

УДК 577.113:541.49

К.А. Рыбакова, аспирантка

Севастопольский национальный технический университет

Студгородок, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: Kri88@yandex.ru

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ПРОТИВОМИКРОБНОГО ПРЕПАРАТА НОРФЛОКСАЦИНА И АНТИОПУХОЛЕВОГО АНТИБИОТИКА АКТИНОМИЦИНА D В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

Методом ^1H -ЯМР спектроскопии (500 МГц) исследована гетероассоциация антиопухолевого антибиотика актиномицина D (AMD) с противомикробным хинолоновым препаратом норфлоксацином (NOR). Определены структурные и термодинамические параметры взаимодействия молекул. Построена наиболее вероятная пространственная структура 1:1 гетерокомплекса AMD – NOR.

Введение. В настоящее время в клинической практике одним из наиболее распространенных способов повышения эффективности медико-биологического действия различных противоопухолевых препаратов является использование их в комбинации с другими биологически активными соединениями [1]. Такой подход во многих случаях позволяет значительно снизить неизбежное при химиотерапии токсическое воздействие вводимых лекарственных препаратов на организм человека, либо повысить эффективность противоопухолевого действия за счет биологического синергизма между компонентами комбинированной дозы. Для класса ароматических препаратов предполагается, что одним из возможных молекулярных механизмов изменения токсичности антибиотиков в комбинации является их непосредственное взаимодействие в клетке с образованием 1:1 гетерокомплексов [2]. Таким образом, исследования гетероассоциации ароматических молекул антибиотиков представляются важными как с чисто научной, так и с практической точки зрения.

В настоящей работе методом 1М и 2М ^1H ЯМР-спектроскопии (500 МГц) исследована гетероассоциация антиопухолевого антибиотика актиномицина D и антибактериального хинолонового препарата норфлоксацина с целью выяснения природы физических взаимодействий при комплексообразовании ароматических антибиотиков в водном растворе как предполагаемый механизм изменения биологической активности ароматических препаратов, поступающих в организм в комбинации.

Актиномицин D (AMD) (рисунок 1,а) является одним из первых ароматических антиопухолевых препаратов, введенных в клиническую практику. AMD эффективен при лечении определенных видов раковых заболеваний, в частности, актиномицин D – один из важных компонентов, используемых при комбинированной химиотерапии сарком мягких тканей, лимфом и меланом [1]. По структуре антибиотик представляет собой два пентапептидных лактонных кольца, прикрепленных к плоскому полициклическому феноксазоновому хромофору (рисунок 1,а). Считается, что антиопухолевая активность AMD обусловлена интеркаляцией ароматического феноксазонавого хромофора между азотистыми основаниями ДНК [1].

Ароматический антибиотик норфлоксацин (NOR) (рисунок 1,б) является одним из наиболее эффективных современных антибактериальных препаратов, используемых в клинической практике,

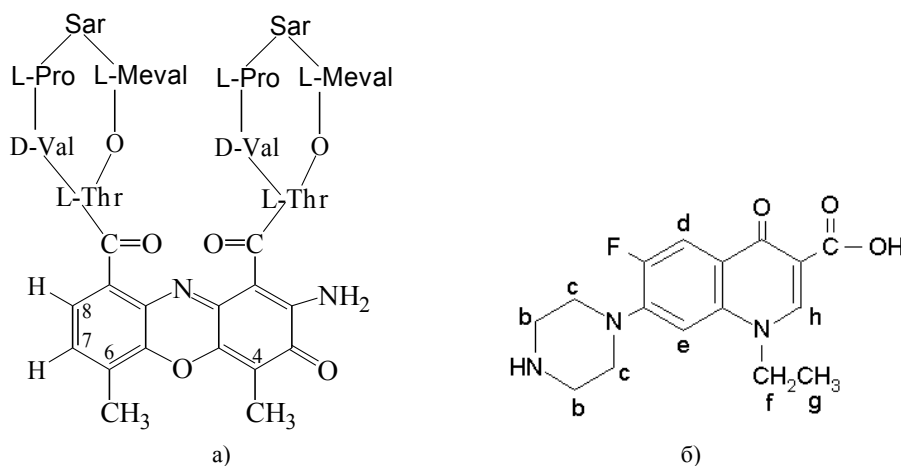


Рисунок 1 – Структурные формулы молекул актиномицина D (а) и норфлоксацина (б)

характеризуемый оптимальной фармакокинетикой, высокой биодоступностью, хорошей переносимостью и высокой активностью по отношению к возбудителям, резистентным к другим противомикробным средствам. 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].

