

УДК 577.113:541.49

А.А. Мосунов, студент,

С.Н. Симонова, магистрант,

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

Севастопольский национальный технический университет

Севастополь, Студгородок, Украина, 99053

E-mail: lantushenko@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ САМОАССОЦИИ АНТИБИОТИКА ТОПОТЕКАНА

Проведено исследование самоассоциации противоопухолевого антибиотика топотекана в водном растворе методами ^1H ЯМР спектроскопии и молекулярной механики. Получены параметры самоассоциации антибиотика: равновесные константы, энтальпия и энтропия, рассчитана наиболее вероятная пространственная структура 1:1 димера молекул антибиотика в растворе.

Введение. Наблюдающийся в последнее время интерес к алкалоиду растительного происхождения камптотецину и его многочисленным производным обусловлен высокой антиопухолевой активностью данных соединений в лечении различных типов раковых заболеваний [1]. Установлено, что камптотецин и его синтетический водорастворимый аналог топотекан (ТРТ) (рисунок 1) проявляют свою биологическую активность путем формирования устойчивых тройных молекулярных комплексов, состоящих из антибиотика, ДНК и топоизомеразы I (Торо I) [2]. Торо I – ферменты, присутствующие в ядре клетки и необходимые для решения топологических проблем, возникающих при репликации и транскрипции ДНК. Фермент Торо I формирует "зажим" вокруг разорванной В-формы ДНК, топотекан интеркалирует в ДНК, препятствуя продвижению по ней репликационной вилки. Таким образом, антибиотик действует как ингибитор топоизомеразы I, нарушая тем самым процессы репликации и транскрипции опухолевых клеток. Вместе с тем более поздние исследования механизма связывания антибиотика с комплексом Топоизомераза-ДНК позволили сделать однозначный вывод, что ключевым моментом биологического действия антибиотиков камптотецинового семейства является именно комплексобразование с молекулами нуклеиновых кислот [3].

Важная особенность молекулы топотекана – это способность гидролиза из лактонной в открытую (карбоксилатную) форму при изменении pH (рисунок 1), при этом молярная доля молекул в открытой форме при pH 7.4 составляет более 0.8 [4]. Ряд биологических исследований [5] свидетельствует о том, что молекулы топотекана в открытой форме не проявляют активности в качестве ингибиторов Торо I.

Характер взаимодействия лактонной формы ТРТ с короткими и полимерными последовательностями ДНК изучен сравнительно неплохо [3,6], однако причина проявления антиопухолевого эффекта именно для лактонной формы антибиотика и его отсутствие для карбоксилатной формы так и не была выяснена. С целью ответа на данный вопрос необходимы всесторонние исследования взаимодействия обеих форм ТРТ с ДНК, включая, как предварительный этап, анализ самоассоциации антибиотика в среде с различным pH. Ранее самоассоциация ТРТ в лактонной форме была детально изучена методами спектрофотометрии [6] и ЯМР [7], однако информация об агрегации карбоксилатной формы антибиотика в литературе отсутствует.

В настоящей работе исследована самоассоциация топотекана в водном растворе методом одномерной (1D) и двумерной (2D) ^1H ЯМР спектроскопии (500 МГц) в условиях растворителя, предполагающих доминирование карбоксилатной формы антибиотика (pH 7.5).

