

УДК 577.113+541.49

В.П. Евстигнеев, аспирант,

А.О. Лантушенко, студент,

А.О. Розвадовская, доцент, канд. физ.-мат. наук

Севастопольский национальный технический университет

Севастополь, Студгородок, Украина, 99053

E-mail: lantushenko@mail.ru

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИОПУХОЛЕВОГО АНТИБИОТИКА АКТИНОМИЦИНА С ВИТАМИНОМ НИКОТИНАМИДОМ: ^1H ЯМР АНАЛИЗ

Исследовано взаимодействие антибиотика актиномицина D (AMD) и никотинамида (NMD) методами ^1H - ЯМР спектроскопии (500 МГц) и молекулярного моделирования. Для анализа гетероассоциации наряду с базовой была также использована двухсайтовая модель гетероассоциации, учитывающая посадку NMD на разные сайты антибиотика. Определены структурные и термодинамические параметры гетероассоциации, построена пространственная структура 1:1 гетерокомплекса NMD - AMD.

Введение. Совместное использование различных лекарственных веществ является одним из наиболее распространенных способов повышения эффективности медико-биологического действия противоопухолевых препаратов, принятых в клинической практике [1]. Такой подход во многих случаях позволяет не только улучшить биологический эффект ряда лекарственных соединений, но и замедлить развитие резистентности клетки к действию биологически активных соединений (БАС). Дополнительный прием витаминов в процессе лечения позволяет также значительно снизить неизбежную при химиотерапии токсичность для организма вводимых лекарственных препаратов [1].

Ароматический витамин никотинамид (NMD) (рисунок 1,а) по строению и медико-биологическому действию близок к никотиновой кислоте и наравне с нею рассматривается как витамин PP. NMD является специфическим противоаллергическим средством, улучшает углеводный обмен, действует положительно при многих формах заболеваний, обладает гипохолестеринемической активностью [2]. Использование никотинамида в комбинации с другими ароматическими БАС может приводить к изменению биологической активности последних. В работе [3] исследовано комплексообразование никотинамида с антиопухолевым антибиотиком доксорубицином и сделано предположение, что образование комплекса “доксорубин – ион Fe(III) – никотинамид” может приводить к снижению кардиотоксичности антибиотика. Никотинамид также является широко используемым гидротропным агентом из-за его способности к солюбилизации широкого круга лекарственных соединений и достаточно низкой токсичности. Важно отметить, что во многих работах в качестве возможного механизма изменения биологической активности БАС в присутствии NMD предполагается образование гетерокомплексов с никотинамидом со стопочным расположением ароматических хромофоров в гетерокомплексе.

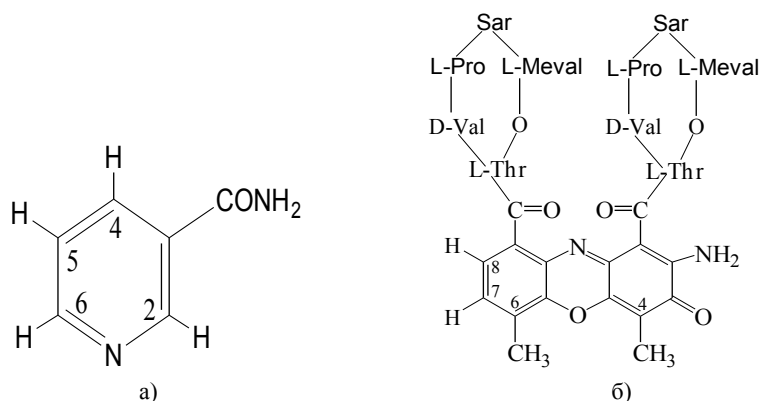


Рисунок 1 – Структурные формулы молекул никотинамида (а) и актиномицина D (б)

Актиномицин D (AMD) (рисунок 1,б) является одним из первых антиопухолевых препаратов, применявшихся в клинической практике. 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 (см. рисунок 1,б). Ранее было показано, что молекулы

AMD образуют гетерокомплексы с различными ароматическими соединениями, в частности, кофеином и антибиотиками [4]. Можно предположить, что взаимодействие AMD с никотиномидом также может иметь место в водном растворе.

