

УДК 577.113:541.49

Д.А. Бешнова, студентка,

И.Т. Овсянников, ассистент

Севастопольский национальный технический университет

Студгородок, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: dasha_beshnova@mail.ru

КООПЕРАТИВНОСТЬ ГЕТЕРОАССОЦИИИ КАК ФАКТОР МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОЙ ВОДОРОДНОЙ СВЯЗИ

Сформулировано понятие параметра кооперативности для реакций гетероассоциации, разработан вычислительный алгоритм, учитывающий образование всех физически возможных типов комплексов в растворе. Предложенная модель может быть использована для более детального исследования характера гетероассоциации ароматических молекул в водном растворе методом ЯМР.

Введение. В настоящее время в клинической практике одним из наиболее распространенных способов повышения эффективности медико-биологического действия различных лекарственных препаратов является использование их в комбинации с другими биологически активными соединениями. Так, например, химиотерапевтический индекс антиопухолевых антибиотиков может быть улучшен при их совместном использовании с другими ароматическими соединениями, в частности, витаминами [1].

Существует мнение, что наблюдаемый биологический синергизм ароматических соединений может быть связан с их непосредственным взаимодействием в водной среде (гетероассоциация) [2]. Многочисленные исследования гетероассоциации ароматических молекул свидетельствуют о том, что стабилизация гетерокомплексов в растворе осуществляется в основном за счет дисперсионных сил, имеющих нековалентный характер взаимодействий. В работах [3,4] показано, что гетероассоциация типичного антиопухолевого антибиотика дауномицина и аналога ароматического витамина В₂ флавино-моноклеотида с различными биологически активными ароматическими соединениями может быть дополнительно усилена за счет образования межмолекулярной водородной связи в 1:1 гетерокомплексах. Однако водородное связывание в гетерокомплексах большей размерности маловероятно и в связи с этим должно быть существенно антикооперативно.

Ранее для анализа гетероассоциации ароматических молекул в водном растворе была предложена некооперативная стохастическая модель [5], учитывающая образование всех физически возможных типов комплексов в растворе. В настоящей работе для изучения эффектов водородного связывания в гетерокомплексах ароматических молекул некооперативная стохастическая модель была модифицирована путем введения параметров кооперативности на соответствующие реакции гетероассоциации. Для построенной модели был разработан вычислительный алгоритм, на основании которого определены параметры кооперативности гетероассоциации различных биологически активных соединений с антибиотиком дауномицином и производным витамина В₂ флавино-моноклеотидом.

Результаты и обсуждение.

Формулировка параметра кооперативности для гетероассоциации.

Ранее в реакциях самоассоциации кооперативность образования агрегатов ароматических молекул вводилась посредством параметра кооперативности σ , отражающего влияние агрегата молекул на величину равновесной константы самоассоциации K (рисунок 1).

Общепринято трактовать процесс самоассоциации с $\sigma < 1$ как кооперативный, сопровождающийся увеличением константы образования агрегатов более высокого порядка чем димер ($K_2 = \sigma K < K = K_3 = K_4 = \dots$). И, наоборот, агрегация с $\sigma > 1$ антикооперативна, так как при этом константа $K = K_3 = K_4 = \dots$ становится меньше димерной K_2 и в целом процесс образования агрегатов высокого порядка становится энергетически менее выгодным [6].

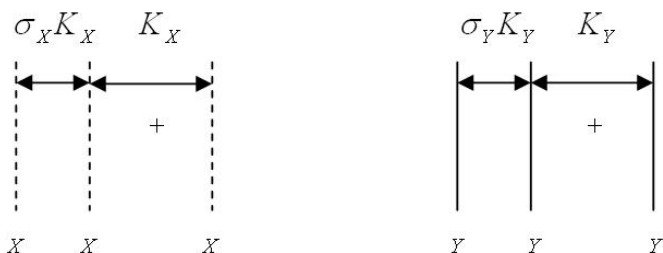


Рисунок 1 – Стандартное определение параметров кооперативности самоассоциации σ_X и σ_Y молекул X и Y

Аналогичный по смыслу параметр кооперативности σ_c можно ввести и на реакцию гетероассоциации (рисунок 2).



Рисунок 2 – Стандартная формулировка параметра кооперативности гетероассоциации

Однако, как видно из рисунка, с выделенным комплексом молекул может связываться как молекула X , так и Y , в зависимости от типа гетерокомплекса, при этом σ_c в общем случае будет разным. Отсюда следует, что константа гетероассоциации K_c теряет однозначный смысл равновесной константы образования гетеростыка молекул X и Y и в связи с этим становится физически менее определенной. То же самое относится и к константам самоассоциации K_X и K_Y , если на димер молекул X или Y , садится, соответственно, молекула Y или X . В связи с этим, на наш взгляд, более целесообразным является стандартное определение K_c как константы гетероассоциации двух изолированных молекул X и Y , и дальнейшее последовательное наращивание на таком гетеродимере молекул с параметром кооперативности σ_c . Аналогично должны быть определены константы K_X и K_Y при образовании изолированного гомостыка молекул.