Ранее было показано, что хинолоновые препараты способны проявлять ярко выраженный синергизм действия при использовании совместно с другими ароматическими препаратами и в частности с антрациклиновыми антибиотиками [4]. При этом фторхинолоны демонстрируют существенную цитотоксичность, зависящую от времени и дозы экспозиции, что является весомым основанием для использования хинолонов в комбинированной противораковой химиотерапии. Возможной причиной изменения биологической активности препаратов в дозе может являться процесс гетероассоциации ароматических молекул антибиотиков [2]. Учитывая, что NOR и AMD содержат плоский ароматический хромофор (см. рисунок 1), можно предположить, что эти антибиотики способны формировать гетерокомплексы в растворе.

Для анализа процессов гетероассоциации норфлоксацина с актиномицином D использована методика эксперимента, аналогичная примененной ранее [5] для изучения ассоциации ароматических веществ, основанная на анализе экспериментальных концентрационных и температурных зависимостей протонных химических сдвигов молекул. Данная методика позволяет определить структурные и термодинамические характеристики гетероассоциации молекул. Двумерные спектры гомоядерной корреляционной ^1H ЯМР спектроскопии (2M-TOCSY и 2M-ROESY) использованы для полного отнесения сигналов необменивающихся протонов NOR и AMD и для качественного анализа взаимного расположения исследуемых молекул в ассоциатах. Самоассоциация AMD и NOR была исследована ранее методом 1M- и 2M- ^1H ЯМР-спектроскопии в аналогичных экспериментальных условиях [6, 7].

Методика эксперимента. Антиопухолевый антибиотик актиномицин D и норфлоксацин (рисунок 1) фирмы “Sigma” растворяли в D_2O с изотопной чистотой 99.95% (“Sigma”) и лиофилизовали. Растворы готовили путем добавления взвешенного количества образца в дейтерированный 0.1 M фосфатный буфер (pD 7.1), содержащий 10^{-4} моль/л EDTA. 1M- и 2M- ^1H ЯМР спектры измерены на спектрометре “Bruker DRX” с резонансной частотой 500 МГц. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул выполнены при температуре 298 K в интервале концентраций AMD от 0 до 0.821 mM в смешанном растворе AMD-NOR, где концентрация NOR поддерживалась постоянной ($C_{\text{NOR}} = 0.402$ mM). Температурные зависимости химических сдвигов протонов молекул в смешанном растворе измерены в диапазоне температур от 278 K до 314 K. Ограничение рабочего интервала температур сверху обусловлено резким ухудшением растворимости AMD при повышенных температурах. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2 диметил-2-силапентан-5-сульфокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония (TMA). Методика приготовления образцов и проведения экспериментов описана ранее [5].

Результаты и обсуждение. В двумерных спектрах (2M-NOESY- и 2M-ROESY) смешанных растворов AMD-NOR не наблюдались межмолекулярные кросс-пики даже при максимальных