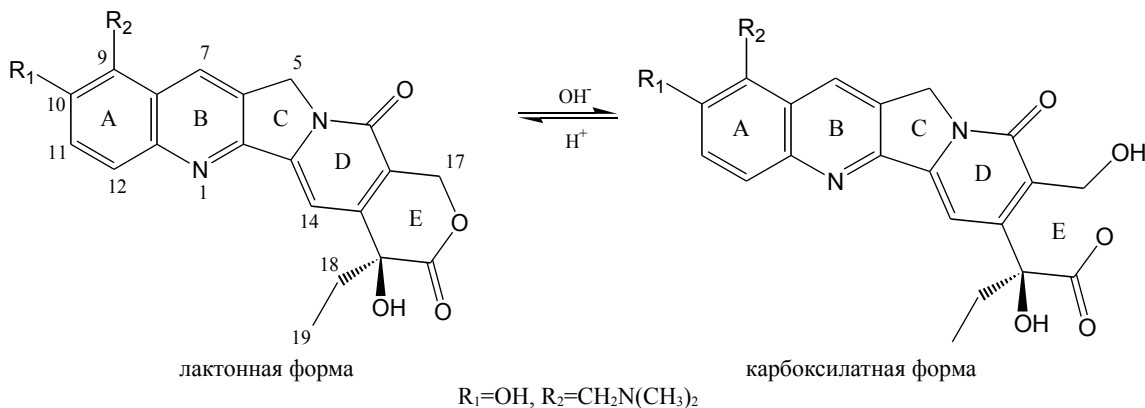


Рисунок 1 – Гидролиз топотекана из лактонной в открытую форму в зависимости от кислотности среды

Методика эксперимента. Антибиотик топотекан фирмы “Molekyla” (Великобритания) растворяли в D₂O (Sigma) с изотопной чистотой 99.95% и лиофилизовали. Растворы готовили путем добавления требуемого количества образца в дейтерированный 0.1 М фосфатный буфер (pH 7.5 после корректировки на измерение pH стеклянным электродом в дейтерированном растворителе), содержащем 10⁻⁴ моль/л EDTA. 1D- и 2D-¹H-ЯМР-спектры получены на спектрометре “Bruker DRX” с резонансной частотой 500 МГц. Концентрационные измерения химических сдвигов протонов молекул выполнены при температуре 298 К, в интервале концентраций ТРТ от 0.06 до 1.01 мМ. Температурные зависимости химических сдвигов измерены в диапазоне температур от 278 до 302 К. Ограничение температурного интервала сверху обусловлено ускорением реакции гидролиза ТРТ при повышенных температурах. Абсолютное значение химического сдвига определяли относительно DSS (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония. Отнесение сигналов в спектрах ¹H-ЯМР проводили с помощью двумерных гомоядерных экспериментов TOCSY и ROESY.

Расчет пространственной структуры димера ТРТ выполнен методами молекулярной механики с использованием программы X-PLOR (версия 3.851), в соответствии с методикой, опубликованной в работе [8].

Результаты и обсуждение. На рисунке 2 представлен двумерный ROESY спектр ТРТ и соответствующее отнесение необменивающихся протонов антибиотика. К сожалению, данный спектр не содержит межмолекулярных кросс-пиков, которые могли бы свидетельствовать об ориентации хромофоров ТРТ в наиболее вероятной димерной форме агрегата молекул в растворе. Вместе с тем интенсивность внутримолекулярных контактов оказывается достаточной для того чтобы судить о некоторых структурных особенностях молекулы ТРТ в данных условиях растворителя. В частности, можно отметить наличие кросс-пика между протонами H18a,b и H17a,b (см. рисунок 2). Это свидетельствует о том, что в данных экспериментальных условиях молекулы топотекана находятся преимущественно в открытой (карбоксилатной) форме, т.к. только в такой конформации может быть обеспечена пространственная близость вышеуказанных протонов.

