



УДК 577.182.54.013

**ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ  
ПРИРОДНЫХ АНТРАЦИКЛИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ  
НА ИХ ОТНОСИТЕЛЬНУЮ ГИДРОФОБНОСТЬ**

*Баранов Е. П., Брикентейн В. X., Заславский Б. Ю.,  
Карасик Г. В., Михеева Л. М., Овчинников А. А.,  
Шамоковский И. Л.*

*Институт химической физики Академии наук СССР, Москва*

Оцениваются степени гидрофобности трех антрациклиновых антибиотиков: адриамицина, рубомицина и карминомицина. Величины относительной гидрофобности соединений определяются методами распределения их в двух существенно различных двухфазных системах: водно-органической и водной полимерной. Качественно результаты, полученные с использованием двух систем, имеют сходный характер, но находятся в противоречии с теорией аддитивности инкрементов в общей гидрофобности вещества. Проведен теоретический конформационный анализ соединений, рассчитаны величины энергий гидратации и моментов бифильности. Результаты расчетов сравниваются с полученными экспериментальными данными.

Природные антрациклиновые антибиотики и их производные широко используются в медицинской практике в качестве противоопухолевых препаратов [1]. Мишенью действия этих соединений на клеточном уровне является ДНК, связывание с которой приводит к подавлению синтеза нуклеиновых кислот в микробных и опухолевых клетках [2, 3]. Результаты исследований широкого круга С9-аналогов карминомицина и рубомицина [4, 5] показали, что равновесные и кинетические характеристики взаимодействия этих веществ с ДНК практически не различаются у веществ с различной биологической активностью. Это послужило основанием для гипотезы [4] о том, что биологическая активность этих антибиотиков зависит от особенностей их взаимодействий с клеточными мембранами и, в частности, от их способности к трансмембранному переносу. О сложном характере взаимодействий веществ антрациклинового ряда с биологическими мембранами свидетельствуют литературные данные об изменениях поверхностных свойств мембран опухолевых клеток [6, 7], эритроцитов [8, 9] и модельных фосфолипидных мембран [8, 10] под действием этих антибиотиков.

Как известно, одной из важнейших физико-химических характеристик веществ, определяющих их биологическую активность, и в частности способность к трансмембранному переносу, является относительная гидрофобность [11]. В современной фармакологической литературе [11–13] считается, что относительная гидрофобность веществ является основным параметром, регулирующим их распределение по структурам биологической системы.

Опубликованные в литературе количественные оценки относительной гидрофобности соединений антрациклинового ряда неоднозначны и носят противоречивый характер [14–16].

В настоящей работе исследована относительная гидрофобность трех природных антрациклиновых антибиотиков: рубомицина (I), карминомицина (II) и адриамицина (III) (рис. 1) — методами распределения в водно-органической двухфазной системе *n*-октанол — вода [12] и в водной полимерной двухфазной системе фиколл — декстран [17, 18]. Для анализа влияния молекулярной структуры антибиотиков на их относительную гидрофобность проведен теоретический конформационный анализ.

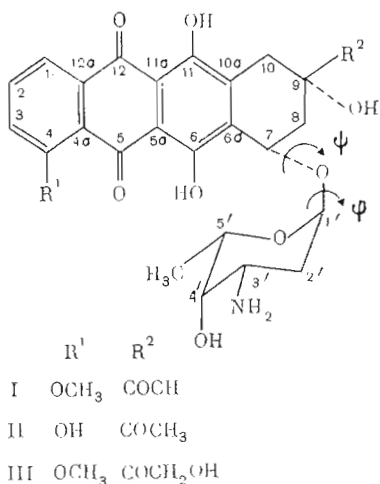


Рис. 1

Рис. 1. Структурная формула антрациклиновых антибиотиков

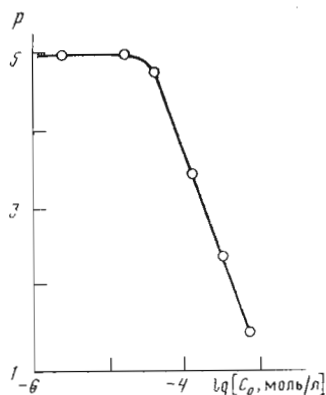


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость коэффициента распределения рубомицина от его концентрации в системе буфер — *n*-октанол

*Экспериментальное определение относительной гидрофобности.* Относительная гидрофобность вещества является характеристикой относительной интенсивности взаимодействия вещества с водной средой [19]. Для количественной оценки этой характеристики в литературе [20] часто используют величину изменения свободной энергии при переносе вещества из воды в органический растворитель. Для определения этой величины широко применяется метод распределения веществ в двухфазных водно-органических системах и в качестве меры относительной гидрофобности обычно используют значение логарифма коэффициента распределения вещества в системе [11–13]. По определению, коэффициент распределения вещества в водно-органической системе равен:

$$P = C_{\text{орг}} / C_{\text{водн}}, \quad (1)$$

где  $C_{\text{орг}}$  и  $C_{\text{водн}}$  — равновесные концентрации распределяемого вещества в органической и водной фазах системы. Следует отметить, что при определении величины  $P$  необходимо учитывать возможность образования агрегатов распределяемого вещества, а также его способность ионизоваться.

