



УДК 541.49+539.1.12.43

## СТРУКТУРНЫЙ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕТЕРОАССОЦИИ МОЛЕКУЛ НОВАТРОНА И ФЛАВИНМОНОНУКЛЕОТИДА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ <sup>1</sup>H-ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

© 2005 г. А. Н. Веселков\*, М. П. Евстигнеев\*\*#, А. О. Розвадовская\*,  
Ю. В. Мухина\*, Д. Б. Дэвис\*\*

\*Севастопольский национальный технический университет,  
99053, Севастополь, Стрелецкая балка, Украина;

\*\*Беркбек колледж Лондонского университета, факультет биологических и химических наук,  
Лондон, Великобритания

Поступила в редакцию 08.12.2004 г. Принята к печати 28.03.2005 г.

Методом одномерной и двумерной <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии (500 МГц) исследована гетероассоциация противоопухолевого антибиотика новатрона (NOV) с флавиномононуклеотидом (FMN) в водном растворе с целью установления молекулярного механизма возможного комбинированного действия антибиотика и FMN. Определены равновесные константы реакций, индуцированные протонные химические сдвиги, термодинамические параметры ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ) гетероассоциации взаимодействующих ароматических молекул исходя из концентрационных и температурных зависимостей химических сдвигов их протонов. Методом молекулярной механики с использованием программы X-PLOR и результатов анализа индуцированных химических сдвигов протонов молекул определена наиболее вероятная пространственная структура гетерокомплекса FMN–NOV (1 : 1). Анализ полученных результатов свидетельствует об образовании гетерокомплекса за счет стэкинг-взаимодействий между ароматическими хромофорами с возможной дополнительной стабилизацией с помощью межмолекулярных водородных связей. Сделан вывод, что ароматические молекулы витаминов, в частности рибофлавина, могут образовывать энергетически прочные гетероассоциаты с противоопухолевыми антибиотиками в водном растворе и, тем самым, возможно, оказывать влияние на эффективность их медико-биологического действия.

*Ключевые слова:* антиопухолевый антибиотик, новатрон; флавиномононуклеотид, гетероассоциация; ЯМР-спектроскопия.

### ВВЕДЕНИЕ

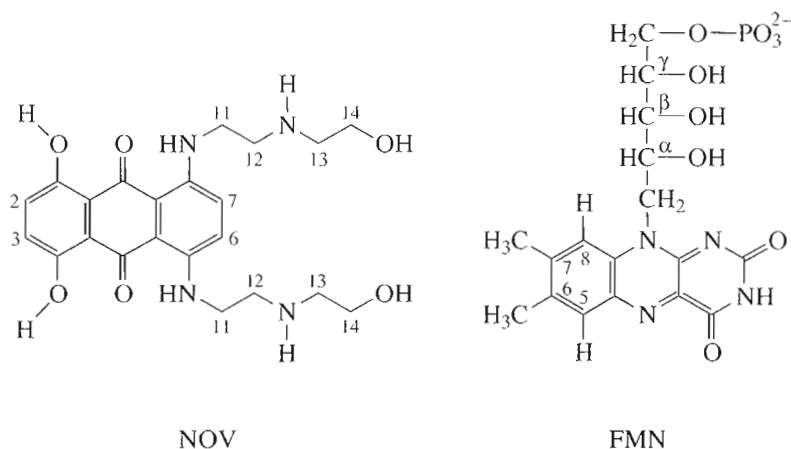
Результаты многочисленных исследований, проведенных к настоящему времени, указывают на существенное влияние процесса гетероассоциации ароматических биологически активных соединений (БАС) на эффективность их комплексообразования с ДНК и на их медико-биологическую активность [1–4].

Антибиотик митоксантрон, или новатрон (NOV), используется в клинической практике как эффективное средство при лечении рака молочной железы, лейкемии и лимфолейкоза [5]. Считается, что фармакологическое действие новатрона связано с его интеркаляцией в ДНК и ингибированием синтеза ДНК и РНК [5–7]. Однако новатрон не проявляет явной сиквенс-специфичности

при комплексообразовании с молекулой ДНК [6, 8, 9]. Новатрон обладает меньшей, чем антрациклиновые антибиотики, в частности дауномицин и доксорубицин, противоопухолевой активностью, но его побочные эффекты кардиотоксичности по сравнению с антрациклинами существенно снижены [10]. Вместе с тем отмечается эффективность применения новатрона в клинической практике в комбинации с другими противоопухолевыми антибиотиками, такими, как блеомицин, доксорубицин и др. [11]. Вопросы комбинации ароматических антибиотиков, а также их взаимодействия с ароматическими БАС – витаминами, молекулами из пищевых источников (полифенолы, метилксантины), имеют важное значение для анализа эффективности действия антибиотиков [1, 4, 11, 12]. Исследования гетероассоциации ароматических молекул (антибиотиков и БАС) позволяют получить информацию о природе физико-химических взаимодействий, влияющих на средство ароматических молекул в растворе, которые

Сокращения: БАС – биологически активное соединение; NOV – новатрон; FMN – флавиномононуклеотид.

