

УДК 577.113

В.В. Хомич, ассистент

Севастопольский национальный технический университет.

Студгородок, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: biofiz@rambler.ru

СОВМЕСТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ АНТИБИОТИКА ДАУНОМИЦИНА И КОФЕИНА С ДНК В РАСТВОРЕ

Представлены результаты исследования связывания антрациклинового антибиотика дауномицина с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TrGrCrA)₂ в присутствии кофеина в водном растворе. Предложена модель для анализа конкурентного связывания; сформулирован критерий, позволяющий разделить процессы гетероассоциации кофеина с дауномицином и комплексообразования кофеина с ДНК.

Введение. Антиопухолевый антибиотик дауномицин (DAU), (рисунок 1,а), принадлежит к группе антрациклиновых антибиотиков, которые являются базовыми компонентами химиотерапии многих типов злокачественных опухолей [1]. Использование антибиотиков антрациклиновой серии в клинических условиях всегда сопровождается нежелательными побочными эффектами, наиболее опасным из которых является дозозависимая кардиотоксичность, что ограничивает их применение в терапии раковых заболеваний [2].

В настоящее время известно, что токсичность дауномицина снижается в присутствии кофеина (CAF, рисунок 1,б) [3]. Было сделано предположение, что изменение токсичности антибиотика может быть связано со способностью кофеина образовывать комплексы с DAU, а также конкурировать с ним за места связывания на ДНК [4, 5]. Следовательно, для понимания механизма изменения биологической активности антрациклинового антибиотика в присутствии кофеина представляет интерес количественный анализ каждого из процессов: гетероассоциации ароматических веществ и конкуренции кофеина и антрациклинового препарата за места посадки на ДНК.

Для исследования процесса совместного связывания антрациклинового антибиотика и кофеина с ДНК необходимо знать их равновесные параметры само-, гетероассоциации и комплексообразования с ДНК. Подобные исследования могут быть проведены независимо в одинаковых условиях растворителя, а полученные равновесные константы могут быть использованы для расчета относительного вклада процессов гетероассоциации и комплексообразования. В работе [6] было показано, что адекватной моделью ДНК для исследований подобного рода является олигомерная тетрануклеотидная последовательность 5'-d(TrGrCrA)₂ В связи с этим, в настоящей работе было проведено исследование совместного связывания антиопухолевого антибиотика дауномицина с дезоксиолигонуклеотидом 5'-d(TrGrCrA)₂ в присутствии кофеина в водном растворе. Равновесные параметры самоассоциации, гетероассоциации и комплексообразования антиопухолевого антибиотика с d(TGCA)₂ были определены ранее в одинаковых условиях растворителя [6 и ссылки в ней]. Предложена модель анализа совместного связывания; сформулирован критерий, позволяющий разделить процессы гетероассоциации кофеина с DAU и комплексообразования CAF с ДНК.

Методика эксперимента. Антибиотик дауномицин ("Fluka"), кофеин ("Sigma") и дезокситетрануклеотид 5'-d(TrGrCrA)₂ ("Metabion") использовали без дополнительной очистки, лиофилизировали из D₂O с изотопной чистотой 99.95 % D ("Sigma") и растворяли в дейтерированном 0.1 M Na-фосфатном буфере (pD 7.1), содержащем 10⁻⁴ моль/л ЭДТА.

¹H- и ²M- ¹H-ЯМР спектры измерены на спектрометре "Bruker DRX" с резонансной частотой 500 МГц. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов выполнены при температуре T=298 K в интервале концентраций кофеина от 8.2 до 0 мМ/л, при фиксированной концентрации C_{DAU}=0.57 мМ и C_{TGCA}=0.82 мМ. Измерения

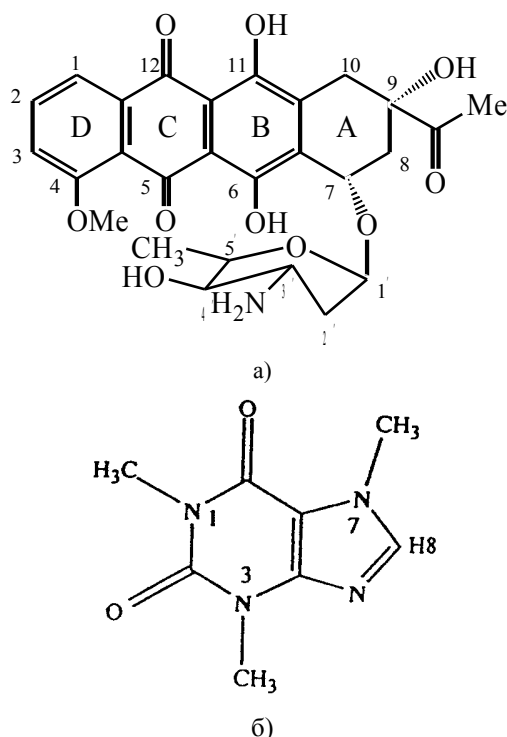


Рисунок 1 – Структурная формула:
а) дауномицина; б) кофеина

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.