Результаты измерений по распределению рубомицина (I) в двухфазной системе *n*-октанол — фосфатный буфер (рН 7,4) свидетельствуют (рис. 2), что коэффициент распределения рубомицина постоянен при концентрации антибиотика не более  $2 \cdot 10^{-5}$  моль/л. Дальнейшее увеличение концентрации сопровождается уменьшением величины  $P$ . Аналогичные зависимости были получены нами и для антибиотиков (II) и (III). Наблюдаемая концентрационная зависимость коэффициентов распределения исследуемых соединений обусловлена их димеризацией ( $K_{\text{димер}} = 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  [5, 21]). Димеризация антрациклиновых антибиотиков происходит путем межшлюкостного взаимодействия агликонов, результатом которого является уменьшение числа контактов наиболее гидрофобных фрагментов молекулы антибиотика с растворителем. Это объясняет наблюдаемое в эксперименте уменьшение относительной гидрофобности димеров по сравнению с мономерами.

Полученные данные позволяют объяснить сравнительно низкие значения коэффициентов распределения природных антрациклиновых антибиотиков, полученные в работе [16], в которой автор исследовал распределение антибиотиков в системе *n*-октанол — фосфатный буфер, рН 7,2, при концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  моль/л, т. е. в условиях димеризации. Нам в качестве рабочих условий дальнейшего эксперимента использовался интервал концентраций антибиотика в системе  $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$  моль/л, в кото-

Коэффициенты распределения ( $P$ ) и относительная гидрофобность антрациклиновых антибиотиков (I)–(III), выраженная в эквивалентном числе  $\text{CH}_2$ -групп ( $n_{\text{CH}_2}$ ) в водно-органической системе  $n$ -октанол – фосфатный буфер (А) и в водной двухфазной системе фиколл – декстран (Б)

Антибиотик	$R^1$	$R^2$	А		Б	
			$P$	$n_{\text{CH}_2}$	$P$	$n_{\text{CH}_2}$
Рубомицин (I)	–OCH <sub>3</sub>	–COCH <sub>3</sub>	4,92±0,25	1,58±0,05	1,48±0,05	20,1±1,7
Карминомицин (II)	–OH	–COCH <sub>3</sub>	22,5±1,2	3,09±0,05	1,77±0,05	29,3±1,5
Адриамицин (III)	–OCH <sub>3</sub>	–COCH <sub>2</sub> OH	0,78±0,04	–0,25±0,05	1,37±0,04	16,1±1,5

ром величина коэффициента распределения вещества не зависит от его концентрации в системе (см. рис. 2). Это позволяет отнести полученные данные к мономерной форме исследуемых соединений.

Из-за низкого оптического поглощения растворов исследуемых антибиотиков при концентрациях менее  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л для определения концентрации распределяемого вещества в фазах водно-органической системы измеряли интенсивность его флуоресценции в этих фазах:

$$I_{\text{фл}} = \alpha \cdot C,$$

где  $C$  — концентрация вещества в фазе,  $\alpha$  — коэффициент пропорциональности. Интенсивность флуоресценции антрациклинов заметно увеличивается при замене водной среды на среду органического растворителя, вероятно, из-за влияния полярности растворителя на квантовый выход флуоресценции вещества. Очевидные различия в значениях коэффициентов  $\alpha$  в водной и органической фазах системы и невозможность экспериментального определения этих значений с достаточной точностью не позволяют определить коэффициенты распределения антибиотиков в системе как соотношение интенсивностей флуоресценции распределяемого вещества в фазах системы. Поэтому коэффициенты распределения исследуемых соединений в двухфазной системе  $n$ -октанол – фосфатный буфер определяли из расчета уравнения материального баланса для распределяемого вещества (см. ниже). Найденные значения коэффициентов распределения антибиотиков  $P$  приведены в табл. 1.

Представленные в табл. 1 данные показывают, что относительная гидрофобность исследуемых антибиотиков уменьшается в ряду: II > I > III. В качественном отношении полученные данные совпадают с результатами Кесселя [16], полученными при концентрациях антибиотиков  $2 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Расхождения наших данных с данными, опубликованными в работах [14, 15], могут объясняться различиями в экспериментальных условиях, например природой органического растворителя, используемого для образования водно-органической двухфазной системы.

Необходимо также отметить, что полученные нами данные (а также данные работы [16]) противоречат результатам расчетов относительной гидрофобности веществ с использованием табличных значений инкрементов гидрофобности заместителей [11–13]. Расчеты относительной гидрофобности веществ основываются на принципе аддитивности вкладов различных заместителей в величину  $\ln P$ . Согласно этому принципу и известным табличным значениям инкрементов гидрофобности различных заместителей [12, 13], наибольшей относительной гидрофобностью в ряду исследуемых соединений должен характеризоваться рубомицин (I). Согласно данным [12], введение в алкильную цепь этого соединения гидроксильной группы должно снижать  $\ln P$  на 1,16 логарифмических единиц. Наблюдаемый нами эффект при переходе от рубомицина (I) к адриамицину (III) качественно согласуется с указанными представлениями [12], но в количественном отношении эффект введения OH-группы оказывается на 30% меньше ожидаемого. Замена  $\text{CH}_2\text{O}$ -группировки в ароматическом кольце молекулы рубомицина (I) на OH-группу в карминомици-