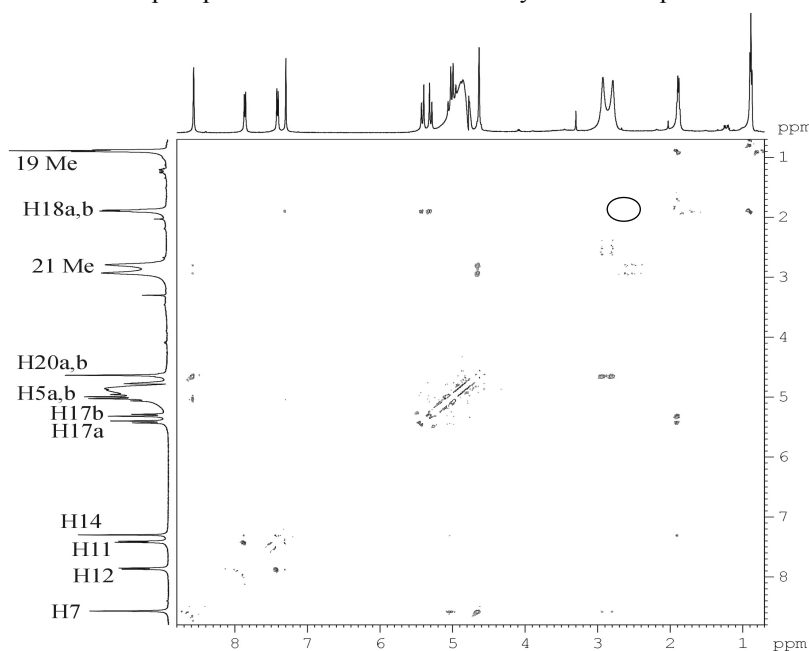


Рисунок 2 – 2D-ROESY спектр топотекана в 0.1 М фосфатном буфере при T=290 К, pH 7.5, C_{ТРТ} = 1 ммоль/л

Анализ структурных и термодинамических параметров агрегации ТРТ проведен так же, как и исследованных ранее ароматических красителей и антибиотиков [9], по экспериментальным концентрационным и температурным зависимостям химических сдвигов протонов молекул антибиотика (рисунок 3). Из рисунка 3 следует, что при увеличении концентрации и при уменьшении температуры наблюдается смещение резонансов протонов хромофора ТРТ в область более сильного поля, как это обычно имеет место при образовании стопочных ассоциатов ароматических молекул в растворе [9]. Следовательно, имеющиеся экспериментальные данные указывают на существование

агрегации молекул топотекана в растворе за счет вертикальных стэкинг-взаимодействий хромофоров в молекулярных комплексах.

Для интерпретации экспериментальных данных, как и ранее [9], использовали модель бесконечномерной некооперативной самоассоциации молекул, в которой константы равновесия K_j для реакций

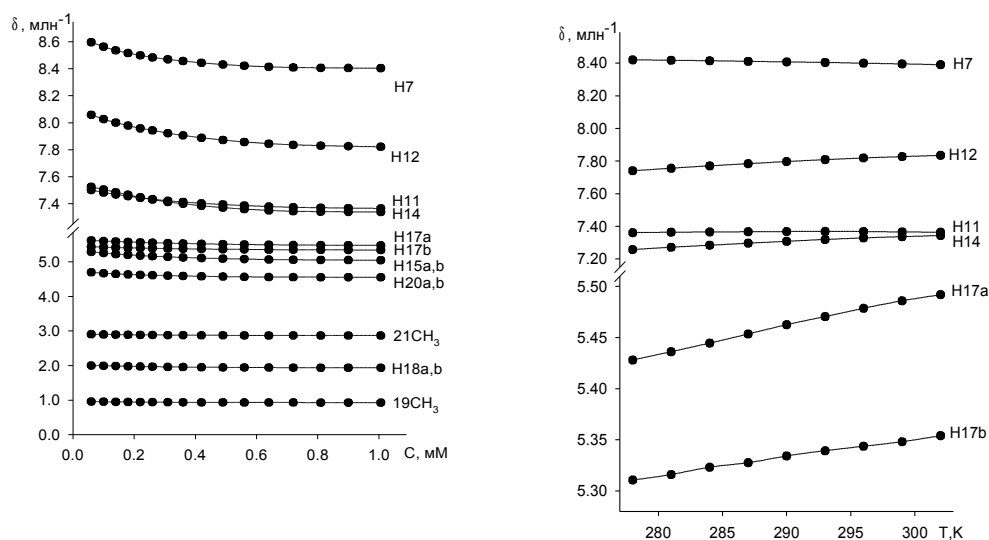


Рисунок 3 – Экспериментальные концентрационные и температурные зависимости протонных химических сдвигов топотекана



предполагаются одинаковыми при всех j . В такой модели зависимость химического сдвига δ от концентрации x_0 имеет вид [9]:

$$\delta = \delta_m + 2(\delta_d - \delta_m) \left(\frac{2Kx_0 + 1 - \sqrt{4Kx_0 + 1}}{2Kx_0} \right), \quad (2)$$

где δ_d – протонный химический сдвиг для протонов антибиотика в составе димерного комплекса, 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; численная процедура минимизации описана в работе [9].