С целью выяснения характера взаимодействия антибиотика и витамина в водном растворе как вероятного механизма изменения активности AMD в присутствии NMD, в настоящей работе методом 1М- и 2М-1Н-ЯМР-спектроскопии (500 МГц) исследована гетероассоциация AMD-NMD. Для анализа взаимодействия в системе AMD-NMD в водном растворе использована методика эксперимента, аналогичная примененной ранее [5], которая основана на анализе экспериментальных концентрационных и температурных зависимостей протонных химических сдвигов молекул.

Методика эксперимента. Никотинамид и антиопухолевый антибиотик актиномицин (рисунок 1) фирмы "Sigma" растворяли в D₂O с изотопной чистотой 99.95 % ("Sigma") и лиофилизировали. Растворы готовили путем добавления взвешенного количества образца в дейтерированном 0.1 М фосфатном буфере (pD 7.1), содержащем 10⁻⁴ моль/л EDTA. 1М- и 2М- ¹H ЯМР спектры измерены на спектрометре "Bruker DRX" с резонансной частотой 500 МГц. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул в смешанном растворе AMD-NMD выполнены температуре 298 К в интервале концентраций NMD от 48.25 до 1 мМ, при постоянной концентрации AMD ($C_{AMD} = 0.28$ мМ). Температурные зависимости химических сдвигов протонов молекул в смешанном растворе измерены в диапазоне температур от 275 К до 311 К. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2 диметил-2-силапентан-5-сульфокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония (ТМА).

Двумерные спектры гомоядерной корреляционной ¹H ЯМР спектроскопии (2М-TOCSY и 2М-ROESY) использованы для полного отнесения сигналов необменивающихся протонов NMD и AMD. Методика приготовления образцов и проведения экспериментов описана в [5]. Самоассоциация AMD и NMD была исследована ранее методом 1М- и 2М- ¹H ЯМР-спектроскопии в аналогичных экспериментальных условиях [6,7].

Результаты и обсуждение. Как и ранее [5], параметры гетероассоциации NMD-AMD определяли путём анализа зависимостей химических сдвигов необменивающихся протонов обоих ароматических соединений в смешанных растворах от концентрации (рисунок 2,а) и температуры (рисунок 2,б).

Необходимо отметить, что в данной работе исследуется гетероассоциация структурно различных молекул витамина и антибиотика (рисунок 1), что предполагает вероятность посадки как одной, так и нескольких молекул NMD на хромофор антибиотика. В связи с этим для анализа экспериментальных данных ЯМР (рисунок 2) были использованы базовая модель гетероассоциации, предполагающая один сайт посадки NMD на хромофор антибиотика [5 и ссылки в ней] и сокращенная двухсайтовая модель гетероассоциации, учитывающие образование 1:1, 1:2 комплексов NMD-антибиотик (таблица 1).

Двухсайтовая модель. В данной модели рассматриваются реакции бесконечномерной самоассоциации антибиотика и его гетероассоциации с мономерами никотинамида с образованием 8 возможных типов комплексов [8]. Под типом комплекса подразумевается взаимное расположение молекул AMD (X) и NMD(Y) в гетероассоциате в соответствии со схемой реакций, представленной в таблице 1.