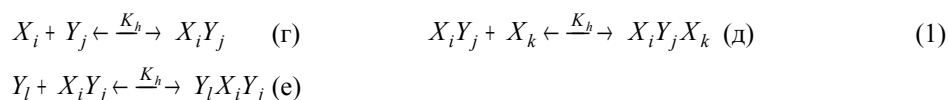
Общая схема анализа трехкомпонентного равновесия антибиотик-кофеин-ДНК.

Схема для описания взаимодействий в трехкомпонентной системе, содержащей антрациклиновый антибиотик, кофеин и тетрамер, должна учитывать все возможные взаимодействия между молекулами в растворе: самоассоциацию антибиотика (X), CAF (Y), и d(TGCA); гетероассоциацию антибиотик-кофеин и комплексообразование молекул антрациклинового антибиотика, а также кофеина с d(TGCA)₂. Общая схема комплексообразования с ДНК должна включать в себя взаимодействие с одонитчатой (N) и дуплексной (N₂) формой тетрамера в растворе [7].

Самоассоциация:



Гетероассоциация:



Комплексообразование с ДНК:



где K_{1X} , K_{1Y} и K_{2X} , K_{2Y} – константы комплексообразования антибиотика и CAF, соответственно, с одонитчатой и дуплексной формой d(TGCA).

Каждая реакция в схеме (1) вносит свой собственный вклад в закон сохранения масс (2), и наблюдаемый протонный химический сдвиг (3), определяемый в условиях быстрого обмена для всех молекулярных компонент в растворе:

$$\begin{cases} \frac{x_1}{(1 - K_X x_1)^2} \left(1 + \frac{K_h y_1}{1 - K_Y y_1} + \frac{K_h^2 y_1^2}{2(1 - K_Y y_1)^2} \right) + x_1 N (K_{1X} + K_{2X} K_N N) = x_0 \\ \frac{y_1}{(1 - K_Y y_1)^2} \left(1 + \frac{K_h x_1}{1 - K_X x_1} + \frac{K_h^2 x_1 y_1}{(1 - K_Y y_1)(1 - K_X x_1)} \right) + y_1 N (K_{1Y} + K_{2Y} K_N N) = y_0 \\ 2K_N N^2 (1 + K_{2X} x_1 + K_{2Y} y_1) + N(1 + K_{1X} x_1 + K_{1Y} y_1) = N_0 \end{cases} \quad (2)$$

$$\begin{cases} \delta_X = \frac{x_1}{x_0} \left[\delta_{mX} \left(2(1 + K_X x_1) - \frac{1}{(1 - K_X x_1)^2} \right) + 2\delta_{dX} \left(\frac{1}{(1 - K_X x_1)^2} - 1 - K_X x_1 \right) + \delta_{hX} \frac{K_h y_1}{(1 - K_X x_1)^2 (1 - K_Y y_1)} \times \right. \\ \left. \times \left(1 + \frac{K_h y_1}{2(1 - K_Y y_1)} \right) + N(\delta_{1X} K_{1X} + \delta_{2X} K_{2X} K_N N) \right] \\ \delta_Y = \frac{y_1}{y_0} \left[\delta_{mY} \left(2(1 + K_Y y_1) - \frac{1}{(1 - K_Y y_1)^2} \right) + 2\delta_{dY} \left(\frac{1}{(1 - K_Y y_1)^2} - 1 - K_Y y_1 \right) + \delta_{hY} \frac{K_h x_1}{(1 - K_Y y_1)^2 (1 - K_X x_1)} \times \right. \\ \left. \times \left(1 + \frac{K_h y_1}{1 - K_Y y_1} \right) + N(\delta_{1Y} K_{1Y} + \delta_{2Y} K_{2Y} K_N N) \right] \end{cases} \quad (3)$$

где δ_1 и δ_2 – протонные химические сдвиги антибиотика и кофеина в комплексе с одонитчатой и дуплексной ДНК соответственно.

