

¹H-ЯМР анализ гетероассоциации кофеина с фенантридиновым красителем йодистым пропидием в водном растворе

Д. А. Веселков¹, В. А. Сигаев, С. А. Высоцкий, Л. Н. Дымант,
Д. Б. Дэвис¹, А. Н. Веселков

Севастопольский государственный технический университет Министерства образования Украины
Студгородок, Севастополь, 99053, Украина

¹ Лондонский университет, Беркбек колледж
Лондон WC1N 0OP, Великобритания

Рассмотрен молекулярный механизм действия кофеина (CAF) как комплексообразователя — интерцептора ароматических лигандов, интеркалирующих в ДНК, на примере типичного интеркалятора фенантридинового красителя йодистого пропидия (PI). Изучены процессы гетероассоциации молекул CAF и PI методом одномерной и двумерной ¹H-ЯМР спектроскопии (500 МГц). Измерены концентрационные (при температуре 298 К) и температурные зависимости протонных химических сдвигов молекул в водном растворе. Определены равновесная константа реакции гетероассоциации CAF и PI при T = 298 К ($K = 28 \pm 5$ л/моль), а также значения предельных химических сдвигов протонов ароматических лигандов в составе ассоциатов. На основе рассчитанных значений индуцированных протонных химических сдвигов молекул и квантовомеханических кривых экранирования для CAF и PI определена наиболее вероятная структура 1:1 гетерокомплекса CAF—PI в водном растворе. Рассчитаны термодинамические параметры образования гетерокомплекса CAF—PI. Структурный и термодинамический анализ свидетельствует о существенной роли дисперсионных сил и гидрофобных взаимодействий при образовании гетерокомплекса в водносолевом растворе. Проведен расчет относительного содержания различного типа ассоциатов в смешанном растворе, содержащем CAF и PI. Выявлены особенности равновесия гетероассоциатов CAF—PI в растворе в зависимости от концентрации и температуры. Гетероассоциация молекул CAF и PI приводит к меньшей эффективной концентрации интеркалятора в растворе и соответственно к уменьшению биологической активности красителя.

Введение. Известно, что фенантридиновые красители — бромистый этидий (ЕВ) и йодистый пропидий (PI) связываются с двойной спиралью ДНК путем интеркаляции [1, 2] и на протяжении многих лет используются в качестве маркеров при исследовании ДНК в клетках. Фенантридиновые красители так же, как и ряд других типичных интеркаляторов, в частности, акридиновые красители демонстрируют явное сродство к связыванию с пиримидин-пуриновой последовательностью оснований в олигонуклеотидной цепи [3—7].

Кофеин (1,3,7-триметилксантин, CAF) отно-

сится к классу психомоторных стимуляторов [8]. Исследования показывают, что он обладает множественными эффектами на клеточном уровне, в частности, является ингибитором процесса репарирования в бактериальных системах [9]. Принято считать, что биологическая активность CAF связана с его взаимодействием с биополимерами — белками и ДНК [9—10].

Вместе с тем экспериментальные данные свидетельствуют о том, что CAF уменьшает цитотоксическое действие ЕВ [11] и ряда антиопухолевых препаратов, таких как доксорубин и его аналоги, эллиптицин и др. [12, 13]. В работах [13—15] сделан вывод о том, что CAF образует комплексы с ароматическими молекулами, тем самым умень-

шая их эффективную концентрацию и соответственно фармакологическую активность. Таким образом, полагается, что САФ выступает в роли комплексобразователя — интерцептора ароматических биологически активных веществ, которые связываются с ДНК путем интеркаляции [14].

Для подтверждения данного вывода были проведены исследования по гетероассоциации САФ с ароматическими молекулами в растворе и предложены различные модели для интерпретации экспериментальных данных [14—18]. Однако большинство из предложенных моделей гетероассоциации молекул неприменимы в общем случае, так как они не учитывают образования многомерных агрегатов любого размера как для самоассоциатов, так и для гетероассоциатов в водном растворе. Статистическая термодинамическая модель ассоциации двух различных ароматических веществ, образующих бесконечномерные агрегаты в растворе как при самоассоциации, так и при гетероассоциации молекул, была развита Веллером и соавт. [19]. Однако использование этой модели затруднительно для практического применения, поскольку не содержит аналитических выражений, удобных для анализа экспериментальных данных. Нами недавно разработана достаточно строгая обобщенная модель [20], учитывающая образование агрегатов различной размерности как для реакций самоассоциации, так и гетероассоциации молекул, в которой получены аналитические выражения для ЯМР-характеристик взаимодействующих молекул в смешанном растворе. Предлагаемая методика позволяет определить структурные и термодинамические параметры гетероассоциатов на основе экспериментальных зависимостей химических сдвигов протонов молекул от концентрации и температуры раствора.

В настоящей работе эта модель использована для определения структурных особенностей и термодинамических параметров гетероассоциации САФ с PI в 0,1 М фосфатном буфере (pD 7,1) для выяснения молекулярного механизма действия САФ как интерцептора («перехватчика») биологически активных веществ. Ранее нами исследованы процессы самоассоциации PI и САФ, а также гетероассоциации между САФ и EB методом ЯМР-спектроскопии в аналогичных экспериментальных условиях [20, 21]. Следует отметить, что, несмотря на общий характер взаимодействия фенантридиновых красителей EB и PI с нуклеиновыми кислотами, наблюдаются существенные различия в термодинамике комплексообразования монокатиона этидия и дикатиона пропидия как с нативной ДНК [22], так и с полинуклеотидами [23]. Сравнительный анализ параметров комплексообразования

двух родственных интеркалирующих красителей EB и PI, имеющих одинаковые структуры хромофоров, но различные боковые алкильные цепи, с биологически активными молекулами важен для выяснения физической природы специфического взаимодействия таких молекул.

Условия эксперимента. САФ и PI (рис. 1) фирмы «Sigma» (США) растворяли в D₂O с изотопной чистотой 99,95 % D («Sigma») и лиофилизировали. Растворы готовили, добавляя взвешенное количество образца в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере (pD 7,1), содержащем 10⁻⁴ моль/л ЭДТА. Концентрацию ароматических молекул в водном растворе определяли спектрофотометрически — для САФ коэффициент экстинкции $\epsilon = 9740 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 273 \text{ nm}$) [24], для PI — $\epsilon = 5900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\epsilon = 493 \text{ nm}$) [25].