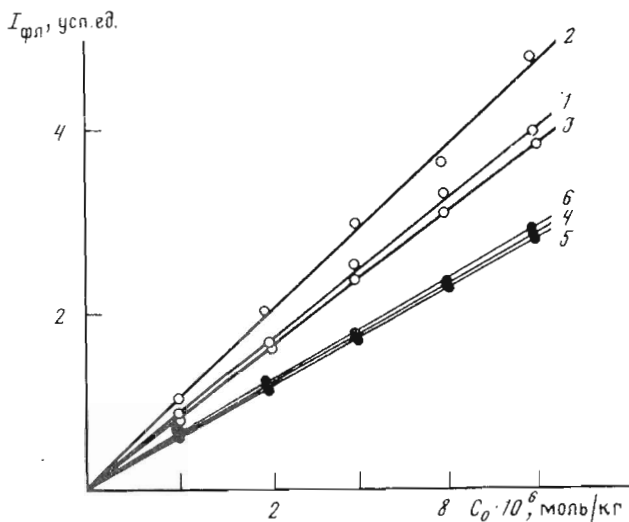


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции рубомицина (1, 4), карминомицина (2, 5) и адриамицина (3, 6) в верхней фазе, обогащенной фикоаллом (темные кружки), и в нижней фазе, обогащенной декстраном (светлые кружки), от их исходной концентрации в системе фикоалл — декстран

не (II), согласно рассматриваемой концепции [42], должна приводить к значительному уменьшению относительной гидрофобности вещества, а в действительности (см. табл. 1) в результате этой замены относительная гидрофобность антибиотика существенно увеличивается.

Рассматриваемые данные представляют собой один из типичных примеров отклонения от принципа аддитивности инкрементов гидрофобности заместителей для конформационно-подвижных веществ [22–24]. В данном случае на основании результатов анализа спектров флуоресценции антибиотиков в водной среде и в среде органического растворителя можно предполагать, что сольватационные взаимодействия веществ, существенно различающиеся в фазах водно-органической системы, влияют на получаемые оценки относительной гидрофобности [25, 26]. Следовательно, для оценки относительной гидрофобности антрациклиновых антибиотиков необходимо использовать двухфазные системы, не содержащие органического растворителя, т. е. водные полимерные двухфазные системы.

Водные двухфазные системы, образуемые фикоаллом и декстраном, широко используются для количественной оценки относительной гидрофобности природных и синтетических органических соединений [27, 28]. Распределение веществ в таких двухфазных системах происходит между двумя сосуществующими фазами, свойства водной среды в которых различаются из-за разницы в структуре и/или термодинамическом состоянии воды в этих фазах [29].

Результаты распределения антрациклиновых антибиотиков в водной двухфазной системе фикоалл — декстран при pH 7,4 представлены на рис. 3 и в табл. 1. Экспериментально подтверждено, что присутствие фазообразующих полимеров не влияет на спектральные характеристики антибиотиков, и поэтому коэффициент распределения вещества в системе определяли как отношение интенсивностей флуоресценции вещества в фазах системы (см. ниже) при концентрации антибиотика в интервале  $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л (см. рис. 3).

Данные, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о качественном соответствии коэффициентов распределения соединений для двух систем. Для сопоставления результатов распределения веществ в разных двухфазных системах необходимо рассчитать приведенные значения оценок относительной гидрофобности, в качестве которых успешно используются так называемые эквивалентные числа метиленовых групп  $n_{CH_2}$ :

$$n_{CH_2} = \ln P / \pi_{CH_2}, \quad (2)$$

где  $P$  — коэффициент распределения вещества в двухфазной системе;  $\pi_{\text{CH}_2}$  — инкремент  $\text{CH}_2$ -группы в величину  $\ln P$ . Величину  $\pi_{\text{CH}_2}$ , служащую характеристикой разницы в относительной гидрофобности фаз данной двухфазной системы, определяют из результатов анализа зависимости коэффициентов распределения гомологического ряда веществ с разной длиной алифатической цепи от длины цепи [30]. Для используемой в настоящей работе водно-органической системы  $n$ -октанол — фосфатный буфер величина  $\pi_{\text{CH}_2}$  составляет 0,438 логарифмической единицы [12], а для водной двухфазной системы фиколл — декстран — 0,0085 логарифмической единицы [30].

Полученные оценки относительной гидрофобности исследуемых антибиотиков (табл. 1) свидетельствуют о том, что при использовании водной полимерной двухфазной системы обнаруживаются более тонкие различия в особенностях взаимодействий веществ с водной средой, чем при использовании водно-органической двухфазной системы. Причины этого были подробно рассмотрены ранее [31]. Таким образом, сольватационные эффекты не могут объяснить наблюдаемые различия в относительной гидрофобности веществ (I) — (III). Эти различия могут быть следствием различий в конформации молекул (I) — (III) и различий в степени их ионизации в используемых экспериментальных условиях (рН 7,4).

Анализ рН-зависимости интенсивности флуоресценции антибиотиков (I) и (II) в водном растворе в интервале рН от 3 до 9 (см. рис. 4) (вид спектров при этом не меняется) показывает, что ионизационная способность этих соединений различается мало (уменьшение интенсивности флуоресценции при рН > 8 связано с ионизацией гидроксильных групп в 6-м и 11-м положениях агликона с  $pK \geq 9$  [21]).

В литературе высказывалось предположение [16], что при замене метоксильной группы на гидроксильную образуется внутримолекулярная водородная связь, это может привести к увеличению относительной гидрофобности соединений на  $1,2\pi_{\text{CH}_2}$ . Для анализа возможных различий в конформациях антибиотиков (I) и (II) был проведен теоретический конформационный анализ молекул этих соединений.