Члены, ответственные за самоассоциацию в уравнениях (2), (3) соответствуют бесконечномерной некооперативной самоассоциации обоих веществ; члены, определяющие гетероассоциацию, взяты из обобщенной модели гетероассоциации молекул [8], а члены, ответственные за комплексообразование с ДНК – из [5, 7].

Каждый вид взаимодействия в модели (2)-(3) (самоассоциация, гетероассоциация, комплексообразование с ДНК) был исследован ранее в отдельных ЯМР экспериментах, в аналогичных условиях растворителя и с использованием одинаковых вычислительных методик при анализе данных.

Отсюда следует, что все типы взаимодействий в трехкомпонентной системе антибиотик-кофеин-ДНК должны оставаться такими же, как если бы опыт был проведен отдельно в однокомпонентной или двухкомпонентной системе. Другими словами, параметры ассоциации/комплексобразования, полученные из одно-/двухкомпонентных систем, предположительно можно использовать для анализа трехкомпонентных систем. Однако это утверждение требует проверки.

Для проверки предложенной модели трехкомпонентного равновесия была экспериментально получена зависимость химических сдвигов протонов DAU и CAF (при варьировании концентрации CAF) в трехкомпонентной системе, содержащей антибиотик, кофеин и $d(TGCA)_2$ (рисунок 2).

Полученные данные могут быть полностью описаны с использованием выражений (2)-(3). Все необходимые параметры (константы и химические сдвиги реакций в одно- и двухкомпонентной системах), необходимые для выполнения расчетной процедуры, приведены в таблице 1 и в ссылках к ней. Анализ показывает, что для ароматических протонов как DAU, так и CAF, среднее отклонение от каждой экспериментальной точки не превышает значения 0.01 млн^{-1} , что говорит о хорошем совпадении результатов. Это означает, что модель динамического равновесия в водном растворе для трехкомпонентных систем, основанная на уравнениях (2)-(3) с использованием параметров, полученных из одно- и двухкомпонентных систем, может быть использована для количественного описания сложного динамического равновесия антибиотик-кофеин-ДНК.

Таблица 1 – Равновесные константы самоассоциации (K), гетероассоциации с CAF (K_h) и комплексобразования с $d(TGCA)_2$ (K_2) в буферизованном растворе при $T=298 \text{ K}$, $pD=7,1$

Соединение	K , л/моль	K_h , л/моль	K_2 , 10^3 л/моль
DAU	720 ± 130 [9]	72 ± 4 [4]	560 ± 13 [7]
CAF	11.8 ± 0.3 [5]	—	0.246 ± 0.018 [5]

Модель совместного связывания кофеина с антрациклиновым антибиотиком и ДНК.

Модель трехкомпонентной равновесной смеси (схема (1)) содержит все типы взаимодействий в растворе, включая также комплексобразование DAU/CAF с одонитчатой формой тетрамера. В работе [6] было показано, что адекватное моделирование совместного связывания двух лигандов с ДНК должно проводится только по отношению к дуплексной форме тетрамера в растворе. Таким образом, для анализа совместного связывания антиопухолевого антибиотика и CAF с дезокситетрануклеотидом должна использоваться обобщенная схема (1) с исключенной одонитчатой формой ДНК (N) в растворе (реакции (1 в, ж, и)). Таким образом, упрощенные уравнения закона сохранения массы (2) примут вид:

$$\begin{cases} \frac{x_1}{(1 - K_X x_1)^2} \left(1 + \frac{K_h y_1}{1 - K_Y y_1} + \frac{K_h^2 y_1^2}{2(1 - K_Y y_1)^2} \right) + K_{2X} x_1 N_2 = x_0 \\ \frac{y_1}{(1 - K_Y y_1)^2} \left(1 + \frac{K_h x_1}{1 - K_X x_1} + \frac{K_h^2 y_1 x_1}{(1 - K_Y y_1)(1 - K_X x_1)} \right) + K_{2Y} y_1 N_2 = y_0, \\ N_2(1 + K_{2X} x_1 + K_{2Y} y_1) = N_0 \end{cases} \quad (5)$$

где N_2 – концентрация дуплекса тетрамера в свободной форме.