С учетом вышесказанного, параметр кооперативности σ в реакциях гетероассоциации может принимать следующие 8 различных значений в зависимости от типа образуемого в реакции ассоциации комплекса молекул (рисунок 3).

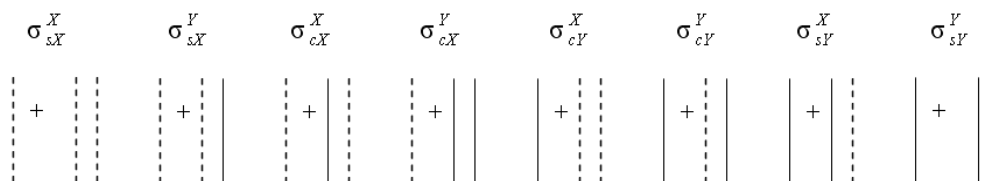


Рисунок 3 – Различные способы образования триады молекул и соответствующие параметры кооперативности

Примечание: индексы s и c при параметрах σ обозначают образование гомо- или гетеростыка соответственно. Индекс при s или c обозначает тип молекулы, связывающейся с данным комплексом. Верхний индекс определяет молекулу в комплексе, следующую за той, которая участвует в реакции ассоциации.

Исходя из данного определения параметров кооперативности гетероассоциации, все величины σ , представленные на рисунке 3, при $\sigma < 1$ характеризуют антикооперативный процесс (уменьшение константы при наращивании агрегата) и при $\sigma > 1$ – кооперативный процесс, т.е. «обратны» по своему смыслу стандартному параметру кооперативности самоассоциации, задаваемому как на рисунке 1. Параметры σ_{sX}^X и σ_{sY}^Y в таком случае связаны со стандартными значениями σ_X и σ_Y соотношениями

$$\sigma_{sX}^X = \frac{1}{\sigma_X}, \quad \sigma_{sY}^Y = \frac{1}{\sigma_Y}$$

Аналогично, для наделения параметра σ_c на рисунке 3 физическим смыслом стандартного параметра кооперативности (как на рисунке 2), его величина определялась как $1/\sigma_c$.

Для учета кооперативности гетероассоциации ароматических молекул в водном растворе некооперативная стохастическая модель [5] может быть модифицирована введением алгоритма расчета параметра кооперативности текущего комплекса C .

Алгоритм кооперативной стохастической модели гетероассоциации ароматических молекул.

Рассмотрим произвольный комплекс длиной l . В окрестности стыка i заданного комплекса выделим триаду молекул $I_i I_{i+1} I_{i+2}$; соответствующий данной триаде параметр кооперативности $\sigma(I_i I_{i+1} I_{i+2})$ может быть определен согласно рисунку 3. Очевидно, что дальнейшее наращивание агрегата возможно как слева, так и справа от рассматриваемой триады, причем любое добавление молекул будет соответствовать домножению параметра $\sigma(I_i I_{i+1} I_{i+2})$ на новый параметр кооперативности,

соответствующий вновь образованной триаде: $\sigma(I_{i-1}I_iI_{i+1})$ – при посадке молекулы слева и $\sigma(I_{i+1}I_{i+2}I_{i+3})$ – при посадке справа. При количестве молекул в комплексе l общее число точек инициации комплекса равняется $l-1$. Это означает, что заданный комплекс C может быть образован $l-1$ различными путями. Суммирование по всем путям даст результирующий параметр кооперативности $\sigma(C)$ комплекса C в целом.

На рисунке 4 представлен алгоритм, реализующий определение общего параметра кооперативности комплекса размерностью l . Первый внутренний цикл по n реализует операцию произведения параметров кооперативности при посадке молекул справа от выделенного стыка i , второй внутренний цикл по n определяет аналогичное произведение при посадке молекул слева. Внешний цикл по i соответствует суммированию по всем стыкам текущего комплекса.

Для представления параметров кооперативности в алгоритмическом виде, поставим им в соответствие линейный массив $mC[TRI]$. TRI – это функция, реализующая выделение триады молекул $I_iI_{i+1}I_{i+2}$ из заданного комплекса размерностью l , в окрестности стыка i . При этом каждая триада кодируется числом от 0 до 7 или в двоичной системе – от 000 до 111, что соответствует комбинации молекул, образующих данную триаду. Таким образом значение, возвращенное функцией TRI , является индексом массива mC , указывающего на соответствующий текущей триаде параметр кооперативности.

Таким образом, результатом работы подпрограммы на рисунке 4 является числовое значение макроскопического параметра кооперативности $\sigma(C)$, который домножается на концентрацию текущего комплекса C из базового стохастического алгоритма [5].