Теоретический конформационный анализ проводился в попарно-аддитивном приближении. Энергия конформаций представлялась в виде

$$E = E_{\gamma} + E_{\tau} + E_{\text{нв}} + E_{\text{г}} + E_{\text{вс}}, \quad (3)$$

где  $E_{\gamma}$ ,  $E_{\tau}$ ,  $E_{\text{нв}}$  — угловая, торсионная и невалентная составляющие потенциальной энергии,  $E_{\text{г}}$  — свободная энергия гидратации,  $E_{\text{вс}}$  — энергия внутримолекулярных водородных связей. Функциональный вид и параметры потенциальных функций, определяющих вклады  $E_{\gamma}$ ,  $E_{\tau}$  и  $E_{\text{нв}}$ , приведены в работе [32]. Величина  $E_{\text{г}}$ , являющаяся характеристикой гидрофобности молекулы, вычислялась в рамках модели первой гидратной оболочки, предложенной в работах [33, 34]. Энергия водородной связи  $\text{O}_i\text{—H}\dots\text{O}_j$  рассчитывалась по уравнению

$$E_{\text{вс}} = a(z^{-12} - 2z^{-6}), \quad (4)$$

где  $a$  — величина, зависящая от угла  $\alpha$  между связями  $\text{O}_i\text{—H}$  и  $\text{H—O}_j$ ;  $z = d/d_0$ ,  $d$  — длина водородной связи,  $d_0$  (1,8 Å) — оптимальная длина водородной связи. Пары атомов, образующие водородную связь, исключались из рассмотрения при расчете энергии невалентного взаимодействия. Величина  $a$  уменьшалась от 3,85 до 2,85 ккал/моль при изменении угла  $\alpha$  от 180 до 160°. При этом максимальная энергия внутримолекулярной водородной связи с учетом эффекта гидратации донора и акцептора оказывалась равной 1 ккал/моль, что соответствует экспериментальной оценке [35]. Все расчеты проводились в приближении фиксированных длин связей, которые для сопряженного фрагмента молекул определялись методом Хюккеля с использованием соотношения «длина связи — порядок связи».

Перед расчетом геометрии гликозидов было необходимо определить систему водородных связей молекул. В работах [36, 37] высказывались аргументы в пользу существования водородных связей в аналогичных системах типа агликон—агликон: O11—H...O12; O6—H...O5 и O4—H....

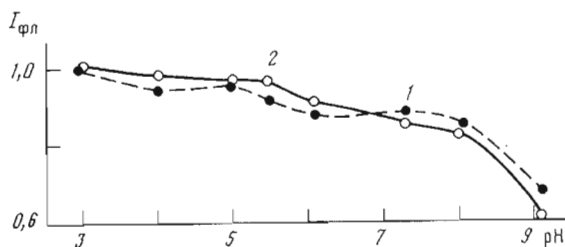


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции от pH среды для рибомицина (1) и карминомицина (2),  $C_0 = 10^{-6}$  М

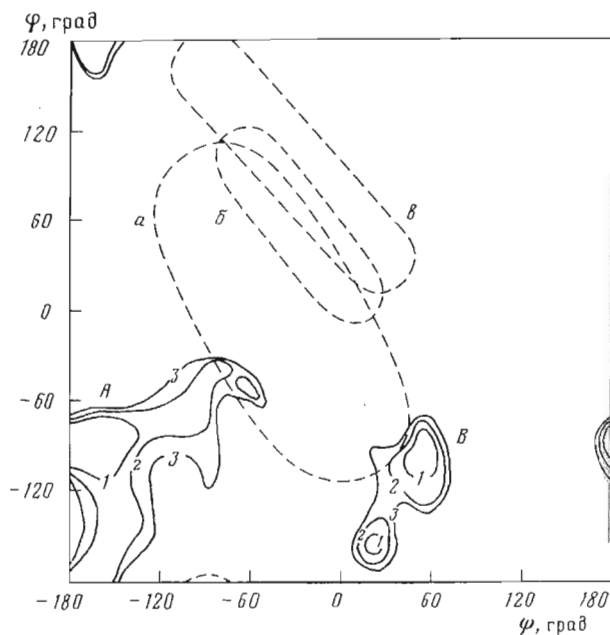


Рис. 5. Конформационная карта гликозидов (I) и (II). Эквивалентные линии отвечают энергиям, равным 1, 2 и 3 ккал/моль. Углы  $\psi$  ( $C6\sigma-C7-O7-C1'$ );  $\phi$  ( $C7-O7-C1'-O5'$ ). Штриховыми линиями изображены маршруты изменения конформаций аминосахара при сохранении водородной связи агликон-сахар: *a* -  $O6 \dots O5'$ ; *б* -  $O5 \dots O4'$ ; *в* -  $O5 \dots N3'$

...O5. Кроме того, представляло интерес проанализировать возможности образования водородных связей агликон-сахар.

Как известно, гликозиды характеризуются высокой конформационной лабильностью благодаря возможности относительно свободного вращения вокруг одинарных гликозидных связей. При изменении соответствующих торсионных углов  $\psi$  и  $\phi$  данных молекул изменяется относительное расположение аминосахара и агликона. Требовалось определить такие относительные конформации агликона и моносахаридного остатка, в которых атомы кислорода донора и акцептора расположены на расстоянии, необходимом для образования водородной связи ( $\sim 2,8$  Å). Для этого были рассчитаны конформационные карты варьированием углов  $\psi$  и  $\phi$  с шагом  $10^\circ$ . При этом конформационная энергия вычислялась по уравнению (3) без учета вклада  $E_{вс}$ . Предварительно было рассчитано пространственное строение изолированных молекул моносахарида в конформации 1C и агликона, которое в процессе построения конформационных карт сохранялось неизменным.