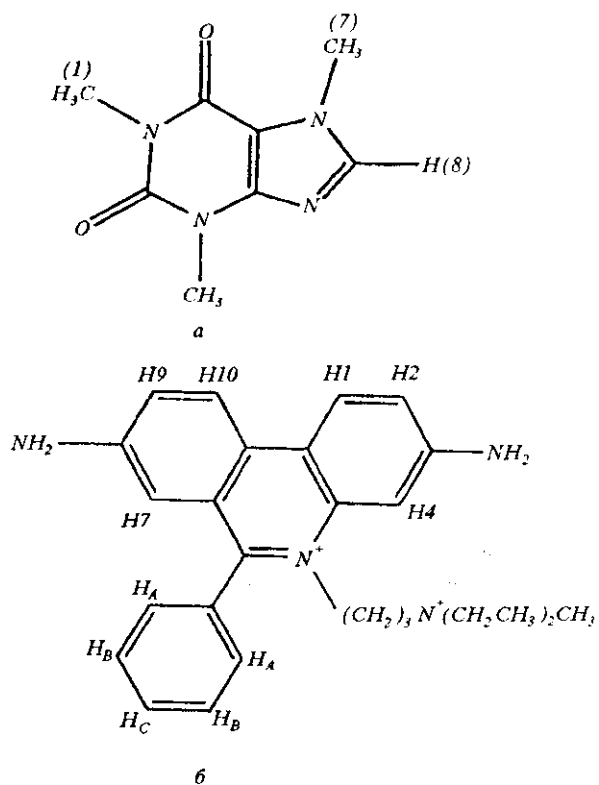


Рис. 1. Структурные формулы ароматических лигандов с указанием необменивающихся протонов: а — кофеин (1,3,7-триметилксантин); б — йодистый пропидий (PI)

¹H- и ²M-¹H-ЯМР спектры измерены на спектрометре «Bruker DRX» с резонансной частотой 500 МГц. Остаточный сигнал HOD насыщался в период детектирования. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул выполнены при температуре T = 298 К в интервале концентраций красителя от 3,9 до 0,1 ммоль/л; температурные зависимости химических сдвигов протонов ароматических лигандов измерены в диапазоне температур от 278 до 358 К. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоуксусная кислота), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония (ТМА).

Отнесение сигналов в спектрах ¹H-ЯМР, отождествление химических и пространственных связей проводили соответственно с помощью двумерных гомоядерных TOCSY, NOESY и ROESY экспериментов. Методика приготовления образцов и проведения экспериментов описана ранее в [26].

Результаты и обсуждение. Структурные и термодинамические параметры гетероассоциации САФ и PI определяли, анализируя зависимости химических сдвигов необменивающихся протонов обоих ароматических соединений в смешанных растворах от концентрации и температуры. В 2M-NOESY- и 2M-ROESY-спектрах смешанных растворов не наблюдались межмолекулярные кросс-пики даже при максимальных исследованных концентрациях молекул. Пренебрежимо малая интенсивность межмолекулярных кросс-пигов может быть связана со смещением молекулярного равновесия при добавлении САФ вследствие образования различных гетероассоциатов между САФ и PI с относительно малым содержанием каждого типа комплекса в растворе.

В процессе измерений концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов изучаемых ароматических молекул концентрацию САФ поддерживали постоянной (P₀ = 2,0 мМ) при изменении процентного содержания PI в растворе (рис. 2). Это связано с тем, что равновесная константа самоассоциации молекул PI более чем в пять раз превышает константу самоассоциации для САФ (K_A = (63 ± 6) л/моль, K_P = (11,8 ± 0,3) л/моль при T = 298 К [20, 21]) и, следовательно, изменение концентрации красителя оказывает большее влияние на равновесное распределение агрегатов, чем вариация содержания САФ в растворе.

В рассматриваемой модели гетероассоциации молекул [20] предполагается, что в растворе имеет место динамическое равновесие взаимодействующих молекул, в котором учитывается образование бесконечномерных самоассоциатов, а также гетеро-

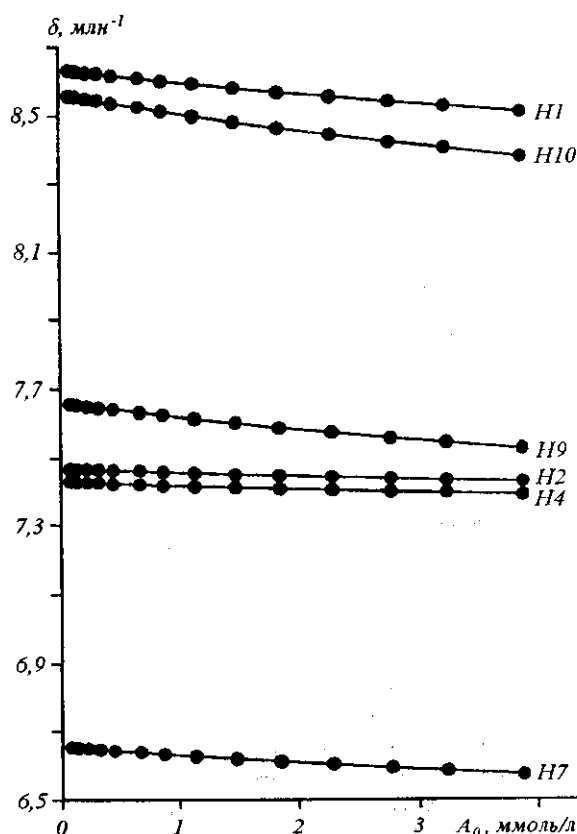
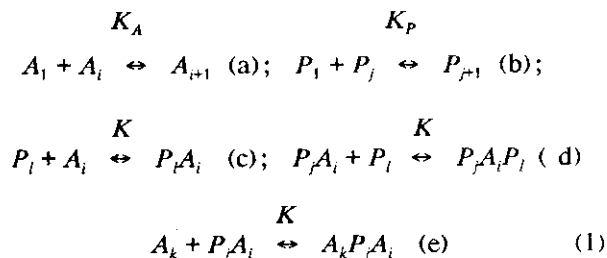


