

УДК 577.113:541.49

Д.Д. Андреюк, студентка,

М.П. Евстигнеев, доцент, д-р физ.-мат. наук

Севастопольский национальный технический университет

Студгородок, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: max_evstigneev@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАЦИИ ТЕОФИЛЛИНА МЕТОДОМ ^1H ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

В данной работе методом ^1H ЯМР спектроскопии изучена самоассоциация теофиллина в водно-солевом растворе. Получены структурные и термодинамические параметры самоассоциации, сделаны выводы о вкладе различных физических факторов в стабилизацию агрегатов молекул теофиллина в растворе.

Введение. Теофиллин (ТНР) является природным метаболитом кофеина (CAF), попадающего в организм человека с напитками и продуктами питания в сравнительно больших количествах [1]. Химические структуры CAF и ТНР отличаются незначительно – у кофеина в положении 7 пуринового цикла содержится метильная группа, отсутствующая у теофиллина (рисунок 1), – вместе с тем, данный фактор приводит к заметным различиям физико-химических и медико-биологических свойств этих двух соединений. Теофиллин проявляет выраженную апоптотическую активность на лейкемических клеточных линиях и широко используется как профилактическое средство аллергических заболеваний и астмы, в то время как кофеин находит применение в качестве стимулятора психической нервной деятельности [2]. При этом кофеин лучше растворим в водной среде и имеет более низкую температуру плавления [3]. Считается, что удаление метильной группы в положении N7 у кофеина (рисунок 1) создает дополнительный сайт для водородного связывания и тем самым обеспечивает условия для интенсивного межмолекулярного взаимодействия молекул ТНР в кристаллическом состоянии через карбонил-6 и азот-7; последнее позволяет объяснить некоторые физические свойства теофиллина и кофеина [4]. Отсутствие метильной группы у ТНР также связывают с существенно различным сродством молекул ТНР и CAF к РНК [5], что рассматривается в качестве ключевого фактора, определяющего различия медико-биологических свойств этих метилксантинов [6].

Ранее было показано, что ксантиновые производные проявляют тенденцию к самоассоциации в водном растворе в форме стопок молекул, стабилизированных стэкингом ароматических хромофоров, при этом равновесная константа самоассоциации оказывается существенно зависимой от количества метильных групп в структуре молекул [7]. Это дает основание предположить, что структурное различие молекул ТНР и CAF также может проявляться в их самоассоциации в водном растворе. В работе [4] методом ^1H ЯМР спектроскопии было получено численное значение равновесной константы самоассоциации ТНР, однако информация о термодинамических и структурных параметрах агрегации теофиллина в литературе отсутствует.

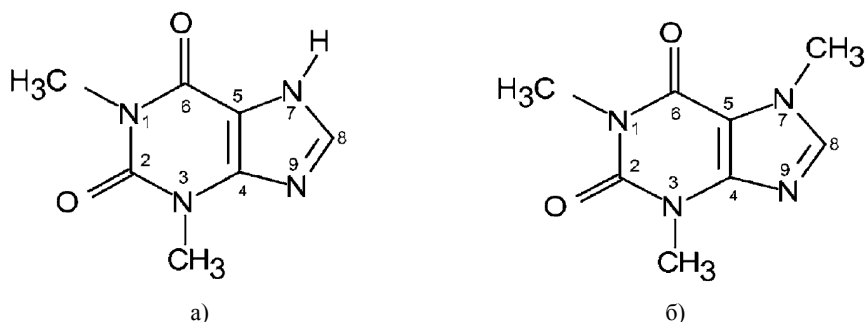


Рисунок 1 – Структурные формулы молекул: а – теофиллина, б – кофеина

Методика эксперимента. Теофиллин ("Sigma") использовали без дополнительной очистки, лиофилизировали из D_2O с изотопной чистотой 99.95 % D ("Sigma") и растворяли в дейтерированном 0.1 М фосфатном буфере (pD 7.1, 0.1M Na^+), содержащем 10^{-4} моль/л ЭДТА.

