчитывается теоретическое значение энтальпии гетероассоциации (см. таблицу 1).

Учитывая в среднем 15 %-ную погрешность измерения энтальпии само- и гетероассоциации ароматических молекул, можно утверждать, что для всех гетерокомплексов Лиганд-FMN, представленных в Таблице 1, совпадение расчетной и экспериментальной энтальпий является удовлетворительным за исключением системы NOV-FMN. В работе [10] было показано, что гетерокомплексы FMN-NOV/EB/PF дополнительно стабилизированы межмолекулярными водородными связями (по одной на комплексы EB/PF и две – на комплекс NOV), дающими вклад около 8 кДж/моль в энтальпию реакции гетероассоциации, и которые не могут учитываться в (7). «Поднимая» расчетные энтальпии для комплексов EB, PF, NOV в среднем на 8 кДж/моль/связь (рисунок 4), получаем значение коэффициента достоверности совпадения расчетной и экспериментальной энтальпий на уровне $R^2 = 0,69$. Поскольку даже после корректировки, расчетная энтальпия NOV-FMN все еще сильно отстает от идеальной кривой (см. рисунок 4), в расчет фактора R^2 данная система включена не была.

Заключение

Проведенный в настоящей работе анализ позволил выявить существование корреляции энергетического (энтальпия) и структурного (площадь перекрытия хромофоров) факторов при ассоциации ароматических молекул. Существование подобной корреляции позволило разработать методику априорной оценки энтальпии гетероассоциации комбинаций ароматических молекул на основании известных параметров их самоассоциации и структуры гетерокомплекса. Данный результат

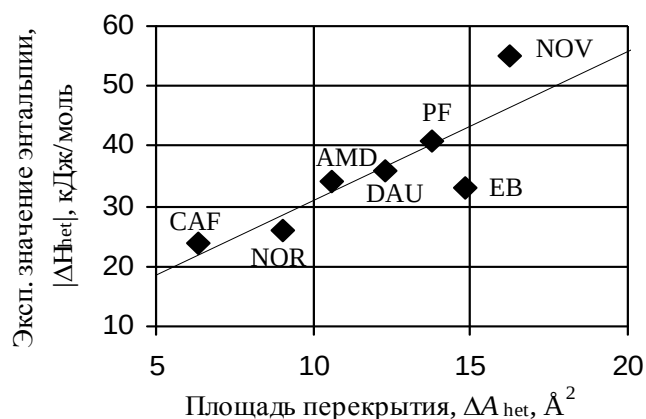


Рисунок 3 – Корреляция структурного и энтальпийного факторов

может быть использован для последующего термодинамического анализа реакций гетероассоциации ароматических молекул.

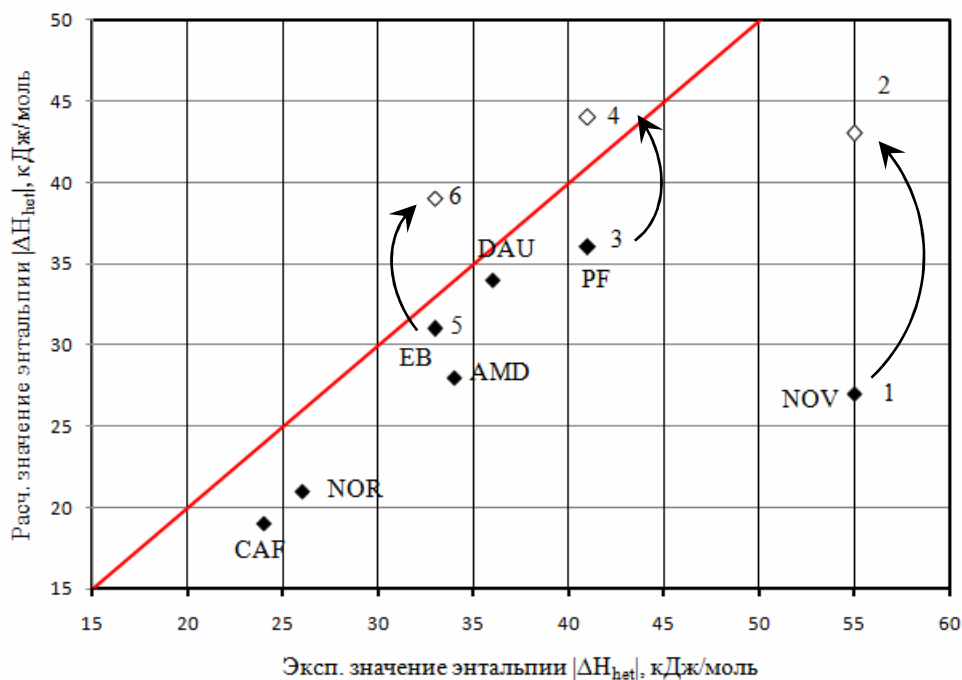


Рисунок 4 – Корреляция между расчетными и экспериментальными значениями энтальпии гетероассоциации. Линия, проведенная по диагонали, соответствует идеальному совпадению теории и эксперимента

Бібліографічний список

1. Chu E. Physicians' cancer chemotherapy drug manual / E. Chu, V.T. De Vita. — L.: Jones and Bartlett Publ., 2003. — 512 p.
2. Quantitation of the molecular mechanisms of biological synergism in a mixture of DNA-acting aromatic drugs / M.P. Evstigneev, V.P. Evstigneev, A.O. Lantushenko, Yu.V. Mykhina, D.B. Davies // Biophys. Chem. — 2008. — V. 132. — P. 148–158.
3. Solvent-Induced Effects: Self-Association of Positively Charged π Systems / E. Buisine, K. Villiers, J. Timothy, C. Egan Biot // J. Am. Chem. Soc. — 2006. — V. 128. — P. 12122–12128.
4. Janin J. Ångströms and calories / J. Janin // Structure. — 1997. — V. 5. — P. 473–479.
5. Exner O. Entropy–enthalpy compensation and anticompensation: solvation and ligand binding / O. Exner // Chem. Commun. — 2000. — P. 1655–1656.
6. Richard A. A Free Energy Analysis of Nucleic Acid Base Stacking in Aqueous Solution / A. Richard, Friedman, B. Honig // Biophys. J. — 1995. — V. 69. — P. 1528–1535.
7. Волькенштейн М.В. Молекулярная биофизика / М.В. Волькенштейн. — М.: Наука, 1975. — 616 с.
8. Accessible surface areas as a measure of the thermodynamic parameters of hydration of peptides / T. Ooi, M. Oobatake, G. Nmmethyt, H. Scheragatt // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1987. — V. 84. — P. 3086–3090.
9. Fraczkiwicz R. Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules / R. Fraczkiwicz, W. Braun // J. Comp. Chem. — 1998. — V. 19. — N 3. — P. 319–333.
10. Мухина Ю.В. Нековалентные взаимодействия флавин-моноклеотида с биологически активными ароматическими веществами и ДНК: дис. канд. физ.-мат. наук: 03.00.02: защищена 13.10.06: утв. 10.02.07 / Мухина Юлия Викторовна. — СевНТУ, 2006. — 164 с. — 0406U004027.

Поступила в редакцию 02.03.2009 г.