Рис. 2. Экспериментальные зависимости химических сдвигов протонов пропидия (PI) в смешанном с кофеином растворе от концентрации PI при T = 298 К, P₀ = 2,0 ммоль/л

ассоциатов различного типа. При анализе экспериментальных данных использована следующая схема взаимодействия ароматических молекул в растворе:



Константы равновесия для реакций самоассоциации PI (K_A), САФ (K_P) и гетероассоциации молекул (K) полагаются не зависящими от числа молекул в агрегатах и комплексах. В схеме (1) A_i и P_i соответствуют мономерам PI и САФ, A_k, P_j,

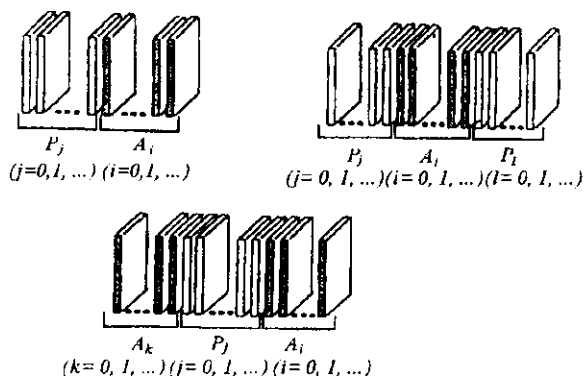


Рис. 3. Схематическое изображение различных гетероассоциатов ароматических молекул кофеина и пропидия в растворе: молекулы САФ и РІ обозначены соответственно *P* и *A*

P_j — самоассоциатам, содержащим i, k мономеров красителя и j, l мономеров САФ соответственно (рис. 3). Поскольку равновесная константа самоассоциации САФ на K_p существенно меньше, чем K_A для РІ, то вероятность образования гетерокомплексов $A_k P_j A_i$, где P_j — ассоциаты фланкированы ассоциатами красителя (A_k и A_i), как показывают расчеты [20], очень мала и, следовательно, реакций (1 е) в этом случае можно пренебречь.

В общем случае бесконечномерной ассоциации молекул, учитывая законы действующих масс для реакций (1), закон сохранения массы, аддитивную модель для наблюдаемого протонного химического сдвига и эффект ближнего порядка на экранирование ядер (только ближайшие соседние молекулы дают вклад в экранирование ядер в стопочном ассоциате), зависимость наблюдаемого химического сдвига протонов РІ от концентрации молекул в смешанном растворе может быть записана в виде [20]:

$$\delta_A = \frac{\alpha_1}{\alpha_0} \left\{ \delta_{mA} \left[2(1 + K_A \alpha_1) - \frac{1}{(1 - K_A \alpha_1)^2} \right] + 2\delta_{dA} \left(\frac{1}{(1 - K_A \alpha_1)^2} - 1 - K_A \alpha_1 \right) + \frac{\delta_{cA} K P_1}{(1 - K_A \alpha_1)^2 (1 - K_p P_1)} \left(1 + \frac{K P_1}{1 - K_p P_1} \right) \right\} \quad (2)$$

и соответствующее выражение для протонов кофеина

$$\delta_P = \frac{P_1}{P_0} \left\{ \delta_{mP} \left[2(1 + K_p P_1) - \frac{1}{(1 - K_p P_1)^2} \right] + 2\delta_{dP} \left(\frac{1}{(1 - K_p P_1)^2} - 1 - K_p P_1 \right) + \frac{\delta_{cP} K \alpha_1}{(1 - K_p P_1)^2 (1 - K_A \alpha_1)} \left(1 + \frac{K P_1}{(1 - K_p P_1)^2} \right) \right\} \quad (3)$$

Здесь $\delta_{mA}, \delta_{dA}, \delta_{cA}$ и $\delta_{mP}, \delta_{dP}, \delta_{cP}$ — протонные химические сдвиги РІ и САФ в мономерной, димерной формах и в гетероассоциатах соответственно. Значения протонных химических сдвигов $\delta_{mA}, \delta_{dA}, \delta_{mP}, \delta_{dP}$ и равновесных констант K_A, K_p для взаимодействующих молекул определены при исследовании самоассоциации молекул в идентичных экспериментальных условиях [20, 21]. Тогда из (2) и (3) следует, что наблюдаемые протонные химические сдвиги молекул РІ и САФ в растворе являются функциями неизвестных δ_c и K , которые можно найти, используя экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов различных протонов ароматических молекул в смешанном растворе (рис. 2). Вычислительная процедура расчета параметров подробно описана в [20, 27]. Полученные в результате расчетов параметры гетероассоциации САФ с РІ при температуре 298 К представлены в табл. 1. Прежде всего следует отметить, что величина константы гетероассоциации САФ и РІ принимает промежуточные значения между равновесными константами самоассоциации САФ и РІ [20, 21]. Вместе с тем равновесная константа гетероассоциации САФ с РІ заметно меньше подобной константы, определенной в [21] для системы ЕВ—САФ. Наблюдаемые различия связаны с характерными особенностями боковых алкильных цепей фенантридинового хромофора красителей РІ и ЕВ и соответственно различной вероятностью образования гетерокомплексов таких молекул по стерическим причинам.