При анализе данных ЯМР по гетероассоциации ароматических молекул неизвестными являются параметры δ_C , K_C , σ_{sX}^Y , σ_{cX}^X , σ_{cX}^Y , σ_{cY}^X , σ_{cY}^Y , σ_{sY}^X . Указанные параметры определяются путем минимизации квадратичной функции невязки по методу наименьших квадратов:

$$\Delta = \sum_{i=1}^n (\delta_{ei} - \delta_i)^2, \quad (1)$$

где n – число экспериментальных точек; δ_{ei} и δ_i – экспериментальные значения протонного химического сдвига для i -ой концентрации и соответствующие расчетные значения с использованием вычислительного алгоритма.

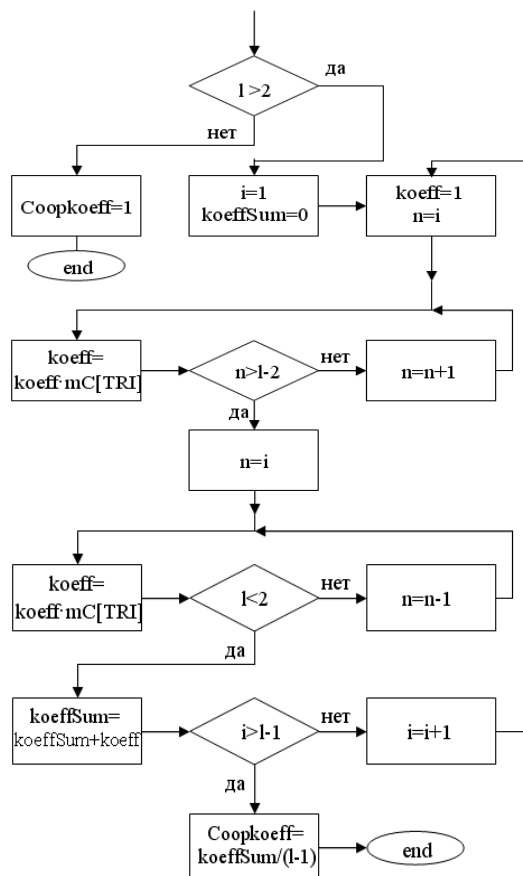


Рисунок 4 – Подпрограмма вычисления параметра кооперативности Coopcoeff заданного комплекса длиной l

Экспериментальные значения δ_{ei} определяются из концентрационной зависимости протонных химических сдвигов ароматических молекул, полученной из одномерных ^1H ЯМР спектров исследуемых соединений.

Для достижения надежного результата число подгоночных параметров было уменьшено путем фиксации некоторых коэффициентов: $\sigma_{cX}^Y = \sigma_{cY}^X = 1$, $\sigma_{sX}^Y = \sigma_{sY}^X = 1$, $\sigma_c = \sigma_{cX}^X = \sigma_{cY}^Y$. Такой подход представляется возможным, так как наиболее ярко эффект водородного связывания проявляется только в триадах молекул с двумя гетеростыками: $\text{XYX}(\sigma_{cX}^X)$ и $\text{YXY}(\sigma_{cY}^Y)$. Таким образом, расчет гетероассоциации проводился по трем параметрам: δ_c , K_c , σ_c .

Анализ кооперативности в реакциях гетероассоциации ароматических молекул.

В данной работе на основании экспериментальных данных ЯМР с использованием кооперативного стохастического алгоритма был проведен расчет параметров гетероассоциации различных биологически важных ароматических молекул: антибиотика дауномицина (DAU) и витамина флавин-моноклеотида (FMN) с различными ароматическими красителями и антибиотиками: акридиновыми красителями акридиновым оранжевым (АО) и профлавином (PF); фенантридиновыми красителями йодистым пропидием (PI), бромистым этидием (EB) и его азидо-аналогами – моно- (EMB) и диазидом этидия (EDC); антибиотиками митоксантроном (NOV), ногаламицином (NOG) и актиномицином D (AMD).

Расчетные параметры гетероассоциации DAU и FMN с ароматическими молекулами, расположенные в порядке возрастания фактора кооперативности, представлены в таблицах 1 и 2.

Анализ значений в таблицах 1,2 позволяет выделить системы с ярко выраженной антикооперативной гетероассоциацией ($\sigma_c > 1.5$): DAU+EB/PF/NOV, FMN+PF/EB/NOV, и системы со слабоантикооперативной гетероассоциацией ($\sigma_c < 1.5$): DAU+AO/EDC/PI/FMN, FMN+AMD/DAU/NOG.