1М- и 2М- ^1H -ЯМР спектры измерены на спектрометре "Bruker DRX" с резонансной частотой 500 МГц. Остаточный сигнал HOD насыщался в период детектирования. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов выполнены при температуре $T=298\text{K}$ в интервале концентраций от 16.6 до 1.0 ммоль/л (рисунок 2,а); температурные зависимости химических сдвигов ТНР измерены в диапазоне температур от 278 К до 348 К (рисунок 2,б). Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5 сульфокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид

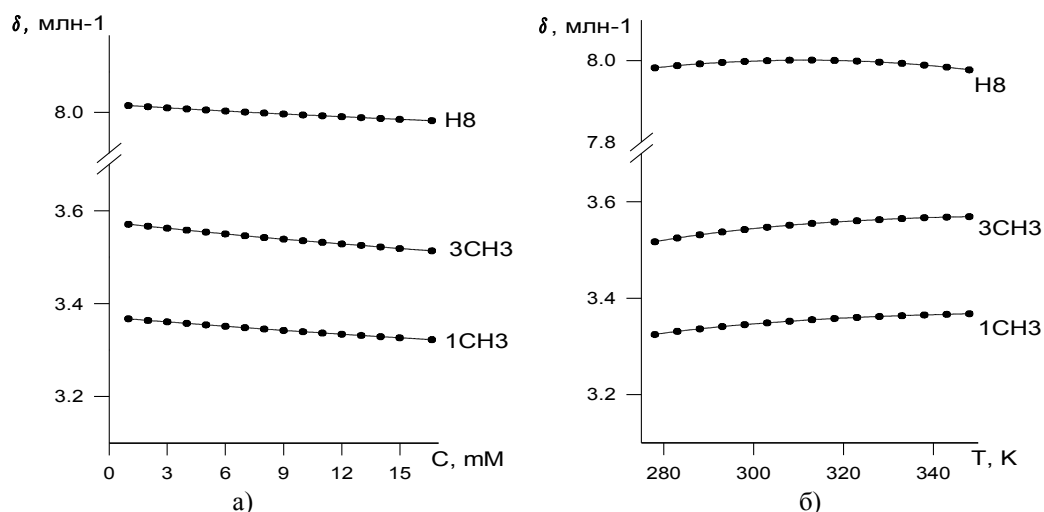


Рисунок 2 – Экспериментальные зависимости химических сдвигов протонов ТНР:
 а – экспериментальные концентрационные зависимости при $T = 298$ K,
 б – экспериментальные температурные зависимости при $C = 8.003$ mM

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. Методика приготовления образцов и проведения экспериментов достаточно подробно описана в [8]. Стабилизацию температуры в процессе измерений осуществляли терморегулятором BVT-3000.

Результаты и обсуждение. Из анализа зависимостей, представленных на рисунке 2, следует, что при увеличении концентрации ТНР или уменьшении температуры наблюдается смещение резонансов протонов ТНР в область более сильного поля, как это обычно имеет место при образовании стопочных ассоциатов ароматических молекул в растворе [8,9]. Для интерпретации экспериментальных данных, как и ранее [6], использовали модель бесконечномерной некооперативной самоассоциации молекул, в которой константы равновесия K_j для реакций



предполагаются одинаковыми при всех значениях j : $K_1 = K_2 = \dots = K_j = K$. В такой модели зависимость химического сдвига δ от концентрации x_0 имеет вид [9]:

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

где δ_d – протонный химический сдвиг для молекулы антибиотика в димере, δ_m – протонный химический сдвиг в мономере, т.е. при бесконечном разбавлении. Параметры δ_m , δ_d и K модели (2) находились из условия минимизации квадратичной функции невязки (отклонение значений протонных химических сдвигов, рассчитанных по модели (2), от этих же значений, полученных экспериментально (рисунок 2,а)). Результаты расчетов параметров для необменивающихся протонов антибиотика приведены в таблице 1.

Экспериментальные концентрационные зависимости (рисунок 2,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 [9]. Такая модель приводит к следующей зависимости химического сдвига δ от концентрации:

$$(\delta - \delta_m) / (\delta_d - \delta_m) = 2 \left\{ 1 - x_1 / x_0 - \sigma K x_1^2 / [x_0(1 - Kx_1)] \right\}, \quad (3)$$

где x_1 – концентрация мономеров ТНР в растворе. Кооперативная модель содержит четыре неизвестных параметра – δ_m , δ_d , σ и K , подлежащих определению по экспериментальным концентрационным зависимостям химического сдвига. Значение параметра кооперативности представлено в таблице 1.

Определение термодинамических параметров самоассоциации ТНР проводили, как и в работе [9], на основе экспериментальных температурных зависимостей химических сдвигов протонов теофиллина (рисунок 2,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 ТНР представлены в таблице 1. Здесь же для сравнения приведены параметры самоассоциации САФ, полученные в аналогичных экспериментальных условиях.