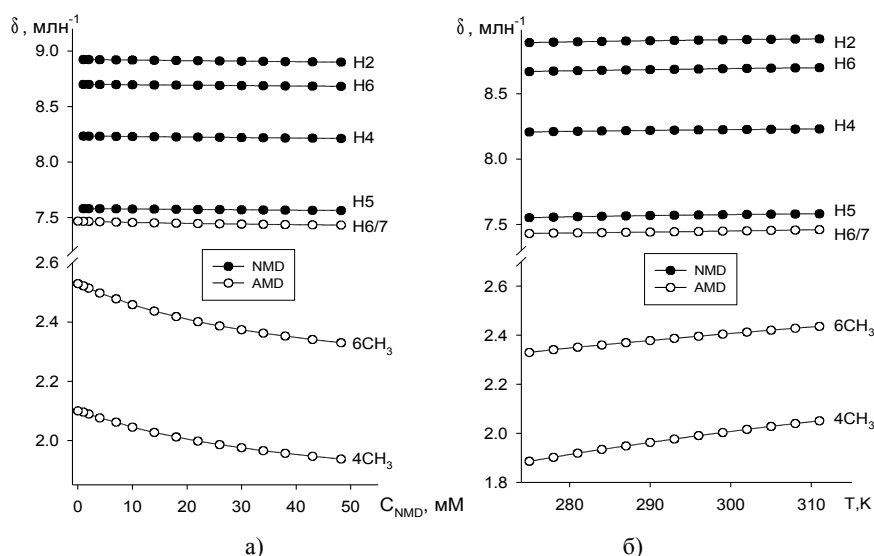


Рисунок 2 – а) экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов протонов NMD (—●—) и AMD (—○—) в смешанном растворе при T = 298 К, $C_{AMD} = 0.28$ мМ;

б) экспериментальные температурные зависимости химических сдвигов протонов NMD

В связи с тем, что равновесная константа самоассоциации никотинамида существенно меньше, чем константа самоассоциации антибиотика ($K_{NMD} = 0.73$ М⁻¹, $K_{AMD} = 1400$ М⁻¹ [6,7]), то в схеме реакций рассматривается взаимодействие только мономерных форм никотинамида с мономерами и агрегатами антибиотика (см. таблицу 1).

Таким образом, используя подход, аналогичный описанному ранее [5], закон сохранения массы для случая ассоциации ароматических молекул в реакциях в таблице 1 может быть записан в следующей форме:

$$\begin{cases} x_0 = \frac{x_1}{(1 - K_X x_1)^2} [1 + y_1(K_1 + K_2) + y_1^2(K_1^2 + K_2^2 + K_1 K_2)] \\ y_0 = y_1 + 2K_Y y_1^2 + \frac{x_1}{1 - K_X x_1} [y_1(K_1 + K_2) + 2y_1^2(K_1^2 + K_2^2 + K_1 K_2)], \end{cases} \quad (1)$$

где x_0 , y_0 , x_1 , y_1 – исходные и мономерные концентрации антибиотика и никотинамида (остальные обозначения см. в таблице 1).

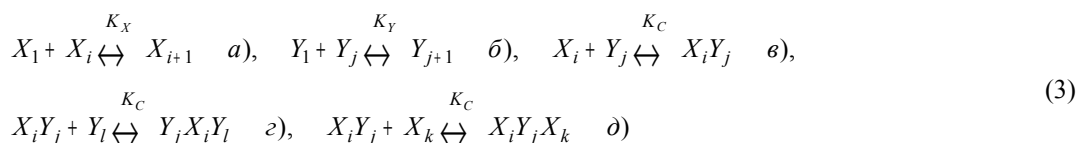
Экспериментально наблюдаемый химический сдвиг для протонов первого сайта антибиотика (δ_{1X}) (см. таблицу 1) в условиях быстрого обмена в масштабе времени ЯМР может быть записан в форме:

$$\delta_{1X} = \frac{x_1}{x_0} \left[\begin{aligned} & \delta_{mX} (1 + K_2 y_1 + K_2^2 y_1^2) + \\ & + \delta_{dX} \left(\frac{1}{1 - K_X x_1} - 1 \right) (y_1 K_1 + y_1^2 K_1 K_2 + 2(1 + y_1 K_2 + y_1^2 K_2^2) + \\ & + \delta_{iX} \left(\frac{x_1^2 K_X^2}{(1 - K_X x_1)^2} \right) (1 + K_1 y_1 + y_1 K_2 + y_1^2 K_1^2 + y_1^2 K_2^2 + y_1^2 K_1 K_2) + \\ & + (\delta_{mX} - \Delta \delta_{c1X}) (y_1 K_1 + y_1^2 K_1 K_2) + (\delta_{mX} - 2\Delta \delta_{c1X}) (y_1^2 K_1^2) + \\ & + (\delta_{dX} - \Delta \delta_{c1X}) \left(\frac{1}{1 - K_X x_1} - 1 \right) (y_1 K_1 + y_1^2 K_1 K_2 + 2y_1^2 K_1^2) \end{aligned} \right]. \quad (2)$$

Аналогично может быть получена зависимость наблюдаемых химических сдвигов для протонов второго сайта антибиотика при посадке на него никотинамида.