Конформационные карты молекул антибиотиков (I) и (II) оказались весьма близкими, причем существуют две области допустимых конформаций (A и B) (см. рис. 5) аминосахарного остатка относительно агликона. На карту нанесены маршруты изменения углов  $\psi$  и  $\phi$ , при которых расстояние между атомами кислорода агликона и сахарного остатка равно

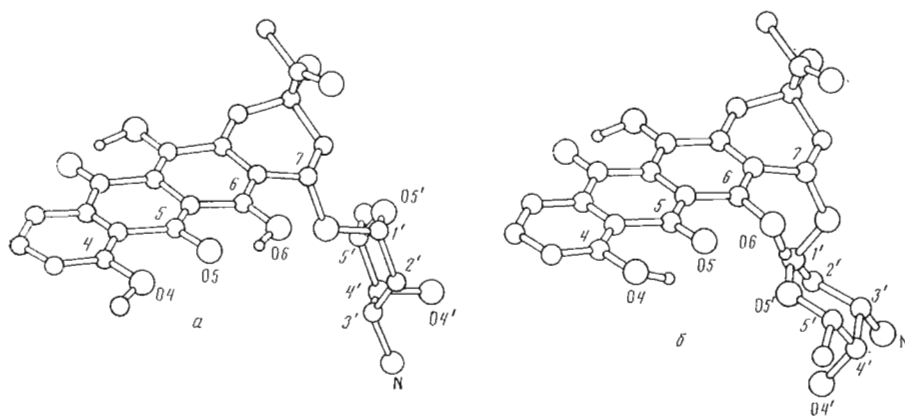


Рис. 6. Изображение предпочтительной конформации молекулы (I) (а) и (II) (б)

2,8 Å. Оказалось, что энергетически допустимые области пересекают лишь маршрут (а), соответствующий водородной связи O6-H...O5'. Таким образом, в изучаемых молекулах возможна только одна водородная связь агликон—сахар, причем при двух их различных взаимных ориентациях. Ниже приведены системы возможных водородных связей в гликозидах (I) и (II).

Рубомицин (I)

O11-H...O12  
O6-H...O5  
O6-H...O5'

Карминомицин (II)

O11-H...O12  
O6-H...O5  
O6-H...O5'  
O4-H...O5

В обеих молекулах имеет место конкуренция двух альтернативных водородных связей O6-H...O5 и O6-H...O5'. Дополнительная водородная связь O4-H...O5 в молекуле антибиотика (II), вероятно, сдвигает равновесие в сторону образования связи O6-H...O5', поскольку это уменьшает протонакцепторную способность атома O5.

Достоверно оценить энергетику систем водородных связей с учетом эффекта гидратации анализируемых соединений в пределах эмпирического силового поля, по-видимому, невозможно. Мы предполагаем, что благодаря изменению заместителя R<sup>1</sup> происходит «переключение» водородной связи группы O6-H из положения агликон—сахар для молекулы (II) в положение агликон—агликон для молекулы (I). За счет такого эффекта конформационная лабильность моносахаридного остатка в соединении (II) должна быть значительно уменьшена.

Исходя из этой предпосылки был проведен расчет предпочтительных конформаций молекул антибиотиков (I) и (II) путем минимизации энергии по уравнению (3) в пространстве независимых геометрических параметров. Для каждой молекулы оптимизировались все валентные и двугранные углы, определяющие геометрию ее неводородного скелета, и торсионные углы, характеризующие ориентацию метильных и гидроксильных групп. Оказалось, что предпочтительная конформация молекулы (II) с водородной связью агликон—сахар расположена в области В (энергия конформации, расположенной в области А, выше более чем на 2 ккал/моль), а предпочтительная конформация молекулы (I) с водородной связью агликон—агликон — в области А.

Эти конформации рассматриваемых гликозидов представлены на рис. 6. Для таких конформаций молекул (I) и (II) были рассчитаны свободная энергия гидратации ( $E_r$ ) и момент бифильности ( $\vec{M}_b$ ) при использовании модельных потенциалов первой гидратной оболочки. В соответствии с работой [38] момент бифильности определяли по формуле

$$\vec{M}_b = \sum_{i=1}^m \vec{r}_i \delta_i \epsilon_i, \quad (5)$$

Рассчитанные величины энергии гидратации ( $E_r$ ) и момента бифильности ( $M_b$ ) для рубомицина (I) и карминомицина (II)

Функциональная структура	I		II	
	$E_r$ , ккал/моль	$M_b$ , ккал·Å/моль	$E_r$ , ккал/моль	$M_b$ , ккал·Å/моль
Агликоп	-10,8	8,8	-13,0	4,2
Гликозид	-13,3	7,3	-14,9	2,9

где  $\vec{r}_i$  — радиус-вектор, характеризующий положение  $i$ -го элементарного фрагмента молекулы;  $\delta_i$  — доступность  $i$ -го фрагмента молекулы для молекул воды ( $0 \leq \delta_i \leq 1$ );  $\varepsilon_i$  — нормированная энергия гидратации  $i$ -го фрагмента молекулы. Нормировка величин  $\varepsilon_i$  проводилась для обеспечения трансляционной и вращательной инвариантности вектора  $\vec{M}_b$ , т. е. с целью выполнить условие

$$\sum_{i=1}^m \delta_i \varepsilon_i = 0. \quad (6)$$

Нормировка проводилась по уравнению

$$\varepsilon_i = \varepsilon_i^0 - \frac{\sum_{i=1}^m \varepsilon_i^0 \delta_i}{\sum \delta_i}, \quad (7)$$

где  $\varepsilon_i^0$  — энергия гидратации  $i$ -го фрагмента молекулы, приведенная в работе [34]. Разбиение молекул на элементарные фрагменты и определение величины  $\delta_i$  проводилось в соответствии с принципами, описанными в работе [34].