Анализ самоассоциации ТРТ был также проведен с использованием 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 $K_1 = \sigma K$ [9]. Случай $\sigma = 1$ соответствует рассмотренной выше некооперативной модели. Агрегация является кооперативной при $\sigma < 1$, когда образование димеров создает энергетически выгодные условия для последующей ассоциации молекул, и антикооперативной при $\sigma > 1$. Процедура нахождения параметров аналогична рассмотренной выше некооперативной модели. Результаты расчетов параметров кооперативной и некооперативной самоассоциации для необменивающихся протонов топотекана в лактонной и карбоксилатной формах приведены в таблице 1.

 Таблица 1 – Параметры самоассоциации топотекана в карбоксилатной (carb) при $T = 298$ К и лактонной (lact [7]) при $T = 303$ К формах

Протон	$\delta_m, \text{мЛН}^{-1}$		$\delta_d, \text{мЛН}^{-1}$		$K, 10^3 \text{ л/моль}$		σ	$\Delta H^0, \text{кДж/моль}$	$\Delta S^0, \text{Дж/моль} \cdot \text{К}$
	carb	lact	carb	lact	carb	lact	carb		
H7	8.74	8.81	8.51	8.57	3.9 ± 0.8	3.4 ± 1.0	0.72 ± 0.05	$-(38 \pm 2)$	$-(60 \pm 10)$
H12	8.15	8.22	7.87	7.80					
H11	7.56	7.65	7.39	7.42					
H14	7.61	7.68	7.38	7.25					
H17a	5.66	5.68	5.49	5.40					
H17b	5.47	5.49	5.36	5.31					
H5a,b	5.41	—	5.12	—					
H20a,b	4.84	—	4.65	—					
21Me	2.94	—	2.89	—					
H18a,b	2.03	—	1.95	—					
19Me	0.98	—	0.95	—					

Температурные зависимости протонных химических сдвигов (см. рисунок 3б) были проанализированы, как и ранее [9], используя зависимость равновесной константы самоассоциации от температуры в виде

$$K(T) = \exp(\Delta S^0/R - \Delta H^0/RT), \quad (3)$$

в предположении, что величины ΔS^0 (энтропия) и ΔH^0 (энтальпия) не зависят от T в исследованном диапазоне температур. Как и в случае концентрационного эксперимента (см. выше), при этом осуществлялась минимизация квадратичного отклонения экспериментальных температурных кривых (см. рисунок 3,б) от расчетных значений химических сдвигов по модели (2) с учетом выражения (3). Расчетные значения термодинамических параметров также представлены в таблице 1.

Прежде всего следует отметить, что расчетное значение параметра кооперативности самоассоциации ТРТ соответствует слабокооперативной агрегации антибиотика и близко по величине к параметру кооперативности структурно подобного топотекану фенантридинового красителя бромистого этидия [9]. По-видимому, отсутствие массивных боковых групп в структуре молекулы ТРТ и определяет характер его агрегации.