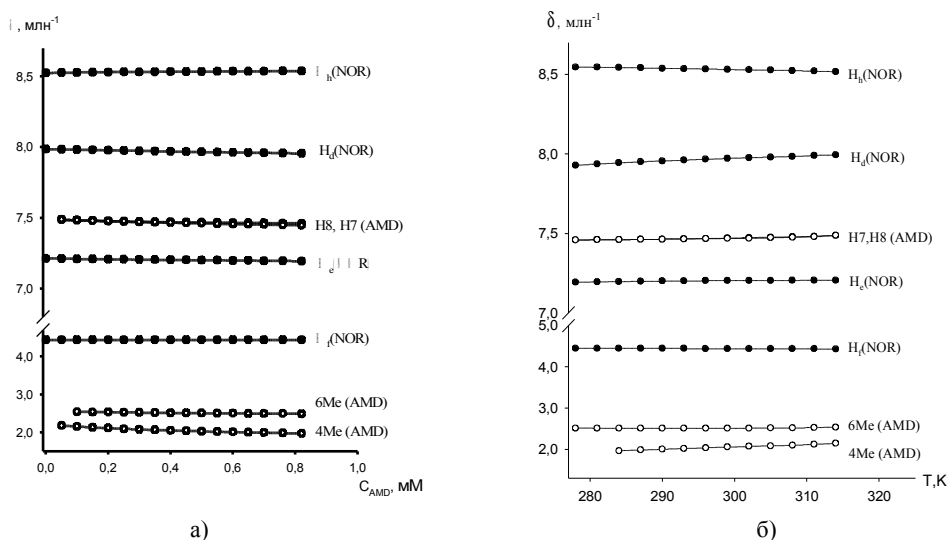


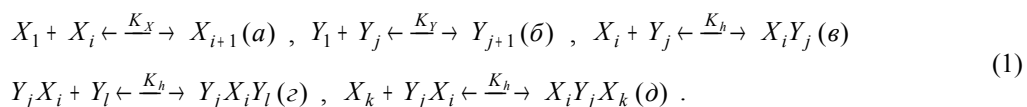
Рисунок 2 – а) – экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов протонов NOR (—●—) и AMD (—○—) в смешанном растворе NOR-AMD при $T = 298$ K, $C_{\text{NOR}} = y_0 = 0.402$ mM; б) – экспериментальные температурные зависимости химических сдвигов протонов NOR (—●—) и AMD (—○—) в смешанном растворе при $C_{\text{AMD}} = x_0 = 0.4$ mM, $C_{\text{NOR}} = y_0 = 0.402$ mM

исследованных концентрациях молекул. Пренебрежимо малая интенсивность межмолекулярных кросс-пиков может быть связана со сравнительно низкими концентрациями препаратов, использованными в эксперименте (< 1 мМ), что обусловлено ограниченной растворимостью антибиотиков.

Структурные и термодинамические параметры гетероассоциатов AMD и NOR, как и для рассмотренных ранее молекулярных систем [5], определяли путём анализа зависимостей химических сдвигов необменивающихся протонов обоих ароматических соединений в смешанных растворах от концентрации (рисунок 2,а) и температуры (рисунок 2,б).

Равновесная константа самоассоциации молекул AMD на порядок превышает константу самоассоциации для NOR ($K_{\text{NOR}} = 136$ л/моль [6], $K_{\text{AMD}} = 1420$ л/моль [7] при $T = 298\text{K}$), поэтому изменение концентрации AMD оказывает существенно большее влияние на распределение агрегатов, чем вариация концентрации NOR в процессе измерений концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов изучаемых ароматических молекул. Поэтому, как и в ранее проведенных экспериментах [5] по исследованию гетероассоциации биологически активных ароматических молекул, в системе AMD-NOR поддерживалась постоянная концентрация NOR ($y_0 = 0.402$ мМ) при изменении процентного содержания AMD в растворе (рисунок 2,а).

При анализе экспериментальных данных использована следующая схема взаимодействия ароматических молекул в растворе [5]:



Константы равновесия для реакций самоассоциации NOR (K_Y), AMD (K_X) и гетероассоциации молекул (K_h) в статистико-термодинамической модели полагаются не зависящими от числа молекул в агрегатах и комплексах [5]. Вместе с тем седиментационные исследования водных растворов антибиотика актиномицина D [7] свидетельствуют о том, что агрегаты AMD, большие, чем димеры, практически не образуются в растворе даже при концентрациях, близких к насыщению. По-видимому, образование в растворе ассоциатов более высокого порядка для антибиотика AMD с массивными пептидными лактонами затруднено по стерическим причинам. Учитывая указанные особенности взаимодействия молекул актиномицина D, при интерпретации экспериментальных данных использовали димерную модель для самоассоциации молекул AMD и их гетероассоциации с NOR, т.е. в схеме (1) $i, k = 1, 2$ при образовании гетерокомплексов (1,в, 1,г и 1,д). В схеме (1) X_1 и Y_1 соответствуют мономерам AMD и NOR, X_i, X_k, Y_j, Y_l – самоассоциатам, содержащим $i, k \leq 2$ молекул актиномицина D и j, l молекул норфлоксацина.