Таблица 1 – Равновесные параметры самоассоциации Теофиллина (ТНР) и Кофеина (САФ, [8]) в 0.1 М Na-фосфатном буфере, рD 7.1, $T=298\text{K}$

Параметр		H8	3CH3	1CH3
ТНР	δ_m , млн ⁻¹	8,02	3,58	3,37
	δ_d , млн ⁻¹	7,81	3,28	3,12
	$\Delta\delta$, млн ⁻¹	0,21	0,30	0,25
	σ	$0,38 \pm 0,05$		
	K , л/моль	$7,4 \pm 0,4$		
	ΔH , кДж/моль	$-(25,9 \pm 0,8)$		
	ΔS , Дж/моль·К	$-(70 \pm 3)$		
САФ	δ_m , млн ⁻¹	7,89	3,54	3,35
	δ_d , млн ⁻¹	7,83	3,33	3,16
	$\Delta\delta$, млн ⁻¹	0,06	0,21	0,19
	σ	$1,08 \pm 0,02$		
	K , л/моль	$11,8 \pm 0,3$		
	ΔH , кДж/моль	$-(21,0 \pm 0,4)$		
	ΔS , Дж/моль·К	$-(50 \pm 1)$		

Из таблицы 1 следует, что предельное значение химического сдвига δ_m в мономерах ТНР несколько выше, чем в мономерах кофеина. По-видимому, это обусловлено повышенной электронной плотностью на метильных группах: удаление 7CH₃ группы из структуры кофеина снижает интенсивность ароматического тока по периферии ксантинового хромофора и, как следствие, приводит к уменьшению его экранирующего действия на близлежащие протоны. Ранее, отмеченная особенность метильных групп усиливать экранирующее действие ароматического тока также отмечалась в работе [7] при исследовании агрегации различных производных пурина и пиримидина.

Эффект удаленной метильной группы проявляется и в величине индуцированного химического сдвига в димере ТНР ($\Delta\delta = \delta_m - \delta_d$, таблица 1), заметно превышающего это же значение у САФ по всем протонам. Как указывалось в работе [7], дополнительная метильная группа в структуре молекулы пурина или пиримидина может создавать стерические препятствия для образования «компактного» агрегата молекул с максимальным перекрытием хромофоров и в связи с этим приводит к неэффективному экранированию протонов.

Уменьшение стерических препятствий при образовании агрегата молекул ТНР наиболее ярко проявляется в низком по отношению к САФ значении параметра кооперативности σ (таблица 1), отражающего энергетическую выгодность образования агрегатов высокого порядка ($j > 2$) по сравнению с димерами [9]. Полученное значение σ близко по величине к кооперативности агрегации акридиновых красителей [9], не содержащих массивных боковых привесков.

Сравнительный анализ термодинамических параметров самоассоциации САФ и ТНР свидетельствует о том, что тенденция к агрегации молекул ТНР ниже, чем молекул САФ (ср. значения константы K в таблице 1). Полученное значение равновесной константы ТНР хорошо согласуется с аналогичной константой из работы [4] и объясняется снижением гидрофобного вклада при самоассоциации за счет удаления группы 7CH₃ у молекулы ТНР. Независимое подтверждение пониженной гидрофобности агрегатов молекул ТНР по сравнению с агрегатами САФ также следует из существенно более низкого по абсолютной величине значения энтропии реакции самоассоциации САФ, свидетельствующего о дополнительном положительном гидрофобном вкладе в энергетику самоассоциации вследствие наличия в структуре САФ лишней метильной группы.

Интересно отметить, что энтальпия агрегации теофиллина почти на 5 кДж/моль выше по модулю, чем у кофеина. Увеличение энтальпии агрегации возможно как результат дополнительной стабилизации комплекса межмолекулярной водородной связью, что в случае ТНР маловероятно т.к. равновесная константа самоассоциации при этом уменьшается (таблица 1), или как следствие более «правильного» стэкинга хромофоров в агрегатах молекул, приводящего к значительному вкладу в стабилизацию комплекса от дисперсионных взаимодействий. Выше, на основании расчетных значений индуцированного химического сдвига (таблица 1) и результатов работы [7], было указано на то, что структура агрегата ТНР, по-видимому, более «компактная», чем у кофеина. Экспериментальный и