Как следует из таблицы 1, величина константы самоассоциации топотекана, рассчитанная в данной работе для карбоксилатной формы молекулы (при $T=298\text{ K}$), достаточно близка к соответствующему значению константы, полученному ранее при $T=303\text{ K}$ для ТРТ в лактонной форме [7]. Это дает основание утверждать, что энергетические параметры агрегации антибиотика при различных рН среды различаются несущественно. Вместе с тем, как следует из таблицы 1, некоторое (относительно небольшое) различие в значениях предельных протонных химических сдвигов в мономере и димере лактонной и карбоксилатной форм антибиотика все же имеет место. Интересно отметить, что все без исключения протоны лактонной формы превышают по параметру δ_m соответствующие значения для протонов карбоксилатной формы. Полученный результат является несколько неожиданным, поскольку раскрытие лактонного кольца должно оказать большее влияние на химический сдвиг ближайших протонов Н17а,б и Н14 и наименьшее влияние на удаленные ароматические протоны Н11, Н12. На наш взгляд, указанное различие расчетных значений химических сдвигов является, скорее, результатом различной методики определения параметра δ_m , использованной в данной работе и в работе [7], нежели следствием структурной модификации молекулы при изменении рН среды: в данной работе параметр δ_m определялся расчетным образом путем минимизации квадратичного отклонения экспериментальных и расчетных данных с использованием модели (2), в то время как в работе [7] δ_m измерялся экспериментально при низкой концентрации антибиотика ($5\mu\text{M}$), предполагающей ничтожно малый вклад димеров в результирующий химический сдвиг.

Как видно из таблицы 1, все ароматические протоны молекулы ТРТ в лактонной и карбоксилатной формах испытывают экранирование при образовании самоассоциатов, что позволяет сделать определенные суждения о взаимной ориентации молекул в димере. Во-первых, экранирование всех протонов антибиотика возможно только в том случае, если димер молекул образован в виде «стопкообразного» расположения хромофоров. Во-вторых, учитывая расположение колец хромофора ТРТ не на одной линии (см. рисунок 1), наблюдаемое экранирование всех протонов по периметру хромофора может быть реализовано только если в димере центры колец одной молекулы в димере располагаются над центрами колец другой молекулы. Учитывая это, а также маловероятную по стерическим причинам параллельную ориентацию хромофоров, можно предположить, что наиболее вероятной структурой димерного комплекса будет антипараллельная структура как на рисунке 4. Данные рассуждения были положены в основу определения начальной ориентации хромофоров в димерном комплексе для последующей минимизации по энергии в программе молекулярного моделирования X-PLOR. Пространственная структура димера ТРТ, отвечающая как предельным химическим сдвигам, так и минимуму потенциальной энергии атом-атомных взаимодействий, изображена на рисунке 4. В таком

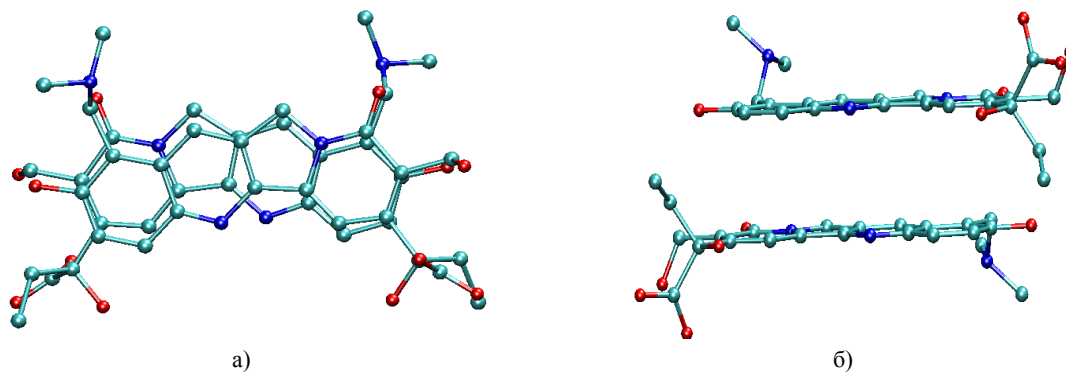


Рисунок 4 – Пространственные структуры димера молекул топотекана:
а) вид на комплекс сверху; б) вид на комплекс сбоку

комплексе имеет место довольно сильное перекрывание ароматических колец взаимодействующих молекул (стэкинг-взаимодействие), что предполагает существенную роль дисперсионных взаимодействий при образовании агрегата, а также гидрофобных взаимодействий, возникающих за счет вытеснения молекул воды из объема димера при ассоциации.