По значениям констант само- и гетероассоциации САФ и РІ было рассчитано относительное содержание молекулярных комплексов в зависимости от концентрации красителя в растворе (рис. 4). Из рис. 4, а, видно, что имеет место значительный рост ассоциатов РІ и соответствующее падение относительного содержания мономеров красителя, в то время как удельный вес гетерокомплексов $P_j A_i$ и $P_j A_i P_l$ очень мало меняется с увеличением концентрации РІ в смешанном растворе. При этом наблюдаются уменьшение относительного содержания мономеров, димеров и n -мерных агрегатов САФ, концентрацию которого поддерживали постоянной в смешанном растворе, и монотонный рост

Таблица 1

Расчетные значения параметров гетероассоциации кофеина и фенантридинового красителя йодистого пропидия в 0,1 М фосфатном буфере (рD 7,1), $P_0 = 2,0$ ммоль/л, $T = 298$ К

Протон PI	δ_c (PI), млн ⁻¹	δ_m (PI), млн ⁻¹	Протон САФ	δ_c (САФ), млн ⁻¹	δ_m (САФ), млн ⁻¹	K_{het} , л/ммоль
$T = 298$ К						
H1	7,70	8,71	H8	7,09	7,89	—
H10	7,21	8,64	7-CH ₃	2,75	3,95	—
H9	6,96	7,70	3-CH ₃	2,35	3,54	28±5
H2	7,03	7,50	1-CH ₃	1,82	3,35	—
H4	6,95	7,45	—	—	—	—
H7	6,15	6,67	—	—	—	—

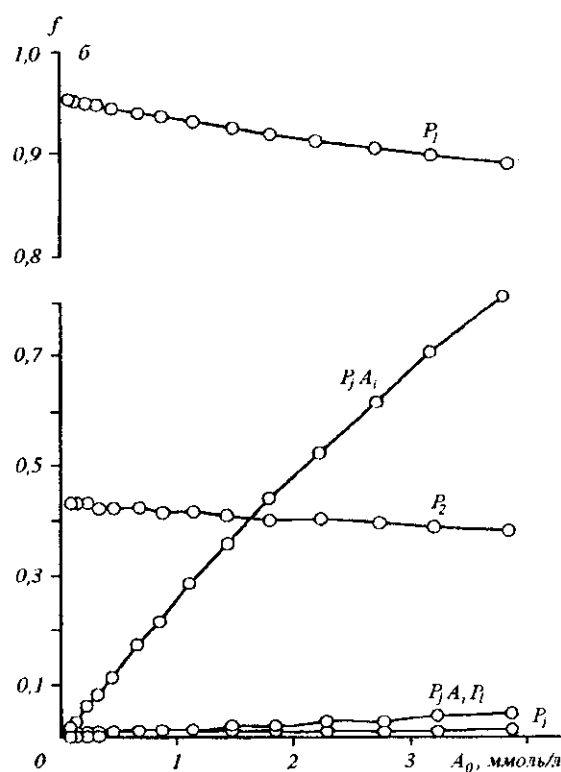
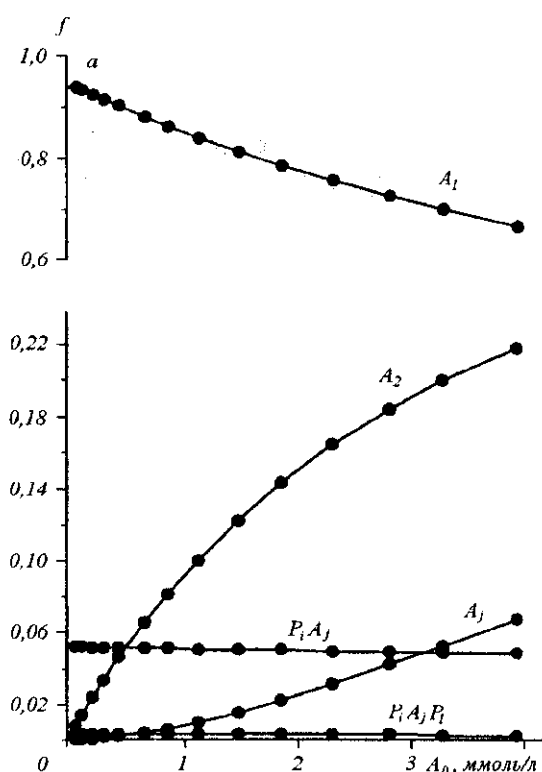


Рис. 4. Относительное содержание самоассоциатов и гетероассоциатов (а — PI, PI + САФ; б — САФ, САФ + PI) в зависимости от концентрации пропидия в смешанном растворе при $P_0 = 2$ ммоль/л, $T = 298$ К

доли гетерокомплексов САФ и PI с возрастанием концентрации красителя в растворе (рис. 4, б).

Структура 1:1 гетероассоциата PI + САФ в водном растворе. Полученные значения химических сдвигов δ_c (табл. 1) для протонов САФ и PI были использованы для расчета наиболее вероят-

ной структуры 1:1 комплекса кофеина с красителем в водном растворе. Взаимное расположение молекул в гетерокомплексе определяли, устанавливая соответствие значений индуцированных протонных химических сдвигов ($\Delta\delta = \delta_m - \delta_c$) теоретическим кривым экранирования, рассчитанным квантоме-

ханически для САФ и РІ [28, 29]. Использование кривых экранирования как для САФ, так и для РІ при построении структуры 1:1 гетероассоциата позволяет существенно повысить точность ее определения в сравнении со структурами димерных комплексов ароматических молекул [26].

На рис. 5 представлена найденная в результате расчетов наиболее вероятная пространственная структура 1:1 гетерокомплекса САФ с РІ в водном растворе. Пространственное изображение гетерокомплекса получено с помощью программы «Mathematica 2.2» (Wolfram Res. Inc.). Плоскости молекул САФ и хромофора РІ в 1:1 гетероассоциате параллельны друг другу и расположены на расстоянии 0,34 нм; в таком комплексе имеет место довольно сильное перекрытие ароматических колец взаимодействующих молекул (стэкинг-взаимодействие), что предполагает существенную роль дисперсионных взаимодействий при образовании гетероассоциата. В силу симметрии кривых экранирования для молекул САФ и РІ [28, 29] с равной вероятностью возможна также структура 1:1 гетерокомплекса, в которой молекула САФ повернута на 180° относительно своей продольной оси. Структура рассчитанного 1:1 комплекса САФ + РІ (рис. 5) несколько отличается от таковой гетерокомплекса для САФ с ЕВ, определенной методом ЯМР-спектроскопии [21], а также теоретически — методом молекулярного моделирования [14]. В частности, в гетерокомплексе САФ с РІ по сравнению с 1:1 САФ + ЕВ комплексом наблюдается относительное смещение плоскостей ароматических молекул по продольной оси хромофора красителя.