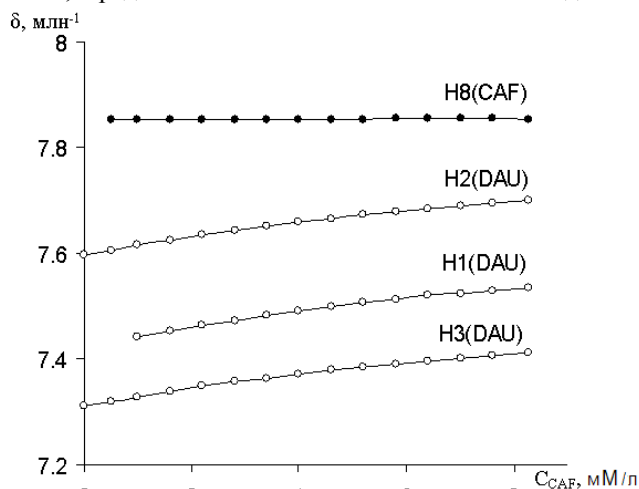


Рисунок 2 – Экспериментальные зависимости ^1H ЯМР химических сдвигов некоторых протонов дауномицина и кофеина в смешанном растворе с $d(TGCA)_2$ при изменении концентрации кофеина ($C_{\text{DAU}} = 0.57 \text{ mM}$, $C_{\text{TGCA}} = 0.82 \text{ mM}$, в 0.1 M Na-фосфатном буфере, $pD 7.1$, $T = 298 \text{ K}$)

Формулировка критерия для разделения процессов гетероассоциации и комплексообразования с ДНК.

Существует два основных молекулярных процесса, влияющих на уменьшение связывания ароматического соединения X с ДНК в присутствии другого ароматического соединения Y: гетероассоциация X – Y и комплексообразование Y с ДНК [5]. Гетероассоциация уменьшает количество мономеров X в растворе, способных связываться с ДНК – этот процесс называется "интерцепторным" действием Y по отношению к X. Комплексообразование Y с ДНК частично вытесняет молекулы X, связанные с ДНК, уменьшая тем самым долю комплексов X–ДНК – этот процесс называется "протекторным" действием Y по отношению к ДНК. В любом случае доля комплексов X – ДНК снижается в присутствии Y и, следовательно, изменяется биологическая активность вещества X.

Для оценки влияния процессов гетероассоциации (интерцепторное действие CAF) и комплексообразования с ДНК (протекторное действие CAF) на способность исследуемых ароматических соединений образовывать комплексы с ДНК в присутствии кофеина, был произведен расчет относительного снижения доли комплексов лиганд X-d(TGCA)₂ в двух случаях: при "отключенной" гетероассоциации и "включенном" комплексообразовании CAF с d(TGCA)₂ ($K_h=0, K_{2Y}\neq 0$) – $f_{C2(C)}^X$, и при "включенной" гетероассоциации и "отключенном" комплексообразовании CAF с d(TGCA)₂ ($K_h\neq 0, K_{2Y}=0$) – $f_{C2(H)}^X$:

$$R_d = \frac{f_{C2(0)}^X - f_{C2(C)}^X}{f_{C2(0)}^X - f_{C2(H)}^X}, \quad (6)$$

где $f_{C2(0)}^X$ – мольная доля комплексов лиганд-d(TGCA)₂ при "отключенных" гетероассоциации и комплексообразовании.

Область $R_d > 1$ соответствует преобладанию процесса комплексообразования CAF-ДНК над процессом гетероассоциации DAU-CAF (протекторное действие CAF), а в области $R_d < 1$ главный вклад в уменьшение доли комплексов DAU-ДНК вносит процесс гетероассоциации (интерцепторное действие CAF).

Для оценки процента вытесненного из ДНК лиганда при добавлении CAF предлагается следующий критерий:

$$A_d = \frac{f_{C2(0)}^X - f_{C2}^X}{f_{C2(0)}^X}, \quad (7)$$

где f_{C2}^X – мольная доля комплексов DAU-d(TGCA)₂ при "включенной" гетероассоциации и "включенном" комплексообразовании CAF с d(TGCA)₂ ($K_h\neq 0, K_{2Y}\neq 0$).

Учитывая, что DAU проявляет свое биологическое действие главным образом путем комплексообразования с ядерной ДНК, можно предположить, что фактор A_d соответствует проценту детоксикации клеточной системы, содержащей DAU, при добавлении кофеина.

Анализ полученных результатов.