Как и ранее [8], индуцированные химические сдвиги $\Delta\delta_s$, $\Delta\delta_c$ в выражении (2) удобно выразить через параметры δ_d и δ_c соответственно: $\Delta\delta_s = \delta_m - \delta_d$, $\Delta\delta_c = \delta_m - \delta_c$. Параметры δ_m , δ_d для обоих сайтов антибиотиков и для NMD, а также равновесная константа K_X определены ранее из независимых экспериментов, при исследовании самоассоциации молекул в идентичных условиях растворителя [6,7]. Тогда из выражений (1)–(2) следует, что наблюдаемые протонные химические сдвиги молекул антибиотика и никотинамида в смешанном растворе являются функциями неизвестных δ_c и K_1 , K_2 , которые можно найти, используя экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов различных протонов ароматических молекул (рисунок 2,а). Вычислительная процедура расчёта параметров подробно описана в [5].

Базовая модель гетероассоциации NMD–AMD. В базовой модели молекулярной гетероассоциации учитывается образование бесконечномерных самоассоциатов, а также гетероассоциатов различного типа в соответствии со следующей схемой [5]:



В схеме (3) X_1 и Y_1 соответствуют мономерам антибиотика и NMD, X_i , X_k , Y_j , Y_l – самоассоциатам, содержащим i , k молекул антибиотика и j , l молекул никотинамида, соответственно. В отличие от двухсайтовой модели, в базовой модели рассматривается один сайт посадки NMD на антибиотик с характеристической константой гетероассоциации K_C и химическим сдвигом в гетерокомплексе δ_c . Получение аналитических соотношений для экспериментально наблюдаемого протонного химического сдвига молекул X и Y подробно описано в [5]. Ниже приводятся ключевые выражения, необходимые для численного анализа данных ЯМР-эксперимента, закон сохранения масс и выражение для экспериментально наблюдаемого протонного химического сдвига:

$$\begin{cases} x_0 = \frac{x_1}{(1 - K_X x_1)^2} \left[1 + K_C \frac{y_1}{1 - K_Y y_1} + \frac{K_C^2}{2} \frac{y_1^2}{(1 - K_Y y_1)^2} \right] \\ \delta_X = \frac{x_1}{x_0} \left[\delta_{mX} \left(2(1 + K_X x_1) - \frac{1}{(1 - K_X x_1)^2} \right) + 2\delta_{dX} \left(\frac{1}{(1 - K_X x_1)^2} - 1 - K_X x_1 \right) + \right. \\ \left. + \delta_{cX} \frac{K_C y_1}{(1 - K_X x_1)^2 (1 - K_Y y_1)} \left(1 + \frac{K_C y_1}{2(1 - K_Y y_1)} \right) \right]. \end{cases} \quad (4)$$

Таблица 1 – Протонные химические сдвиги в различных комплексах никотинамида (Y) и антибиотика (X)