Термодинамика гетероассоциации молекул кофеина. Термодинамические параметры ΔS_{het}^0 и ΔH_{het}^0 реакций гетероассоциации САФ и РІ определены на основе экспериментальных температурных зависимостей протонных химических сдвигов молекул с использованием аддитивной модели для наблюдаемого химического сдвига протонов и формализма Вант-Гоффа [6, 26]. На рис. 6 представлены экспериментальные температурные зависимости химических сдвигов δ_i необменивающихся протонов РІ (рис. 6, а) и САФ (рис. 6, б) в смешанном растворе. Качественно сходный характер экспериментальных зависимостей $\delta(T)$ для всех необменивающихся протонов РІ и САФ (рис. 6) позволяет допустить, что экспериментально наблюдаемые изменения химических сдвигов при повышении температуры вызваны в основном смещением молекулярного равновесия в растворе.

При вычислении термодинамических параметров использовали соотношения (2) и (3), в которых влияние температуры на значение $\delta(T)$ определя-

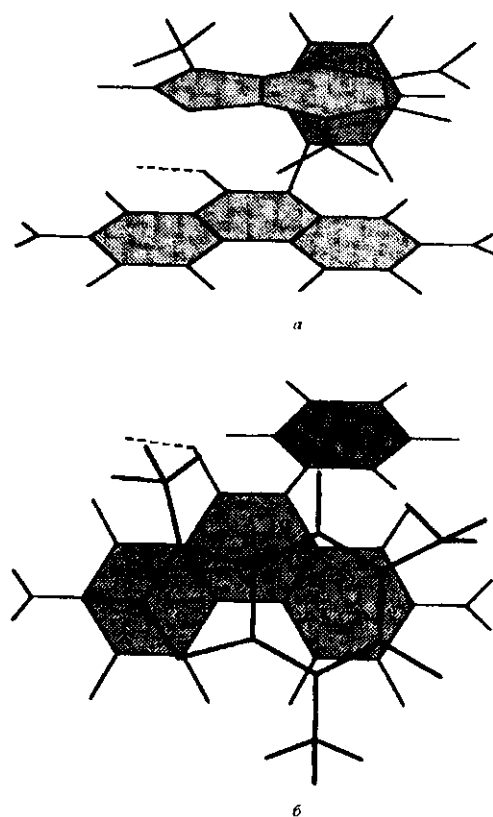


Рис. 5. Расчетная структура 1:1 гетерокомплекса кофеина и йодистого пропилия: а — вид на комплекс сбоку; плоскости молекулы САФ и хромофора красителя заштрихованы; б — вид сверху, показывающий взаимное расположение плоскостей молекулы кофеина и хромофора красителя в гетерокомплексе; боковая алкильная цепь хромофора РІ показана пунктиром

ется температурной зависимостью равновесных констант самоассоциации и гетероассоциации молекул, согласно соотношению

$$K_i(T) = \exp(\Delta S_i^0/R - \Delta H_i^0/RT), \quad (4)$$

в предположении, что величины ΔS_i^0 и ΔH_i^0 не зависят существенным образом от температуры в исследованном диапазоне температур. На рис. 7 приведена зависимость Вант-Гоффа $\ln K = f(1/T)$, по которой определяли термодинамические параметры гетероассоциации молекул РІ и САФ. Для сравнения на этом рисунке приведены также зависимости Вант-Гоффа для реакций самоассоциации САФ и РІ в аналогичных экспериментальных условиях, полученные в работах [20, 21].

На рис. 8 представлены расчетные зависимости

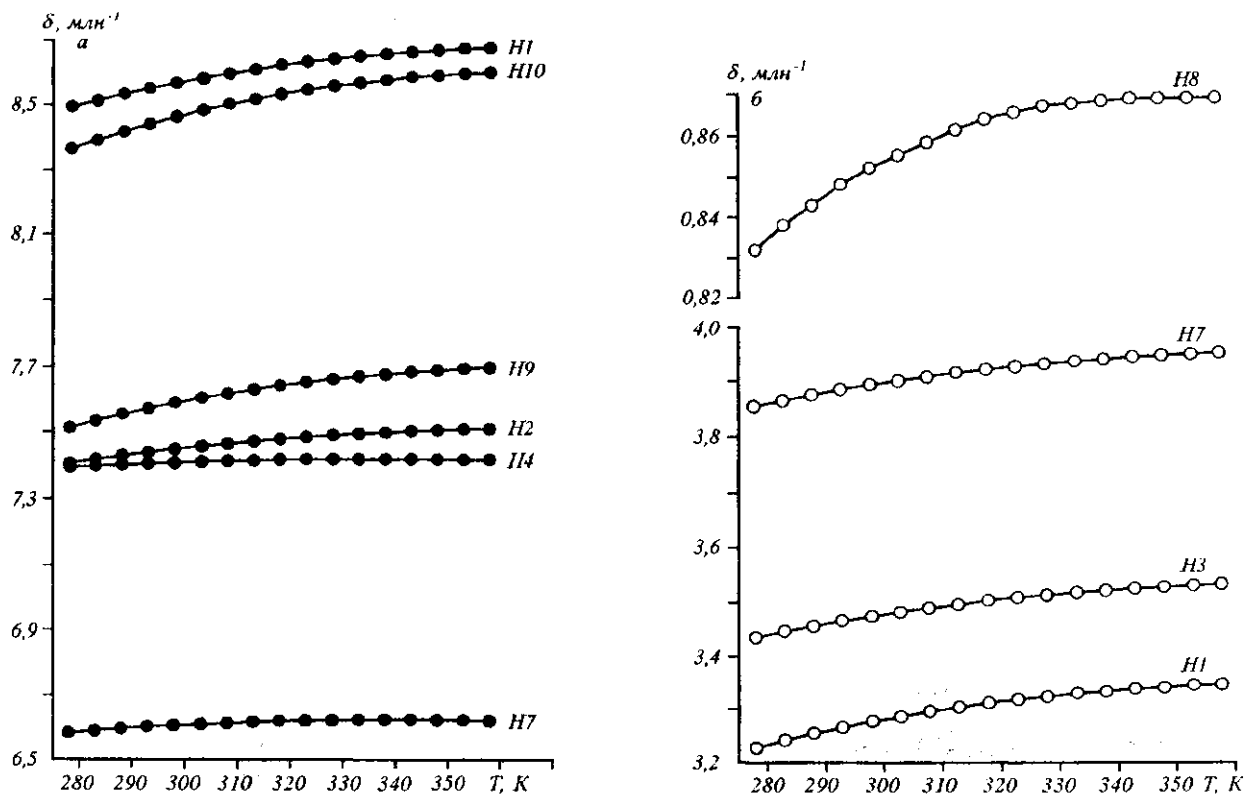


Рис. 6. Экспериментальные зависимости химических сдвигов протонов: а — пропидия (PI) и б — кофеина (CAF) в смешанном растворе при $P_0 = 2,0$ ммоль/л, $A_0 = 1,85$ ммоль/л от температуры