Учитывая законы действующих масс для реакций (1), закон сохранения массы может быть представлен в виде системы двух уравнений:

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

Здесь x_0, y_0 – исходные концентрации актиномицина D и норфлоксацина; x_1, y_1 – соответственно равновесные концентрации AMD и NOR в мономерной форме.

В такой модели зависимость наблюдаемого химического сдвига протонов AMD от концентрации молекул в смешанном растворе может быть записана в виде:

$$\delta_X = \frac{x_1}{x_0} \left[\delta_{mX} + 2\delta_{dX} K_X x_1 + \delta_{hX} \frac{K_h y_1 (1 + 2K_X x_1)}{1 - K_Y y_1} \left(1 + \frac{K_h y_1}{2(1 - K_Y y_1)} + K_h (x_1 + K_X x_1^2) \right) \right]$$

И для протонов NOR:

$$\delta_Y = \frac{y_1}{y_0} \left[\delta_{mY} \left(2(1 + K_Y y_1) - \frac{1}{(1 - K_Y y_1)^2} \right) + 2\delta_{dY} \left(\frac{1}{(1 - K_Y y_1)^2} - 1 - K_Y y_1 \right) + \delta_{hY} \frac{K_h (x_1 + K_X x_1^2)}{(1 - K_Y y_1)^2} \left(1 + \frac{K_h (x_1 + K_X x_1^2)}{2} + \frac{K_h y_1}{1 - K_Y y_1} \right) \right]. \quad (3)$$

Здесь величины $\delta_{mX}, \delta_{dX}, \delta_{hX}$ и $\delta_{mY}, \delta_{dY}, \delta_{hY}$ – протонные химические сдвиги AMD и NOR в мономерной, димерной формах и в гетероассоциатах соответственно. Значения протонных химических сдвигов $\delta_{mX}, \delta_{dX}, \delta_{mY}, \delta_{dY}$ и равновесных констант K_X, K_Y для взаимодействующих молекул определены

ранее из независимых экспериментов, при исследовании самоассоциации молекул в идентичных экспериментальных условиях [6, 7]. Вычислительная процедура расчёта параметров подробно описана в [5]. Полученные в результате расчётов параметры гетероассоциации AMD с NOR при температуре 298 К представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры гетероассоциации актиномицина D (X) и норфлоксацина (Y) в 0.1 М фосфатном буфере, рD 7.1 при $T=298\text{ К}$

Протоны X (AMD)	δ_{mX} , млн ⁻¹	δ_{hX} , млн ⁻¹	Протоны Y (NOR)	δ_{mY} , млн ⁻¹	δ_{hY} , млн ⁻¹	K_h , М ⁻¹	$-\Delta G^\circ_h$, кДж/моль	$-\Delta H^\circ_h$, кДж/моль	$-\Delta S^\circ_h$, Дж/(моль·К)
H8	7.51	7.47	Hh	8.53	8.56	980±80	17.1 ± 1.4	35 ± 4	60 ± 7
H7	7.51	7.45	Hd	8.01	7.88				
6CH ₃	2.60	2.41	He	7.24	7.16				
4CH ₃	2.28	2.17	Hf	4.45	4.45				

Прежде всего следует отметить достаточно высокую величину константы гетероассоциации NOR и AMD (таблица 1), хотя она и принимает промежуточное значение между равновесными константами самоассоциации норфлоксацина и актиномицина D, как и для большинства других молекулярных систем, исследованных ранее [5]. Превышение константы гетероассоциации над константами самоассоциации наблюдалось ранее только для систем, в которых имела место дополнительная стабилизация гетерокомплексов за счет образования межмолекулярных водородных связей [5]. Вместе с тем оценка вклада реакций гетероассоциации в суммарное динамическое равновесие молекул NOR и AMD, проведенное согласно критерию

$$f_C = \frac{K_h}{K_X + K_Y + K_h},$$

предложенному в работе [8], показывает, что полученное значение $f_C = 40\%$ попадает в диапазон, характерный для реакций гетероассоциации с дополнительной стабилизацией гетерокомплексов межмолекулярной водородной связью. Таким образом, в комплексе NOR-AMD существует определенная вероятность образования межмолекулярной H-связи.