№	Типы возможных реакций	Вид комплекса	Хим. сдвиг AMD		Хим. сдвиг NMD
			1-й сайт	2-й сайт	
1	Y_1				δ_{mY}
2	X_1		δ_{m1X}	δ_{m2X}	
3	$X_i + X_1 \xrightleftharpoons{K_X} X_{i+1}$		$\delta_{d1X} \quad \delta_{d1X}$	$\delta_{d2X} \quad \delta_{d2X}$	
4	$X_i + Y_1 \xrightleftharpoons{K_1} X_i Y_1$		$\delta_{m1X} - \Delta\delta_{d1X}$ $\delta_{d1X} - \Delta\delta_{e1X}$	$\delta_{m2X} \quad \delta_{d2X}$	$\delta_{mY} - \Delta\delta_{dY}$
5	$X_i + Y_1 \xrightleftharpoons{K_2} (X_i Y_1)'$		$\delta_{m1X} \quad \delta_{d1X}$	$\delta_{m2X} - \Delta\delta_{d2X}$ $\delta_{d2X} - \Delta\delta_{e2X}$	$\delta_{mY} - \Delta\delta_{e2Y}$
6	$X_i Y_1 + Y_1 \xrightleftharpoons{K_1} Y_1 X_i Y_1$		$\delta_{m1X} - 2\Delta\delta_{e1X}$	δ_{m2X}	$\delta_{mY} - \Delta\delta_{d1Y}$
7	$(X_i Y_1)' + Y_1 \xrightleftharpoons{K_2} (Y_1 X_i Y_1)'$		δ_{m1X}	$\delta_{m2X} - 2\Delta\delta_{e2X}$	$\delta_{mY} - \Delta\delta_{e2Y}$
8	$X_i Y_1 + Y_1 \xrightleftharpoons{K_2} (Y_1 X_i Y_1)''$		$\delta_{m1X} - \Delta\delta_{d1X}$	$\delta_{m2X} - \Delta\delta_{e2X}$	$\delta_{mY} - \Delta\delta_{d1Y}$ $\delta_{mY} - \Delta\delta_{e2Y}$
9	$(X_i Y_1)' + Y_1 \xrightleftharpoons{K_1} (Y_1 X_i Y_1)'$		$\delta_{m1X} - \Delta\delta_{d1X}$	$\delta_{m2X} - \Delta\delta_{e2X}$	$\delta_{mY} - \Delta\delta_{d1Y}$ $\delta_{mY} - \Delta\delta_{e2Y}$

Примечание к таблице 1.

Молекулы антибиотика обозначены как
молекулы никотинамида обозначены как

i – количество молекул в агрегате антибиотика;

Под сайтами подразумеваются различные места посадки NMD на хромофор антибиотика. Условно в таблице верхняя часть обозначения хромофора антибиотика считается сайтом № 1, нижняя – сайтом № 2;

K_X , K_Y – равновесные константы самоассоциации веществ X и Y.

K_1 и K_2 – равновесные константы гетероассоциации витамина и антибиотика при посадке NMD на первый или второй сайт соответственно;

δ_m , $\Delta\delta_s$, $\Delta\delta_c$ – химический сдвиг протонов в мономере, добавки в химический сдвиг со стороны гомо- и гетеростыка соответственно

Из (4) следует, что наблюдаемые протонные химические сдвиги молекул антибиотика и никотинамида в смешанном растворе являются функциями неизвестных δ_c и K_c , которые можно найти, используя экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов различных протонов ароматических молекул (рисунок 2,а). Вычислительная процедура расчёта параметров подробно описана в [5]. Результаты расчетов представлены в таблицах 2 и 3.

Термодинамика гетероассоциации. Термодинамические параметры ΔH^0_c и ΔS^0_c реакции гетероассоциации AMD–NMD были определены на основе экспериментальных температурных зависимостей протонных химических сдвигов молекул (рисунок 2,б) с использованием аддитивной модели для описания наблюдаемого протонного химического сдвига (выражение (4)) и соотношения

Вант-Гоффа, которое предполагает следующую зависимость равновесных констант само- и гетероассоциации молекул от температуры [5]:

$$K = \exp\left(\frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT}\right) \quad (5)$$

в предположении, что величины ΔS^0 и ΔH^0 не зависят существенным образом от температуры в исследованном диапазоне температур.

Таким образом, принимая во внимание известные значения δ_m , δ_d и δ_c , наблюдаемый химический сдвиг $\delta(T)$ в соотношении (4) является функцией двух неизвестных параметров ΔH_c^0 и ΔS_c^0 . В результате расчетов были получены усредненные значения энергии Гиббса, энтальпии и энтропии реакции гетероассоциации AMD–NMD в водном растворе, представленные в таблице 3.