Вектор  $\vec{M}_b$  направлен от гидрофильной к гидрофобной части молекулы, а его длина характеризует степень неравномерности распределения гидрофобных и гидрофильных групп по молекуле, не завися при этом от гидрофобности молекулы в целом. Степень влияния гидратационных свойств каждого элементарного фрагмента молекулы на направление и длину вектора  $\vec{M}_b$  пропорциональна доступности этого фрагмента для молекул воды. Недоступные для растворителя фрагменты не влияют на вектор  $\vec{M}_b$  вне зависимости от их гидратационных свойств. Эта особенность момента бифильности по сравнению с дипольным моментом позволяет рассматривать обсуждаемый параметр в качестве характеристики бифильности молекулы.

В табл. 2 представлена энергия гидратации и величина момента бифильности для антибиотиков (I), (II) и их агликопов.

Сравнение приведенных в табл. 2 величин энергии гидратации  $E_r$  свидетельствует о том, что в рамках рассмотренной выше модели «переключения» водородной связи и эмпирического силового поля не удается объяснить наблюдаемую в эксперименте большую относительную гидрофобность гликозида (II) по сравнению с гликозидом (I). Сопоставление величин разницы  $E_r$  гликозида и соответствующего агликона показывает, однако, что моносахаридный остаток в молекуле (II) более гидрофобен, чем в молекуле (I). Это различие обусловлено лишь изменением доступности атомов гликозидов для молекул воды при конформационной перестройке. Кроме того, гликозид (II) характеризуется значительно большей симметрией расположения гидрофобных и гидрофильных групп, чем молекула гликозида (I). Возможно, это обстоятельство обуславливает его высокое относительное сродство к неполярной среде.

Существенным недостатком аддитивной модели первой гидратной оболочки [34] является то, что она не учитывает особенности структуры воды вблизи различных функциональных групп в конкретной молекуле. В рассматриваемом случае замена гидроксильной группы в гликозиде на мето-



ксильную, по-видимому, приводит не только к изменению конформации и увеличению полярности молекулы антибиотика, но и к изменению структуры воды в гидратной оболочке молекулы, что является фактором уменьшения относительной гидрофобности молекулы.

Влияние конформации на относительную гидрофобность полисахаридов обсуждалось в работе [39]. По-видимому, аналогичное влияние характерно и для углеводных компонентов гликозидов, причем для лекарственных гликозидов оно может быть фактором регуляции переноса гликозидов между различными мембранными структурами в биологических системах.

Приведенные в настоящей работе результаты дают возможность сделать по крайней мере два важных заключения. Во-первых, наблюдаемые в эксперименте различия в относительной гидрофобности рубомицина, карминомицина и адриамицина в совокупности с данными по их взаимодействию с ДНК позволяют найти объяснения фактам о различном их фармакологическом действии. Так, например, известно [40], что при пероральном приеме карминомицин хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта, в то время как рубомицин и адриамицин почти не всасываются. Кроме того, полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что причиной разного действия антибиотиков является их различная способность проникать через цитоплазматическую мембрану, и служат основой для постановки прямых экспериментов по исследованию кинетики трансмембранного переноса в нормальных и опухолевых клетках. Во-вторых, получившая развитие в настоящей работе на основе представлений [38] концепция о существенном влиянии относительного пространственного распределения гидрофильных и гидрофобных групп молекулы (ее бифильности) может служить основой для объяснения многих известных из литературы случаев невыполнения принципа аддитивности вкладов различных заместителей в относительную гидрофобность молекулы.

### Экспериментальная часть

В работе были использованы фикола-400 (партия № НИ 26371; Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), декстран-70 (препарат «Полиглюкин», партия № 680480, отечественного производства;  $M_w=5.7 \cdot 10^4$ ,  $M_n=2.8 \cdot 10^4$ ); неорганические соли NaCl,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  аналитической степени чистоты (Merck, ФРГ); NaOH,  $H_2PO_4$ , квалификация х.ч. *n*-Октапол-1 квалификации ч. использовали без дополнительной очистки.

Все растворы готовили в бидистиллированной воде.

Исследуемые антибиотики рубомицин, карминомицин и адриамицин получены из ВНИИ по изысканию новых антибиотиков АМН СССР.

При отборе и разведении проб использовали калибровочные автоматические пипетки Gilson (Франция) и прибор для автоматического отбора и разведения проб Diluter (ЛКВ, Швеция). Точность воспроизведения объема составила  $\approx 1\%$ .

Поглощение растворов определяли на спектрофотометре Duospac-203 (Франция) с разрешением 2,5 нм. Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре Jobin-Yvon-3 (Франция) с разрешением 5 нм.