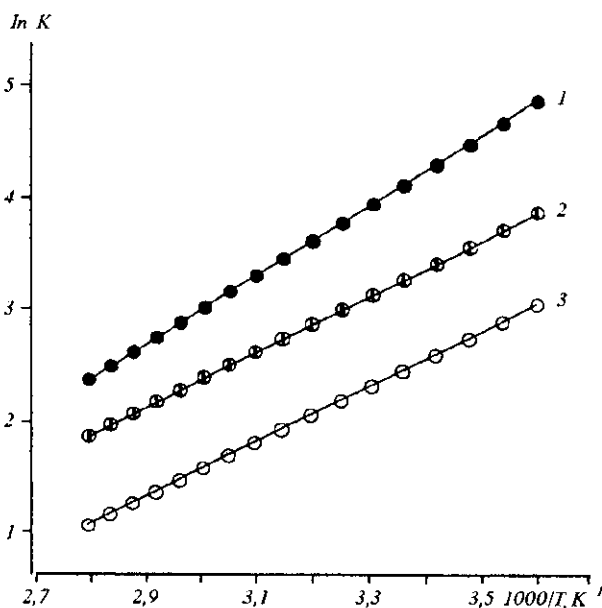


Рис. 7. Зависимость $\ln K$ от $1/T$ для реакций само- и гетероассоциации молекул кофеина и йодистого пропидия: 1 — PI; 2 — PI + CAF; 3 — CAF

относительного содержания различных типов ассоциатов в смешанном растворе от температуры, полученные исходя из определенных значений равновесных констант само- и гетероассоциации молекул при различных температурах. Видно, что при низких температурах ароматические молекулы в основном находятся в ассоциированном состоянии. С повышением температуры содержание всех ассоциатов монотонно уменьшается, что сопровождается увеличением концентрации мономеров CAF и PI в смешанном растворе.

Вклад в общее равновесие в растворе гетероассоциатов $P_f A_i P_l$ существен только при низких температурах, в то время как доля гетерокомплексов $P_f A_i$ остается значительной вплоть до высоких температур (рис. 8). Проведенный анализ позволяет заключить, что относительное содержание различных типов молекулярных ассоциатов существенно зависит как от температуры, так и от соотношения концентраций ароматических молекул в растворе.

Усредненные значения энергии Гиббса, энтальпии и энтропии реакций гетероассоциации PI и CAF для температуры 298 К приведены в табл. 2.

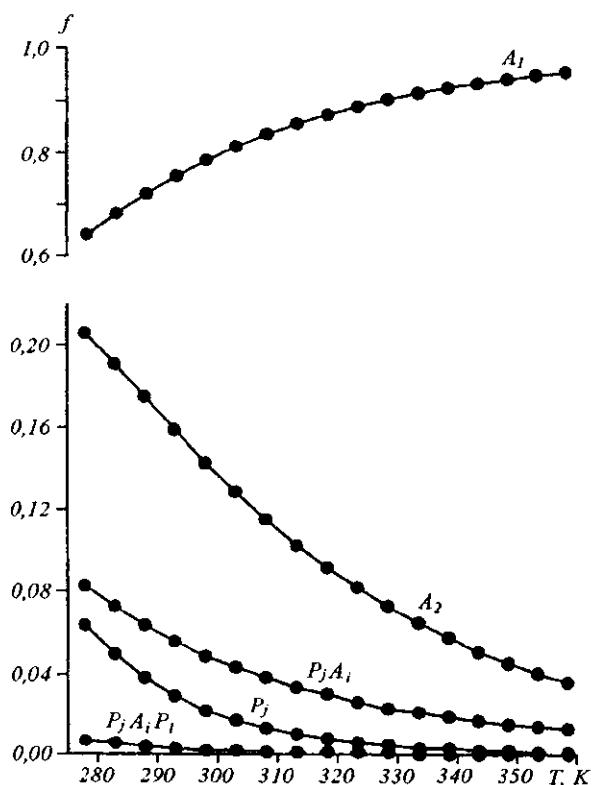


Рис. 8. Относительное содержание самоассоциатов и гетероассоциатов кофеина и пропидия в зависимости от температуры

зывает, что наблюдаемые различия в комплексобразовании этих красителей с САФ, в основном, определяются энтальпийным вкладом. Это, очевидно, связано с наличием дополнительного заряда и более длинной боковой алкильной цепи в молекуле РІ в сравнении с ЕВ, оказывающих влияние на энергетику гетероассоциации красителя с САФ в водном растворе. Известно, что экзотермические реакции характерны для процессов агрегации, включающих в себя стэкинг-взаимодействие в водном растворе ароматических систем с делокализованными π -электронами. Установлено, что дисперсионные взаимодействия характеризуются как отрицательной энтальпией, так и отрицательной энтропией [30]. Учитывая достаточно большие отрицательные значения энтальпии и энтропии реакции гетероассоциации ароматических молекул РІ и САФ (табл. 2), можно заключить, что дисперсионные взаимодействия играют существенную роль при образовании гетерокомплексов этих молекул. Вместе с тем абсолютное значение ΔS_{het}^0 оказывается несколько меньше величин энтропии реакций самоассоциации молекул РІ и САФ в аналогичных условиях растворителя (табл. 2). Положительный энтропийный вклад, прежде всего, определяется гидрофобными взаимодействиями [22]. Можно предположить, что при гетероассоциации молекул

Таблица 2

Термодинамические параметры реакций само- и гетероассоциации кофеина и фенантридинового красителя йодистого пропидия в 0,1 М фосфатном буфере, рD 7,1

Краситель	$-\Delta G_{298}^0$ кДж/моль	$-\Delta H_{298}^0$ кДж/моль	$-\Delta S_{298}^0$ Дж/(моль · К)
<i>Самоассоциация</i>			
САФ*	6,10±0,07	21,0±0,4	49,8±1,1
РІ**	10,3±0,2	26,2±5,5	53,4±16,5
<i>Гетероассоциация</i>			
САФ + РІ	8,3±0,3	21,1±3,6	42,8±12,6

Данные взяты из работ * [21] и ** [20].