Анализ результатов. Полученные в результате расчетов по двухсайтовой модели (результаты не представлены) значения равновесных констант гетероассоциации K_1 и K_2 имели разброс 200–300 %, что свидетельствует о неадекватности используемой модели экспериментальным данным. Вместе с тем, расчетные значения параметров гетероассоциации по базовой модели (таблицы 2 и 3) характеризуются незначительной погрешностью определения константы K_c и логичных значений индуцированного химического сдвига $\delta_m - \delta_c$. Кроме того, в сравнении с двухсайтовой моделью, базовая модель дает наименьшее значение функции невязки ($\sim 10^{-4}$). В связи с этим базовая модель считается адекватной полученным экспериментальным данным и дальнейший структурный и термодинамический анализ гетероассоциации AMD–NMD проводился на основании результатов, полученных с помощью этой модели (таблицы 2,3).

Таблица 2 – Расчётные значения параметров гетероассоциации никотинамида (NMD) и актиномицина (AMD) в 0.1 М фосфатном буфере (pD 7.1)

Протоны AMD	δ_c , млн ⁻¹	δ_m , млн ⁻¹	δ_d , млн ⁻¹	Протоны NMD	δ_c , млн ⁻¹	δ_m , млн ⁻¹	δ_d , млн ⁻¹	K , л/моль
H8/7	7.41	7.51	7.41	H2	7.59	8.93	8.55	$K_{AMD} = 1420 \pm 130$ $K_{NMD} = 0.73 \pm 0.05$ $K_c = 27 \pm 6$
6CH ₃	2.24	2.6	2.39	H6	8.65	8.7	8.38	
4CH ₃	1.89	2.28	1.69	H4	7.37	8.24	7.89	
				H5	6.55	7.59	7.29	

Таблица 3 – Расчётные значения термодинамических параметров гетероассоциации никотинамида (NMD) и актиномицина (AMD) в 0.1 М фосфатном буфере (pD 7.1)

комплекс	$-\Delta G^0$, кДж/моль	$-\Delta H^0$, кДж/моль	$-\Delta S^0$, Дж/(моль·К)
AMD	18.0 ± 0.3	31.8 ± 6.3	46.9 ± 10.9
NMD	$-(0.78 \pm 0.14)$	15.7 ± 2.3	55.2 ± 7.3
NMD - AMD	8.2 ± 0.5	19 ± 6	36 ± 17

Из таблицы 2 видно, что метильные протоны хромофора актиномицина испытывают значительное экранирование в гетерокомплексе с никотинамидом наряду со значительно меньшим экранированием ароматических протонов H8, H7 антибиотика. Единственная структура гетерокомплекса AMD-NMD, соответствующая такому профилю экранирования, возможна только в случае расположения хромофора молекулы никотинамида над центральным кольцом актиномицина. Это условие было использовано при задании начальной структуры 1:1 гетерокомплекса для последующей минимизации по энергии методами молекулярного моделирования (см. подробное описание методики построения в работе [9]). На рисунке 3 представлена найденная в результате расчётов наиболее вероятная пространственная структура 1:1 гетерокомплекса AMD-NMD в водном растворе.

Анализ термодинамических параметров реакции гетероассоциации ароматических молекул NMD и AMD (таблица 3) позволяет заключить, что доминирующую роль в образовании гетерокомплексов этих молекул играют дисперсионные взаимодействия, которые характеризуются как отрицательной энтальпией, так и отрицательной энтропией [10]. В целом термодинамические параметры гетероассоциации никотинамида с актиномицином занимают промежуточное положение между соответствующими параметрами самоассоциации взаимодействующих молекул (таблица 3). Ранее подобный результат наблюдался нами также при исследовании гетероассоциации NMD с рибофлавином

и антрациклиновыми антибиотиками [8] и свидетельствует об отсутствии дополнительной к стэкингу стабилизации гетерокомплексов в растворе межмолекулярной водородной связью.