Значения равновесных констант реакций самоассоциации AMD [7] и NOR [6] и их гетероассоциации (таблица 1), определенные в настоящей работе, были использованы для расчета относительного содержания различных типов комплексов в водном растворе в использованном в эксперименте диапазоне концентраций актиномицина D и фиксированной концентрации норфлоксацина 1 мМ.

Из рисунка 3 видно, что с увеличением концентрации AMD в растворе растет относительное содержание гетерокомплексов (X_iY_j), ($X_iY_jX_k$) и ($Y_iX_jY_k$) антибиотиков. При отношении концентраций исследуемых молекул $C_{AMD}:C_{NOR}=3:2$ роль гетерокомплексов становится преобладающей в смешанном

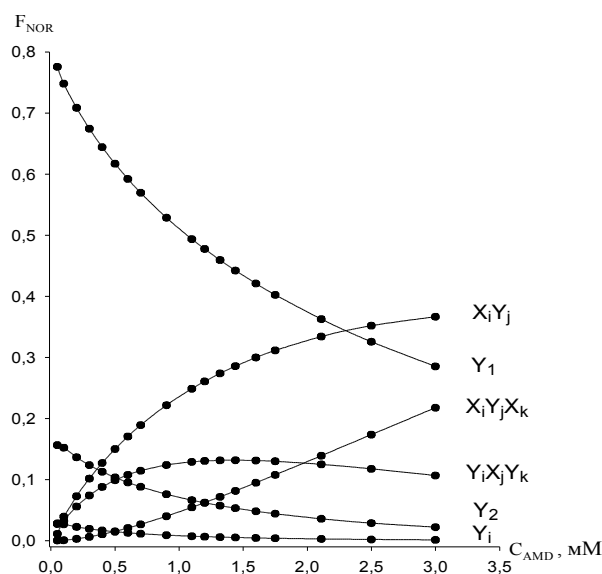


Рисунок 3 – Относительное содержание (F_{NOR}) гетерокомплексов норфлоксацина в зависимости от концентрации AMD в смешанном растворе, $y_0 = 1\text{ мМ} = \text{const}$

растворе. Можно предположить, что эффективная гетероассоциация может приводить к некоторому изменению эффективности медико-биологического действия актиномицина D и норфлоксацина при совместном использовании, что необходимо учитывать при разработке соответствующего режима терапии.

Структура 1:1 гетероассоциата актиномицина D и норфлоксацина в водном растворе. Полученные значения химических сдвигов δ_h для протонов NOR и AMD (таблица 1) были использованы для расчета наиболее вероятной структуры 1:1 комплекса актиномицина D с норфлоксацином в водном растворе. Стартовая структура для последующей минимизации потенциальной энергии определялась на основе расчетных значений индуцированных протонных химических сдвигов ($\Delta\delta_h = \delta_m - \delta_h$) молекул антибиотиков (таблица 2), полученных из таблицы 1.

Таблица 2 – Расчетное экранирование протонов антибиотиков AMD и NOR в составе 1:1 гетерокомплекса

AMD		NOR			
H8	H7	Hh	Hd	He	Hf
0.04	0.06	-0.03	0.13	0.08	-0.002

Из таблицы следует, что в комплексе NOR-AMD протоны H7 и H8 AMD а также Hd и He NOR экранированы незначительно, а протоны Hf и Hh слабо деэкранированы, что однозначно свидетельствует о расположении бензоидного кольца норфлоксацина вблизи центрального кольца AMD, а второе кольцо NOR, содержащее протоны Hf и Hh, выходит за область хромофора актиномицина D (рисунок 4).