Сравнение ΔH_{het}^0 и ΔS_{het}^0 для реакций образования гетерокомплексов САФ с двумя родственными фенантридиновыми красителями РІ и ЕВ [21] пока-

САФ и РІ значительную роль играет гидрофобный эффект, дающий положительный вклад в ΔS_{het}^0 , связанный с взаимодействием метильных групп

кофеїна и бокових цепей красителя (см. структуру 1:1 гетерокомплекса на рис. 5).

Важно отметить, что термодинамические параметры гетероассоциации молекул, определенные с использованием разных аналитических выражений для PI (2) и CAF (3) и различных экспериментальных зависимостей для этих молекул в смешанном растворе (рис. 6), хорошо согласуются друг с другом в пределах погрешности их определения.

Таким образом, проведенный анализ свидетельствует о том, что CAF образует гетерокомплексы с ароматическим красителем PI — типичным интеркалятором ДНК, обладающим мутагенными свойствами. Такие гетерокомплексы стабилизируются главным образом стэкинг-взаимодействием ароматических молекул в водном растворе. Можно предположить, что гетероассоциация молекул CAF и PI приводит к меньшей эффективной концентрации интеркалятора в растворе и соответственно к уменьшению мутагенной активности красителя.

Выражаем благодарность Объединенному исследовательскому центру Лондонского университета за предоставленную возможность в Беркбек колледже использовать для измерений ЯМР-спектрометр 500 МГц.

Д. О. Веселков, В. О. Сигаев, С. О. Висоцький, Л. Н. Димант, Д. Б. Девис, О. Н. Веселков

¹H-ЯМР аналіз гетероасоціації кофеїну з фенантридинієвим барвником йодистим пропідієм у водному розчині

Резюме

Розглянуто молекулярний механізм дії кофеїну (CAF) як комплексоутворювача — інтерцептора ароматичних лігандів, інтеркалюючих у ДНК, на прикладі типового інтеркалятора фенантридинієвого барвника йодистого пропідію (PI). Вивчено процеси гетероасоціації молекул CAF і PI методом одно- та двовимірної ¹H-ЯМР спектроскопії (500 МГц). Виміряно концентраційні (при температурі 298 К) та температурні залежності протонних хімічних зсувів молекул у водному розчині. Визначено рівноважну константу реакції гетероасоціації CAF і PI при T = 298 К (K = 28 ± 5 л/моль), а також значення граничних хімічних зсувів протонів ароматичних лігандів у складі асоціатів. На основі розрахованих значень індукованих протонних хімічних зсувів молекул і квантово-механічних кривих екранування для CAF і PI визначено найвірогіднішу структуру 1:1 гетерокомплексу CAF—PI в розчині. Розраховано термодинамічні параметри утворення гетерокомплексу CAF—PI. Структурний і термодинамічний аналіз свідчить про суттєву роль дисперсійних сил і гідрофобних взаємодій при утворенні гетерокомплексу у водно-сольовому розчині. Здійснено розрахунок відносного вмісту різного типу асоціатів у змішаному розчині, який містить CAF і PI. Виявлено особливості рівноваги гетероасоціатів CAF—PI в розчині в залежності від концентрації і температури. Гетероасоціація молекул CAF і PI призводить до меншої ефективної концентрації інтеркалятора в розчині і відповідно до зниження біологічної активності барвника.

D. A. Veselkov, V. A. Sigaev, S. A. Vysotsky, L. N. Djimant, D. B. Davies, A. N. Veselkov

¹H-NMR analysis of hetero-association of caffeine with phenanthridinium dye propidium iodide in aqueous solution

Summary

Molecular basis of the caffeine (CAF) action as a complex forming agent — interceptor of aromatic drugs intercalating into DNA, using as an example a typical intercalator, a phenanthridinium dye propidium iodide (PI), has been examined. Hetero-association of CAF and PI has been studied by one- and two-dimensional ¹H-NMR spectroscopy (500 MHz). Concentration and temperature dependences of the proton chemical shifts of the molecules in aqueous solution have been measured. The equilibrium reaction constant of the hetero-association of CAF with PI at T = 298 K (K = 28 ± 5 M⁻¹), the limiting chemical shifts of the protons of caffeine in the complexes have been determined. The most favourable structure of 1:1 CAF-PI hetero-complex in aqueous solution has been constructed using the calculated values of the induced proton chemical shifts of the molecules and the quantum-mechanical isoshielding curves for CAF and PI. Thermodynamical parameters of the hetero-complex formation between CAF and PI have been also determined. Structural and thermodynamical analysis has shown that dispersive forces and hydrophobic interactions play the major role in the hetero-association of CAF and PI in aqueous-salt solution. The relative content of different complexes in the mixed solution containing CAF and PI has been calculated and distinctive features of the dynamic equilibrium of the CAF-PI hetero-associates have been revealed as a function of concentration and temperature. It is concluded that hetero-association of CAF and PI molecules leads to lower effective concentration of the dye in solution and respectively to lower biological activity of PI.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Gale E. E., Cundliffe E., Reynolds P. E., Richmond M. N., Waring M. J. The Molecular Basis of Antibiotic Action.—London: John Wiley, 1981.—500 p.
- Neidle S., Pearl L. H., Skelly J. V. DNA structure and perturbation by drug binding // Biochem. J.—1987.—243.—P. 1—13.
- Reinhardt C. G., Krugh T. R. A comparative study of ethidium bromide complexes with dinucleotides and DNA: Direct evidence for intercalation and nucleic acid sequence preferences // Biochemistry.—1978.—17.—P. 4845—4854.
- Feigon J., Leupin W., Denny W. A., Kearns D. R. Binding of ethidium derivatives to natural DNA: a 300 MHz ¹H-NMR study // Nucl. Acids Res.—1981.—10, N 2.—P. 749—761.
- Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N. ¹H-NMR structural analysis of the interaction of proflavine with self-complementary deoxytetranucleotides of different base sequence // Nucleos. and Nucleot.—1994.—13.—P. 637—655.
- Davies D. B., Veselkov A. N. Structural and thermodynamical analysis of molecular complexation by ¹H-NMR spectroscopy // J. Chem. Soc. Faraday Trans.—1996.—92.—P. 3545—3557.
- Davies D. B., Karawajew L., Veselkov A. N. ¹H-NMR structural analysis of ethidium bromide complexation with self-complementary deoxytetranucleotides 5'-d(ApCpGpT), 5'-d(ApGpCpT) and 5'-d(TpGpCpA) in aqueous solution // Biopolymers.—1996.—38.—P. 745—757.
- Машковський М. Д. Лекарственные средства.—М.: Медицина, 1985.—2.—С. 107.
- Selby C. P., Sancar A. Molecular mechanism of DNA repair inhibition by caffeine // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1990.—87.—P. 3522—3525.