Значения энтальпии и энтропии самоассоциации ТРТ (см. таблицу 1) достаточно велики по абсолютной величине в сравнении с соответствующими параметрами самоассоциации изученных ранее ароматических молекул [9]. Отрицательный знак термодинамических параметров и высокая степень перекрывания ароматических хромофоров в димере (см. рисунок 4) позволяют предположить значительный вклад дисперсионных взаимодействий в энергетику реакции самоассоциации антибиотика. При этом анализ структуры димерного комплекса (см. рисунок 4) свидетельствует об отсутствии межмолекулярных водородных связей, которые дополнительно могут стабилизировать димерный комплекс. Интересно отметить, что в работе [6] высокая стабильность димерного комплекса ТРТ была связана с возможным образованием именно межмолекулярной водородной связи. В свою очередь, вывод об образовании водородной связи был сделан авторами на основании наблюдаемого увеличения константы ионизации pK_a гидроксильной группы кольца А антибиотика при агрегации и интерпретированного как результат водородного связывания этой группы с азотом N1 кольца В соседней молекулы ТРТ в димере. Следует, однако, отметить, что эффект изменения pK_a различных групп при агрегации ароматических молекул известен сравнительно давно, и не является обязательным следствием водородного связывания. В частности, изменение pK_a при агрегации производных нуклеиновых оснований интерпретируется как результат уменьшения полярности растворителя за счет удаления молекул воды из объема агрегата, упрощающее протонирование/депротонирование соответствующих групп [10].

Библиографический список

1. Takimoto C.H. Clinical applications of the camptothecins / C.H. Takimoto, J. Wright, S.G. Arbuck // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1998. — V. 1400. — P. 107–119.
2. Mechanism of action of camptothecin / L.F. Liu, S.D. Desai, T.-K. Li, Y. Mao et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1996. — V. 803. — P. 44–49.
3. Topotecan lactone selectively binds to double- and single-stranded DNA in the absence of Topoisomerase I / S. Yao, D. Murali, P. Seetharamulu, K. Haridas et al. // *Cancer Res.* — 1998. — V. 58. — P. 3782–3786.
4. Structure-activity study of the action of camptothecin derivatives on mammalian Topoisomerase I: Evidence for a specific receptor site and relation to antitumor activity / C. Jaxel, K.W. Kohn, R.C. Wani et al. // *Cancer Res.* — 1989. — V. 49. — P. 1465–1469.
5. Dependence of anticancer activity of camptothecins on maintaining their lactone function / B.C. Giovanella, N. Harris, J. Mendoza et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1996. — V. 803. — P. 27–35.
6. Interaction of topotecan, DNA topoisomerase I inhibitor, with double-stranded polydeoxyribonucleotides. 1. Topotecan dimerization in solution / S.A. Strel'tsov, S.L. Grokhovskii, I.A. Kudelina, V.A. Oleinikov et al. // *Молекулярн. биология.* — 2001. — Т. 35. — С. 365–373.
7. Multiple binding modes of the camptothecin family to DNA oligomers / W. Bocian, R. Kawecki, E. Bednarek, J. Sitkowski et al. // *Chem. Eur. J.* — 2004. — V. 10. — P. 5776–5787.
8. 1H NMR structural and thermodynamical analysis of the hetero-association of daunomycin and novatrone in aqueous solution / A.N. Veselkov, M.P. Evstigneev, A.O. Rozvadovskaya, A.A. Hernandez Santiago et al. // *J. Mol. Str.* — 2004. — V. 701. — P. 31–37.
9. 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. — P. 383–390.
10. Corfu N.A. Acid-base properties of nucleosides and nucleotides as a function of concentration / N.A. Corfu, H. Sigel // *Eur. J. Biochem.* — 1991. — V. 199. — P. 659–669.

Поступила в редакцию 18.01.2007 г.