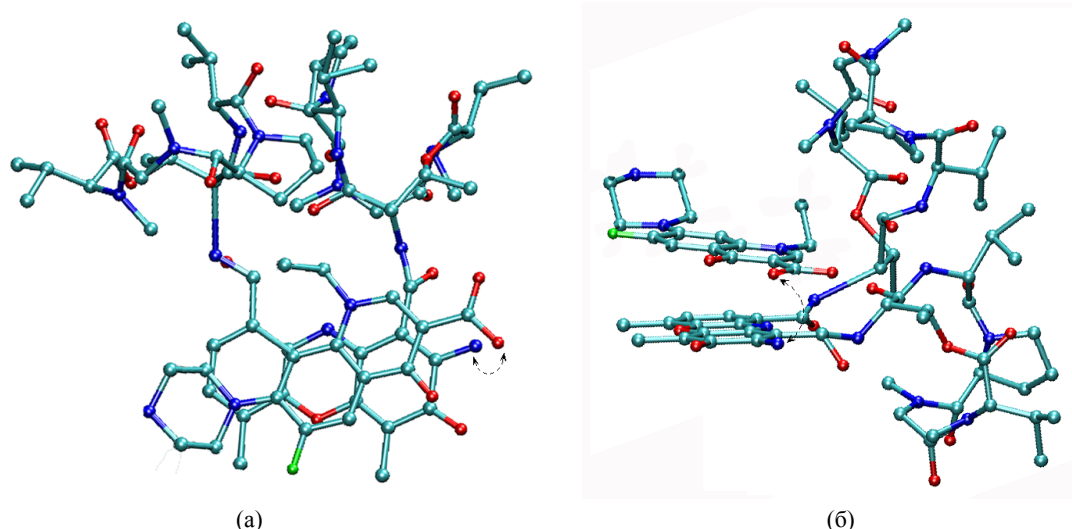


Рисунок 4 – Расчетная структура 1:1 гетерокомплекса норфлоксацина и актиномицина D:
а) – вид сверху, перпендикулярно плоскостям хромофоров антибиотика;
б) – вид на комплекс сбоку; межмолекулярная водородная связь показана пунктиром

Расчет пространственной структуры 1:1 AMD-NOR гетерокомплекса выполнен в соответствии с [6] 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 норфлоксацина и актиномицина D и параметризация их валентных взаимодействий получены с помощью программы XPLO2D с использованием кристаллических структур из PDB банка данных. Параметры невалентных взаимодействий между атомами соответствовали силовому полю MM3.

На рисунке 4 представлена найденная в результате расчётов наиболее вероятная пространственная структура 1:1 гетерокомплекса AMD с NOR в водном растворе. В расчетной структуре гетерокомплекса плоскости ароматических хромофоров молекул AMD и NOR параллельны и расположены на расстоянии приблизительно 0.34 нм друг от друга. В таком комплексе имеет место перекрывание ароматических колец взаимодействующих молекул (стэкинг-взаимодействие), что предполагает существенный вклад дисперсионных взаимодействий при образовании гетероассоциата. Кроме того, расчетная структура 1:1 AMD-NOR комплекса свидетельствует о возможности образования водородной связи между атомом О карбоксильной группы норфлоксацина и NH₂-группой хромофора AMD (см. рисунок 4). Расчетная структура 1:1 комплекса AMD-NOR отвечает как индуцированным протонным химическим сдвигам для этой молекулярной системы (см. таблицу 2), так и минимуму ее потенциальной энергии, определенной методом молекулярного моделирования.

Термодинамика гетероассоциации молекул актиномицина D и норфлоксацина в водном растворе. Термодинамические параметры ΔH_h и ΔS_h реакций гетероассоциации AMD и NOR были определены на основе экспериментальных температурных зависимостей протонных химических сдвигов молекул с использованием аддитивной модели для описания наблюдаемого протонного химического сдвига и формализма Вант-Гоффа [9].