10. Fritzsche H., Petri I., Schutz H., Weller K., Sedrema P., Lang H. On the interaction of caffeine with nucleic acids. III. ^1H NMR studies of caffeine — 5'-adenosine monophosphate and caffeine — poly (riboadenylate) interactions // *Biophys. Chem.*—1980.—11.—P. 109—119.
11. Kimura H., Aoyama T. Decrease in sensitivity to ethidium bromide by caffeine, dimethylsulfoxide or 3-aminobenzamide due to reduced permeability // *J. Pharmacobiodyn.*—1989.—12.—P. 589—595.
12. Iliakis G., Nusse M., Ganapathi R., Egner J., Yen A. Differential reduction by caffeine of adriamycin induced cell killing and cell cycle delay in Chinese V79 cells // *Int. J. Radiat. Biol. Phys.*—1986.—12.—P. 1987—1995.
13. Traganos F., Karpuscinski J., Darzynkiewicz Z. Caffeine modulates the effects of DNA-intercalating drug *in vitro*: A flow cytometric and spectrophotometric analysis of caffeine interaction with novatrone, doxorubicin, ellipticine and doxorubicin analogue AD198 // *Cancer Res.*—1991.—51.—P. 3682—3689.
14. Larsen R. W., Jasuja R., Hetzler R., Muraoka P. T., Andrada V. G., Jameson D. M. Spectroscopic and molecular modelling studies of caffeine complexes with DNA intercalators // *Biophys. J.*—1996.—70.—P. 443—452.
15. Karpuscinski J., Kimmel M. Thermodynamical model of mixed aggregation of intercalators with caffeine in aqueous solution // *Biophys. Chem.*—1993.—46.—P. 153—163.
16. Baxter N. J., Williamson M. P., Lilley T. H., Haslam E. Stacking interaction between caffeine and methyl gallate // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1996.—92.—P. 231—234.
17. Aradi F., Foldesi A. Hetero-association of caffeine and theophylline with purine and pyrimidine in aqueous solutions studied by ^1H NMR chemical shifts measurements // *Magn. Res. Chem.*—1989.—27.—P. 249—252.
18. Chen J.-S., Shiao J.-Ch. Graphic method for determination of the complex NMR shift and equilibrium constant for a hetero-association accompanying a self-association // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1994.—90.—P. 429—433.
19. Weller K., Schutz H., Petri I. Thermodynamical model of indefinite mixed association of two components and NMR data analysis for caffeine-AMP interaction // *Biophys. Chem.*—1984.—19.—P. 289—298.
20. Davies D. B., Veselkov D. A., Veselkov A. N. Structure and thermodynamics of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution determined by NMR spectroscopy // *Mol. Phys.*—1999.—97, N 3.—P. 439—451.
21. Веселков Д. А., Дэвис Д. Б., Дымант Л. Н., Веселков А. Н. Молекулярный механизм протекторного действия кофеина при комплексобразовании интеркалирующего лиганда с ДНК // *Молекуляр. биология* (в печати)
22. Hopkins H. P., Fumero J., Wilson W. D. Temperature dependence of enthalpy changes for ethidium and propidium binding to DNA: effect of alkylamine chains // *Biopolymers.*—1990.—29.—P. 449—459.
23. Marky L. A., Macgregor R. B. Hydration of dA·dT polymers: Role of water in the thermodynamics of ethidium and propidium intercalation // *Biochemistry.*—1990.—29.—P. 4805—4811.
24. Lilley T. H., Linsdell H., Maestre A. Association of caffeine in water and aqueous solutions of sucrose // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1992.—88.—P. 2865—2870.
25. Patel D. J., Canuel L. L. NMR investigations of complex formation between phenanthridinium dyes and deoxyguanosine 5'-monophosphate in aqueous solution // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74.—P. 5207—5211.
26. Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N. ^1H NMR investigation of self-association of aromatic drug molecules in aqueous solution: structural and thermodynamical analysis // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1996.—92, N 3.—P. 383—390.
27. Veselkov A. N., Djimant L. N., Karawajew L., Kulikov E. L. Investigation of the aggregation of acridine dyes in aqueous solution by proton NMR // *Stud. biophys.*—1985.—106.—P. 171—180.
28. Kan L.-S., Borer P. N., Cheng D. M., Ts'o P. O. P. ^1H - and ^{13}C -NMR studies on caffeine and its interaction with nucleic acids // *Biopolymers.*—1980.—19.—P. 1641—1654.
29. Giessner-Prettre C., Pullman B. Quantum mechanical calculations of NMR chemical shifts in nucleic acids // *Quart. Rev. Biophys.*—1987.—20.—P. 113—172.
30. Ross R. D., Subramanian S. Thermodynamics of protein association reaction: forces contributing to stability // *Biochemistry.*—1981.—20.—P. 3096—3102.

УДК 541.49+539.1.12.43
Поступила в редакцию 21.12.98