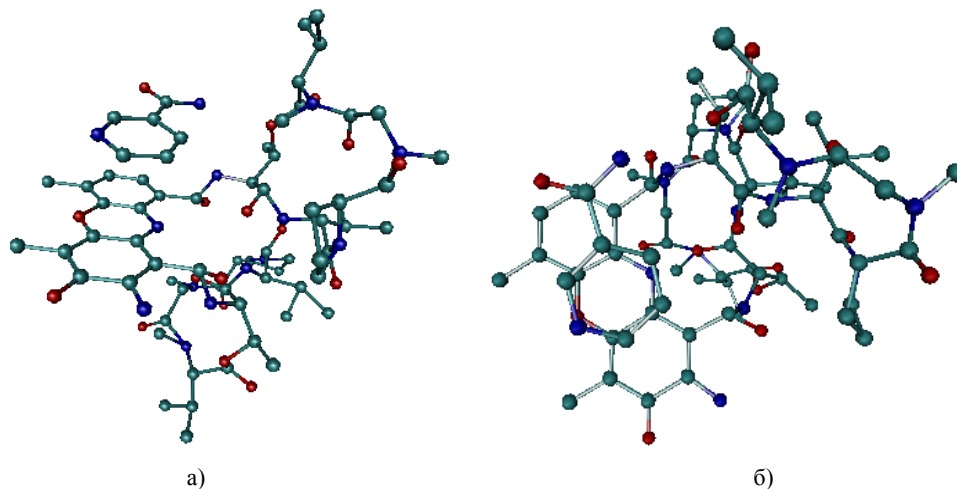


Рисунок 3 – Расчетная структура 1:1 гетерокомплекса никотинамида и актиномицина:
а) вид сбоку, б) вид сверху

Заключение. В настоящей работе методом ^1H ЯМР спектроскопии были проведены исследования гетероассоциации витамина никотинамида с антиопухолевым антибиотиком актиномицином. Показано, что никотинамид образует комплексы с ароматическим антибиотиком в растворе, стабилизированные преимущественно дисперсионными взаимодействиями хромофоров. Стехиометрия комплексообразования соответствует посадке не более чем одной молекулы NMD с одной стороны хромофора антибиотика.

Факт комплексообразования никотинамида с антиопухолевыми антибиотиками должен быть учтен при разработке оптимальных режимов витаминотерапии при лечении раковых заболеваний.

Библиографический список

1. Chu E. Physicians' cancer chemotherapy drug manual / E. Chu, V.T. DeVita. — L.: Jones and Bartlett Publ., 2003. — 512 p.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. — М.: Медицина, 2000. — Т. 2. — 606 с.
3. Electrochemical monitoring of the interaction of doxorubicin with nicotinamide and Fe(III) ions under aerobic and anaerobic conditions / S. Cakir [et al.] // *Bioelectrochem.* — 2003. — V. 60. — P. 11–19.
4. 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.
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 et al. // *Mol. Phys.* — 2000. — V. 98. — № 23. — P. 1961–1971.
6. Исследование самоассоциации антибиотика актиномицина D в водном растворе методом ^1H ЯМР спектроскопии / А.Н. Веселков, [и др.] // *Журн. структур. химии.* — 1995. — Т. 36. — № 1. — С. 81–88.
7. Анализ самоассоциации никотинамида в водном растворе по данным ^1H -ЯМР спектроскопии / А.Н. Веселков, А.О. Лантушенко, Д.А. Веселков, Д.Б. Дэвис // *Журн. физич. химии.* — 2001. — Т. 75. — № 12. — С. 2184–2188.
8. Взаимодействие ароматических антибиотиков и витаминов: ^1H ЯМР анализ гетероассоциации никотинамида с антрациклиновыми антиопухолевыми антибиотиками / А.О. Розвадовская [и др.] // *Биофизика.* — 2006. — Т. 51. — № 2. — С. 214–224.
9. ^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. — V. 701. — P. 31–37.
10. Ross R.D. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability / R.D. Ross, S. Subramanian // *Biochemistry.* — 1981. — V. 20. — P. 3096–3102.

Поступила в редакцию 18.01.2007 г.