Ярко выраженная антикооперативная гетероассоциация может быть объяснена проявлением эффекта водородного связывания в системах с $\sigma_c > 1.5$. Ранее было показано, что в таких системах имеет место дополнительная стабилизация 1:1 гетерокомплекса за счет образования межмолекулярной водородной связи [3,4,7-9]. Отличительной чертой пространственной структуры 1:1 гетерокомплексов таких молекул является возможность образования только лишь одной межмолекулярной связи. Это означает, что посадка второй молекулы, например, NOV или FMN на гетерокомплекс NOV–FMN (с образованием комплекса NOV-FMN-NOV или FMN-NOV-FMN) не сопровождается водородным связыванием и потому должно характеризоваться значительно меньшей константой гетероассоциации, чем предшествующее этому образование 1:1 гетерокомплекса. Таким образом, молекулярные системы с межмолекулярной водородной связью (DAU+EB/PF/NOV, FMN+PF/EB/NOV) предположительно должны отличаться резкой антикооперативностью реакций гетероассоциации выше димеризации, что действительно следует из таблицы 1,2.

Таблица 1 – Параметры кооперативности гетероассоциации дауномицина и флавин-моноклеотида с ароматическими молекулами

Ароматический лиганд	DAU+Ароматический лиганд						
	АО	EDC	PI	EMB	EB*	PF*	NOV*
σ_c	1.16	1.20	1.33	1.43	1.82	2.17	2.27

Таблица 2 – Параметры кооперативности гетероассоциации флавин-моноклеотида с ароматическими молекулами

Ароматический лиганд	FMN+Ароматический лиганд					
	AMD	DAU	NOG	PF*	EB*	NOV*
σ_c	1.20	1.23	1.41	1.59	1.89	2.33

Примечание. Символом * обозначены системы, которые дополнительно стабилизируются в растворе межмолекулярной водородной связью

Детальное исследование эффекта водородного связывания в системе EB-DAU было ранее выполнено в работе [10]. Показано, что последовательная замена двух аминогрупп фенантридинового хромофора EB, являющихся донорами водородных связей, на одну (EMB) и две (EDC) азидогруппы приводит к уменьшению вероятности образования гетероассоциатов красителей с антибиотиком в водном растворе, т.к. при этом последовательно уменьшается вероятность дополнительной стабилизации комплекса водородной связью. Описанный эффект хорошо согласуется с определенными в настоящей работе параметрами кооперативности для систем DAU+EB/EMB/EDC, закономерно убывающих в ряду EB, EMB, EDC.

Наличие слабой антикооперативности в системах, не образующих с DAU и FMN водородных связей: DAU+AO/EDC/PI/FMN, FMN+AMD/DAU/NOG ($\sigma_c < 1.5$, см. таблицы 1, 2), может быть объяснено, прежде всего, различием в структуре боковых групп взаимодействующих ароматических молекул.

Таким образом, расчетный параметр кооперативности гетероассоциации σ_c позволяет выделить эффект дополнительной стабилизации гетерокомплексов ароматических молекул межмолекулярной водородной связью. Для молекул, образующих межмолекулярные водородные связи в 1:1 гетерокомплексах, гетероассоциация носит выраженный антикооперативный характер.

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. ^1H NMR structural and thermodynamical analysis of the hetero-association of daunomycin and novatrone in aqueous solution / A.N. Veselkov [et al.] // J. Mol. Struct. — 2004. — P. 31–37.
4. Структурный и термодинамический анализ гетероассоциации молекул новатрона и флавиномононуклеотида в водном растворе методом ^1H -ЯМР-спектроскопии / А.Н. Веселков [и др.] // Биоорганическая химия. — 2005. — Т. 31. — № 5. — С. 1–8.
5. Стохастическая модель для ЯМР-анализа гетероассоциации биологически активных ароматических молекул / А.Н. Веселков [и др.] // Биофизика. — 2004. — Т. 49. — Вып. 4. — С. 587–594.
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. — N 3. — P. 383–390.
7. Исследование гетероассоциации молекул дауномицина и бромистого этидия в водном растворе методом ^1H ЯМР-спектроскопии / Д.А. Веселков [и др.] // Физ. химия. — 2001. — Т. 75. — № 5. — С. 879–884.
8. ^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 [et al.] // Mol. Phys. — 2000. — V. 98. — P. 1961–1971.
9. Evstigneev M.P. ^1H NMR study of the hetero-association of flavinmononucleotide with mutagenic dyes: ethidium bromide and proflavine / M.P. Evstigneev, Yu.V. Mukhina, D.B. Davies // Mol. Phys. — 2006. — V. 104. — P. 647–654.
10. ^1H NMR investigation of the hetero-association of phenanthridine dyes with daunomycin: effect of substitution of amino with azido groups in the dye chromophore / D.A. Veselkov, L. Karawajew, A.N. Veselkov, D.B. Davies // Mol. Phys. — 2004. — V. 102. — P. 1933–1942.

Поступила в редакцию 23.03.2006 г.