Наиболее важным элементом анализа связывания антибиотика дауномицина с ДНК является правильный выбор концентраций взаимодействующих веществ в растворе для получения физиологически адекватных результатов. Пусть концентрация кофеина y_0 является переменной величиной, варьируемой в широком диапазоне от физиологических ($< 10^{-4}$ мМ) до экспериментальных ($> 10^{-4}$ мМ) значений. Тогда остается оговорить концентрацию антибиотика x_0 и ДНК N_0 .

На рисунках 3, 4 приведены графики R_d , A_d как функции y_0 при различных значениях x_0 и N_0 , различающихся на несколько порядков. Величина R_d практически слабо зависит от x_0 как при высоком значении $N_0 = 1$ мМ, так и низком значении $N_0 = 0,01$ мМ. Тот же самый вывод в принципе может быть сделан и по отношению к A_d при условии ограничения концентрации антибиотика на уровне $x_0 \leq 0,01$ мМ. Необходимо отметить, что пиковые концентрации антрациклинов в плазме крови человека имеют порядок нескольких микромолей [2], поэтому диапазон $x_0 \leq 0,01$ мМ может считаться хорошей оценкой физиологической концентрации дауномицина.

Зависимость R_d от N_0 (рисунок 4) не является существенной, в то время как масштаб по оси ординат на графиках A_d (рисунок 3) изменяется почти на два порядка при изменении N_0 от 0,01 мМ до 1 мМ. В этом нет ничего удивительного, так как значение N_0 определяет степень насыщения ДНК антибиотиком и, следовательно, эффективность его вытеснения добавленным кофеином. Вместе с тем необходимо отметить, что проводимые *in vitro* эксперименты как правило приводят к 20-60% изменению токсичности антибиотика при добавлении CAF в миллимолярных концентрациях [3], то есть имеет тот же порядок, что и величина A_d при $N_0 = 0,01$ мМ. Учитывая что A_d соответствует детоксификации

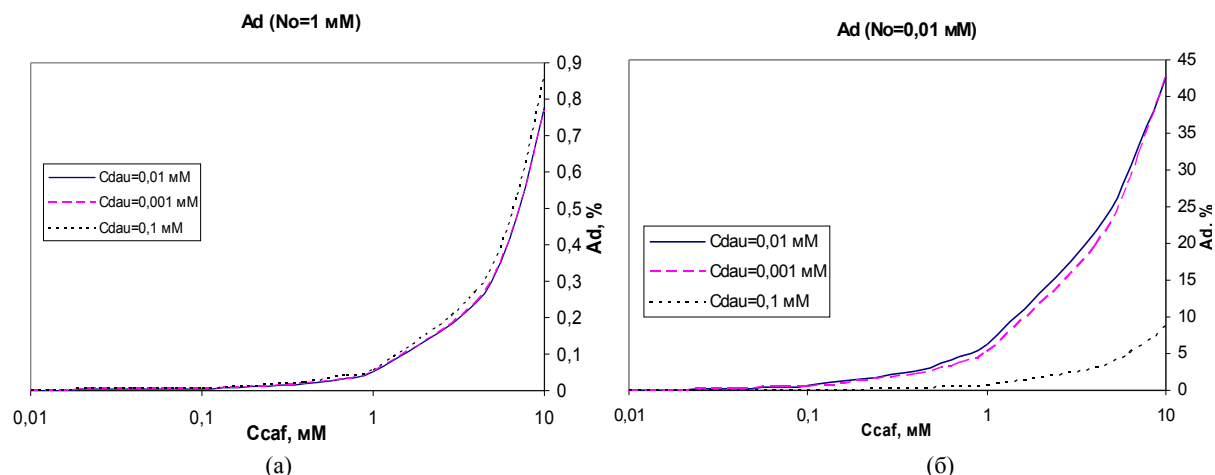


Рисунок 3 – Процент вытесненного лиганда из d(TGCA)₂ (A_d), как функция концентрации CAF при различных концентрациях DAU и различных концентрациях ДНК ($N_0 = 1$ mM (а) и 0,01 mM (б))

клеточной системы в присутствии CAF, можно считать, что порядок величины $N_0 \sim 0,01$ mM является хорошей оценкой концентрации свободных тетрамерных участков на ядерной ДНК.