При вычислении термодинамических параметров использовали соотношения (2) и (3), в которых влияние температуры на значение $\delta(T)$ определяется температурной зависимостью равновесных констант само- и гетероассоциации молекул, согласно соотношению:

$$K(T) = \exp(\Delta S/R - \Delta H/RT),$$

в предположении, что величины ΔS и ΔH не зависят существенным образом от температуры в исследованном диапазоне температур [5]. В результате были получены усредненные по всем исследуемым необменивающимся протонам значения энтальпии ΔH_h , энтропии ΔS_h и свободной энергии Гиббса ΔG_h реакций гетероассоциации молекул AMD и NOR в водном растворе (см. таблицу 1).

Довольно большие отрицательные значения энтальпии и энтропии реакции гетероассоциации ароматических молекул AMD и NOR позволяют заключить, что дисперсионные взаимодействия играют существенную роль при образовании гетерокомплексов этих молекул. Формирование водородной связи в гетерокомплексе AMD и NOR также приводит к отрицательным значениям ΔH и ΔS . Энтальпия образования водородной связи в водном растворе по различным оценкам находится в пределах от -8 до -13 кДж/моль [10]. По-видимому, наблюдаемое превышение ΔH_h и ΔS_h соответствующих термодинамических параметров самоассоциации NOR [6] и AMD [7] является следствием именно образования межмолекулярной H-связи. Таким образом, проведенный термодинамический анализ подтверждает сделанное выше предположение о характере сил, стабилизирующих гетерокомплекс AMD-NOR в водном растворе.

В заключение можно сделать вывод, что ароматические молекулы хинолоновых антибиотиков, в частности норфлоксацин, могут образовывать энергетически прочные гетероассоциаты с ароматическими антиопухолевыми антибиотиками в водном растворе и тем самым оказывать влияние на эффективность их медико-биологического действия.

Библиографический список

1. Chu E. Physicians' cancer chemotherapy drug manual / E. Chu, V.T. DeVita. — L.: Jones and Bartlett Publ., 2003. — 512 p.
2. Hetero-association of anticancer antibiotics in aqueous solution: NMR and molecular mechanics analysis / D.B. Davies, M.P. Evstigneev, D.A. Veselkov, A.N. Veselkov // Biophys. Chem. — 2005. — V. 117. — P. 111–118.
3. Shen L.L. Molecular mechanism of DNA gyrase inhibition by quinolone antibacterials / L.L. Shen // Adv. Pharmacol. — 1994. — V. 29A. — P. 285–304.
4. Reversal of multidrug resistance-associated protein-mediated drug resistance in cultured human neuroblastoma cells by the quinolone antibiotic difloxacin / M.D. Norris, J. Madafiglio, J. Gilbert, G.M. Marshall, M. Haber // Medical and Pediatric Oncology. — 2001. — V. 36. — P. 177–180.
5. ^1H NMR investigation of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution: factors involved in the stabilization of complexes of daunomycin and acridine drugs. / D.B. Davies, D.A. Veselkov, V.V. Kodintsev, M.P. Evstigneev, A.N. Veselkov // Mol. Phys. — 2000. — V. 98. — № 23. — P. 1961–1972.
6. Рыбакова К.А. Исследование самоассоциации хинолонового антибиотика норфлоксацина в водном растворе методом ^1H ЯМР спектроскопии / К.А. Рыбакова, А.А. Мосунов, М.П. Евстигнеев // Вестник СевГТУ. Сер. Физика и математика. — Севастополь, 2005. — Вып. 70. — С. 87–95.
7. Davies D.B. ^1H NMR investigation of the 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. — P. 383–390.
8. Evstigneev M.P. Stochastic models (cooperative and non-cooperative) for NMR analysis of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution / M.P. Evstigneev, D.B. Davies, A.N. Veselkov // Chem. Phys. — 2006. — V. 321. — P. 25–33.
9. 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.
10. Record M.T. Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nuclear acids: the roles of ion association or release, screening and ion effects / M.T. Record, C.F. Anderson, T.M. Lohman // Quart. Rev. Biophys. — 1978. — V. 11. — P. 103–178.

Поступила в редакцию 8.11.2006 г.