теоретический анализ [10] свидетельствует о том, что равномерное расположение метильных групп по

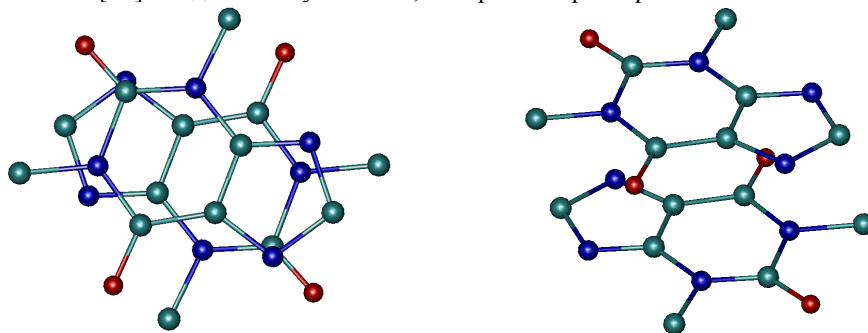


Рисунок 3 – Пространственная структура димерного комплекса ТНР

периферии хромофора молекулы CAF (рисунок 1) приводит к наличию как минимум 9 возможных структур димерного комплекса, среди которых есть и димеры с взаимноортогональной ориентацией хромофоров. Такого типа димерные комплексы характеризуются наименьшим перекрытием хромофоров и, соответственно, наименьшим стэкингом, что снижает среднюю энтальпию реакции самоассоциации CAF. В то же время, исходя из стереохимических соображений, наиболее вероятная структура димерного комплекса ТНР должна быть антипараллельной с максимальным удалением метильных групп друг относительно друга. На рисунке 3 представлена наиболее вероятная пространственная структура димерного комплекса ТНР, рассчитанная методами молекулярного моделирования (программа X-PLOR), из которой следует довольно существенное перекрывание ароматических хромофоров, по-видимому, и определяющее повышенное значение энтальпии самоассоциации ТНР в сравнении с CAF.

Заключение. Анализ самоассоциации теofilлина, проведенный в настоящей работе, позволил получить равновесные параметры агрегации молекул и сделать выводы о вкладе различных физических факторов в стабилизацию комплексов молекул. Расчетные значения параметров самоассоциации в дальнейшем могут быть использованы при анализе гетероассоциации ТНР с различными биологически активными ароматическими соединениями.

Библиографический список

1. Assessment of Caffeine exposure: Caffeine content of beverages, Caffeine intake and plasma concentration of methylxanthines / A. Lelo, J.O. Miners, R. Robson and D. Birkett // Clin. Pharmacol. Ther. — 1986. — V. 39. — P. 54–59.
2. Goodman A.G. The pharmacological basis of therapeutics / A.G. Goodman., T.W. Rall, A.S. Nies. — N.Y.: Pub. Pergamon Press, 1990. — P. 618–637.
3. A thermodynamic study of the solubility of theophylline and its hydrate / J.G. Fokkens, J.G.M. van Amelsfoort, C.J. de Blaey, C.G. de Kruif et al. // Int. J. Pharm. — 1983. — V. 14. — P. 79–93.
4. Thakkar A.L. NMR evidence for self-association of theophylline in aqueous solution / A.L. Thakkar, L.G. Tensmeyer, W.L. Wilham // J. Pharm. Sci. — 1971. — V. 60. — P. 1267–1269.
5. Johnson I.M. RNA binding efficacy of theophylline, theobromine and caffeine / I.M. Johnson, S.G. Bhuvan Kumar, R. Malathi // J. Biomol. Str. Dyn. — 2003. — V. 20. — P. 687–692.
6. Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA / G.R. Zimmermann, R.D. Jenison, C.L. Wick, J.-P. Simorre et al. // Nat. Struct. Biol. — 1997. — V. 4. — P. 644–649.
7. Aradi F. Effect of methylation on the association ability of purine and pyrimidine in aqueous solutions. A ^1H NMR chemical shift study / F. Aradi, A. Foldesi // Magn. Res. Chem. — 1989. — V. 27. — P. 592–598.
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. 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.
10. Molecular modelling and NMR studies of the caffeine dimer / M. Falk, W. Chew, J.A. Walter, W. Kwiatkowski et al. // Can. J. Chem. — 1998. — V. 76. — P. 48–56.

Поступила в редакцию 12.01.2007 г.