Таким образом, проведенный выше анализ дает порядок значений физиологического диапазона концентраций компонент в системе DAU-CAF-ДНК $x_0 \sim 0,01$ mM, $N_0 \sim 0,01$ mM, $y_0 \sim 1$ mM. При указанных концентрациях $R_d \sim 3,2$ (рисунок 4, б), следовательно, протекторный эффект при добавлении кофеина в клеточную систему, содержащую DAU, является доминирующим. Вместе с тем интерцепторное действие все еще составляет около трети суммарного эффекта вытеснения антибиотика из ДНК, следовательно, гетероассоциация является важным фактором, требующим обязательного учета при анализе совместного связывания антрациклиновых антибиотиков и кофеина с ДНК.

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. — P. 1–7.
3. Traganos F. Caffeine modulates the effects of DNA-intercalating drug in vitro: A flow cytometric and spectrophotometric analysis of caffeine interaction with novantrone, doxorubicin, ellipticine and doxorubicin analogue AD198 / F. Traganos, J. Kapuscinski, Z. Darzynkiewicz // Cancer Res. — 1991. — V. 51. — P. 3682–3689.
4. Spectroscopic and molecular modeling studies of caffeine complexes with DNA intercalators / R.W. Larsen, R. Jasuja, R.K. Hetzler, P.T. Muraoka et al. // Biophys. J. — 1996. — V. 70. — P. 443–452.
5. 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.
6. Davies D.B. Binding of anthracycline antibiotic with DNA in the presence of aromatic vitamin / D.B. Davies, M.P. Evstigneev, Yu.V. Mukhina // Biophys. Chem. — 2005. — V. 50. — P. 153–163.

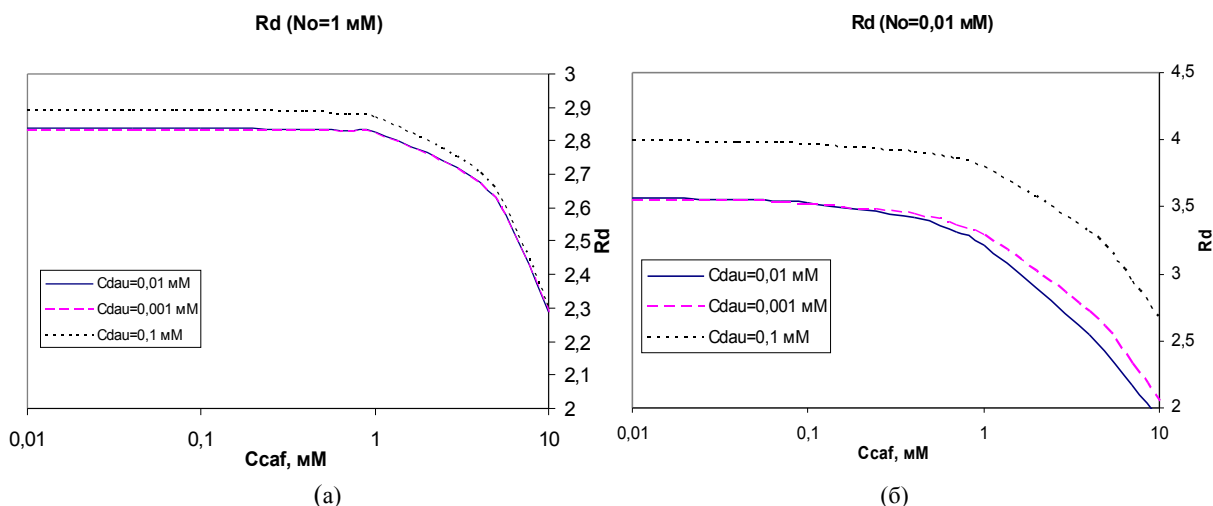


Рисунок 4 – Относительное уменьшение связывания DAU с d(TGCA)₂ (R_d), как функция концентрации CAF при различных концентрациях DAU и различных концентрациях ДНК ($N_0 = 1$ mM (а) и 0,01 mM (б))

7. Davies D.B. NMR investigation of the complexation of daunomycin with deoxytetranucleotides of different base sequence in aqueous solution / D.B. Davies, R.J. Eaton, S.F. Baranovsky // J. Biomol. Str. Dyn. — 2000. — V. 17. — P. 887–901.

8. Davies D.B. 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 et al. // Mol. Phys. — 2000. — V. 98. — № 23. — P. 1961–1971.

9. Исследование самоассоциации молекул антрациклиновых антибиотиков в водном растворе методом ¹H-ЯМР-спектроскопии / Р.Дж. Итон, Д.А. Веселков, С.Ф. Барановский и др.// Хим. физика. — 2000. — Т. 19. — С. 98–104.

Поступила в редакцию 17.05.2006 г.