Водно-органическую систему образовывали смешением равных объемов буферно-солевого раствора, содержащего 0,15 M NaCl и 0,01 M Na-фосфатный буфер, pH 7,4, и *n*-октанола при 23° С. Анализируемое вещество вводили в систему либо как раствор в воде (буфере), либо как раствор в *n*-октаноле, насыщенном указанным буфером. Систему тщательно перемешивали до насыщения фаз и затем центрифугировали 20 мин при 4400 *g* для расслоения фаз системы. После этого фазы разделяли и анализировали. Параллельно анализируемое вещество в том же количестве растворялось в буферно-солевом растворе – контрольном – объемом  $V_k$ , эквивалентном объему воды в двухфазной системе.

В состав двухфазной водной полимерной системы входили следующие компоненты: фикола-400 (13,5% по весу), декстран-70 (11,6%), NaCl (0,15 моль/кг), Na-фосфатный буфер, pH 7,4 (0,01 моль/кг). Каждая из фаз этой системы обогащена одним из полимеров и содержит 75% (по весу) воды. Состав фаз был следующим: верхняя фаза – 7,6 и 16,9%, нижняя фаза – 21,4 и 4,6% фикола и декстрана соответственно.

Для получения двухфазной системы в тарированную пробирку вносили рассчитанное количество растворов полимеров по весу (с точностью до 0,01 г), добавляли необходимое количество буфера, соли, воды и раствора анализируемого вещества в буферно-солевом растворе таким образом, чтобы конечная концентрация всех компонентов системы соответствовала заданной. Содержимое пробирки перемешивали и систему помещали в термостат на 24 ч при 23° С для установления равновесия и расслоения фаз. После этого системы разделяли, из каждой фазы

отбирали аликвоты и после соответствующего разведения определяли в них концентрацию распределяемого вещества.

Поведение изучаемых веществ в двухфазных системах характеризовали коэффициентом распределения. В случае водно-органической системы коэффициент распределения ( $P$ ) определялся как отношение концентрации вещества в фазе  $n$ -октанола к концентрации вещества в воде, а для водной полимерной системы — как отношение концентраций в фазе, обогащенной фиколом, к концентрации в фазе, обогащенной декстраном.

Концентрацию исследуемых соединений определяли флуоресцентным методом, возбуждая светом с  $\lambda_{ex}$  475 нм и регистрируя на  $\lambda_{em}$  550 нм — соответственно в максимумах поглощения и флуоресценции антибиотиков. Для пересчета измеряемых величин в единицы концентрации использовали калибровочные графики, полученные в среде анализируемой фазы.

Определение концентрации анализируемого вещества в фазах двухфазной системы проводили не менее чем на 2–3 параллельных образцах, используя 4–6 точек по концентрационной зависимости. Опыт по распределению одного соединения воспроизводили не менее 2 раз, отклонение от средней величины коэффициента распределения, рассчитанного таким образом, не превышало 3–5%. Для распределяемых соединений анализировали материальный баланс вещества в системе по уравнению

$$G_{\Sigma} = G_v + G_n = C_v V_v + C_n V_n,$$

где  $G_{\Sigma}$  — анализируемое в системе количество вещества,  $C$  — объемно-весовая концентрация вещества,  $V$  — объем; индексы «v» и «n» обозначают верхнюю и нижнюю фазы соответственно.

Для определения объемов фаз двухфазные системы готовили в пробирках, калиброванных по воде при  $25,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$ .

Анализ материального баланса показал, что разница между количеством анализируемого вещества, введенным в систему ( $G_0$ ) и рассчитанным по вышеприведенному уравнению ( $G_{\Sigma}$ ), для исследуемых соединений не превышала 5%:

$$\Delta = \frac{G_{\Sigma} - G_0}{G_0} \cdot 100\%.$$

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Блохин П. Н., Переводчикова Н. И. Химиотерапия опухолевых заболеваний. М.: Медицина, 1984. С. 108–124.
2. Calendi E., Di Marco A., Reggiani M., Scaprinato B., Valentini L. // Biochim. et biophys. acta. 1965. V. 103. № 1. P. 25–40.
3. Дудник Ю. В., Останина Л. Н., Козьян Л. И., Гаузе Г. Г. // Антибиотики. 1974. Т. 19. № 6. С. 514–517.
4. Дудник Ю. В. Исследование механизмов действия противоопухолевых антибиотиков: Автореф. дис. д-ра биол. наук. М.: ВНИИ по изысканию новых антибиотиков АМН СССР, 1979. 42 с.
5. Баранов Е. П., Брикентштейн В. Х., Дмитриевская Т. В., Баренбойм Г. М. // Антибиотики. 1984. Т. 29. № 3. С. 208–214.
6. Kessel D. // Molecular Pharmacology. 1979. V. 16. № 4. P. 306–312.
7. Murphree S. A., Cunningham L. S., Hwang K. M., Sartorelli A. C. // Biochem. Pharmacol. 1976. V. 25. № 6. P. 1227–1231.
8. Goldman R., Faccinetta T., Bach D., Raz A., Shinitzky M. // Biochim. et biophys. acta. 1978. V. 512. № 2. P. 254–264.
9. DeLoach J. R., Droleskey R. // J. Appl. Biochem. 1985. V. 7. № 4. P. 332–340.
10. Tritton T. R., Murphree S. A., Sartorelli A. C. // Biochem. Pharmacol. 1977. V. 26. № 11. P. 2319–2323.
11. Hansch C. // Correlation analysis in chemistry/Eds Chapman N. B., Shorter J. N. Y.: Plenum Press, 1978. P. 397–438.
12. Leo A., Hansch C., Elkins D. // Chemical Reviews. 1971. V. 71. № 6. P. 525–616.
13. Rekker R. F. // The hydrophobic fragmental constant. Its derivation and application. A means characterizing membrane systems. Amsterdam, 1977. 389 p.
14. Shwartz H. S., Kanter P. M. // Cancer Treatment Reports. 1979. V. 63. № 5. P. 821–825.
15. Fink S. I., Leo A., Yamakawa M., Hansch C., Quinn F. R. // Farmaco. Ed. sci. 1980. V. 35. № 5. P. 965.
16. Kessel D. // Biochem. Pharmacology. 1979. V. 28. № 16. P. 3028–3030.
17. Zaslavsky B. Yu., Miheeva L. M., Rogozhin S. V. // Biochim. et biophys. acta. 1978. V. 510. № 1. P. 160–167.
18. Zaslavsky B. Yu., Miheeva L. M., Rogozhin S. V. // J. Chromatogr. 1981. V. 216. № 1. P. 103–113.
19. Ребиндер П. А. // Краткая химическая энциклопедия. М.: Советская энцикл., 1961. Т. 1. С. 937–938.
20. Tanford C. // The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. N. Y.: Wiley-Interscience, 1973. P. 4–11.
21. Arcamone F. // Doxorubicin. V. 17/Ed. Harcourt B. I. N. Y.: Acad. Press, 1981. P. 103–112.
22. Canas-Rodriguez D., Tute M. S. // Biological correlation — The Hansch Approach Adv. Chem. Ser., № 114. J. Amer. Chem. Soc. 1972. P. 41–50.

23. Chion C. T., Block J. H., Manes M. // J. Pharm. Sci. 1982. V. 71. № 11. P. 1307-1309.
24. Draffehn J., Shonecker B., Ponsold K. // J. Chromatogr. 1981. V. 216. № 1. P. 63-68.
25. Amidou G. L., Yalkowsky S. H., Anik S. T., Valvani S. C. // J. Phys. Chem. 1975. V. 79. № 21. P. 2239-2246.
26. Davis S. S., Higuchi T., Rytting J. H. // J. Pharm. and Pharmacol. 1972. V. 24. Suppl. P. 30P-46P.
27. Zaslavsky B. Yu., Mestechkina N. M., Miheeva L. M., Rogozhin S. V., Bakalkin G. Y., Rjazhsky G. G., Chetverina E. V., Asmuko A. A., Besspalova J. D., Korobov N. V., Chichenkov O. N. // Biochem. Pharmacology. 1982. V. 31. № 23. P. 3757-3762.
28. Zaslavsky B. Yu., Mestechkina N. M., Miheeva L. M., Rogozhin S. V. // J. Chromatogr. 1982. V. 240. № 1. P. 21-28.
29. Zaslavsky B. Yu., Mestechkina N. M., Miheeva L. M., Rogozhin S. V. // J. Chromatogr. 1983. V. 256. № 1. P. 49-59.
30. Zaslavsky B. Yu., Mestechkina N. M., Miheeva L. M., Rogozhin S. V. // J. Chromatogr. 1982. V. 253. № 2. P. 139-148.
31. Zaslavsky B. Yu., Miheeva L. M., Rogozhin S. V. // J. Chromatogr. 1981. V. 216. № 1. P. 103-113.
32. Шамовский И. Л., Баренбойм Г. М., Овчинников А. А. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1677-1690.
33. Hopfinger A. J. Conformational properties of macromolecules. N. Y.-L.: Acad. Press, 1973. 339 p.
34. Hodes Z. I., Nemethy G., Sheraga H. A. // Biopolymers. 1979. V. 18. № 7. P. 1565-1610.
35. Klotz I. M., Franzen J. S. // J. Amer. Chem. Soc. 1962. V. 84. № 18. P. 3461-3466.
36. Бушелев С. Н., Сибельдина Л. А. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 5. С. 702-706.
37. Гаспилович Е. А., Люшин А. Н., Рябой В. М. // Журн. физ. химии. 1980. Т. 54. № 10. С. 2446-2450.
38. Массова И. А., Овчинников А. А., Шамовский И. Л., Камерницкий А. В., Решетова П. Г., Мирсалихова Н. М. // Элементарные процессы в химически реагирующих средах/Ред. Михайлов В. В. М.: Изд-во МФТИ, 1985. С. 17-21.
39. Rees D. A. // Biochemistry. Ser. 1. V. 5. Biochemistry of Carbohydrates. London: Butterworths, University Park Press, 1975. P. 1-42.
40. Химиотерапия злокачественных опухолей/Ред. Блохин Н. П. М.: Изд-во АМН СССР, 1977. С. 137.

Поступила в редакцию  
4.II.1987  
После доработки  
24.III.1987

#### INFLUENCE OF THE MOLECULAR STRUCTURE OF NATURAL ANTHRACYCLINE ANTIBIOTICS ON THEIR RELATIVE HYDROPHOBICITY

BARANOV E. P., BRIKENSHTEIN V. Kh., ZASLAVSKY B. Yu., KARASYK G. V.,  
MIHEEVA L. M., OVCHINNIKOV A. A., SHAMOVSKY I. I.

*Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

Relative hydrophobicities of anthracycline antibiotics, adriamycin, rubomycin and carminomycin, have been measured by the two-phase distribution method. Two different biphasic systems were used for this purpose. Possible reasons of discrepancies between results obtained and other authors, data are discussed. It was established that the relative hydrophobicities of the compounds investigated contradict the theory of increment additivity. The results are compared with quantum-chemical calculations.