# Автор для переписки (тел.: 38-(0692) 235-251; эл. почта: max\_evstigneev@mail.ru).



обусловлены структурными особенностями как их хромофоров, так и боковых цепей [4].

В настоящей работе методом 1D- и 2D-<sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии (500 МГц) исследована гетероассоциация антиопухолевого антибиотика новатрона и флавиномононуклеотида (FMN), аналога малорастворимого в воде соединения рибофлавина (витамина В<sub>2</sub>), с целью выяснения молекулярного механизма взаимного влияния ароматических БАС на эффективность их медико-биологического действия.

Для анализа процессов гетероассоциации флавиномононуклеотида с новатроном в водном растворе использована методика, аналогичная примененной ранее [4, 13] для изучения ассоциации ароматических веществ. Эта методика основана на анализе концентрационных и температурных зависимостей химических сдвигов протонов молекул с использованием строгой статистической термодинамической модели [14, 15], учитывающей образование агрегатов различной размерности в ходе как самоассоциации, так и гетероассоциации молекул. Данная методика позволяет определить структурные и термодинамические характеристики гетероассоциации молекул. Двумерные спектры гомоядерной корреляционной <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии (2D-TOCSY и 2D-ROESY) использованы для отнесения сигналов необменивающихся протонов FMN и NOV и для анализа взаимного расположения исследуемых молекул в ассоциатах. Самоассоциация NOV и FMN была исследована ранее методом 1D- и 2D-<sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии в аналогичных экспериментальных условиях [13, 16].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ 2D-ROESY-спектров (рис. 1) показал, что в смешанных растворах FMN-NOV наблюдаются кросс-пикки между протонами H<sub>2</sub>/H<sub>3</sub> NOV и 6-CH<sub>3</sub>/7-CH<sub>3</sub> FMN, которые при условии проведе-

ния эксперимента с малыми временами смешивания, исключаяющими влияние эффектов диффузии намагниченности, следует отнести к межмолекулярным протонным взаимодействиям молекул исследуемых соединений в гетерокомплексе состава 1 : 1. Полученные экспериментальные результаты позволяют сделать предположение о такой пространственной структуре гетерокомплекса FMN-NOV, в которой ароматическое кольцо хромофора флавиномононуклеотида, содержащее метильные группы в положениях 6 и 7, находится над кольцом хромофора новатрона, где расположены протоны H<sub>2</sub>/H<sub>3</sub>.

Структурные и термодинамические параметры гетероассоциатов NOV и FMN, как и для рассмотренных ранее молекулярных систем [4, 13], определяли путем анализа зависимостей химических сдвигов сигналов необменивающихся протонов (пронумерованы на формулах) обоих ароматических соединений в смешанных растворах от концентрации (рис. 2а) и температуры (рис. 2б). Обращает на себя внимание необычная форма концентрационных кривых δ(С) с выраженными максимумами для всех необменивающихся протонов FMN и протонов H<sub>6</sub>/H<sub>7</sub> NOV. Вместе с тем, зависимость химических сдвигов сигналов протонов H<sub>2</sub>/H<sub>3</sub> NOV от концентрации имеет обычный вид, наблюдаемый в гетеросистемах, исследованных ранее [4, 13–16], т.е. характеризуется монотонным смещением δ(С) в область сильного поля с увеличением концентрации. Естественно предположить, что наличие максимума на концентрационных кривых связано с конкурентным влиянием различного экранирования протонов в гетеро- и самоассоциатах. Качественно подобная картина имела место и при комплексообразовании новатрона с дезокситетрануклеотидом d(TrGpCpA) в водном растворе [9].

Для анализа экспериментальных концентрационных и температурных зависимостей протонных химических сдвигов (рис. 2), как и ранее, использовалась статистико-термодинамическая мо-

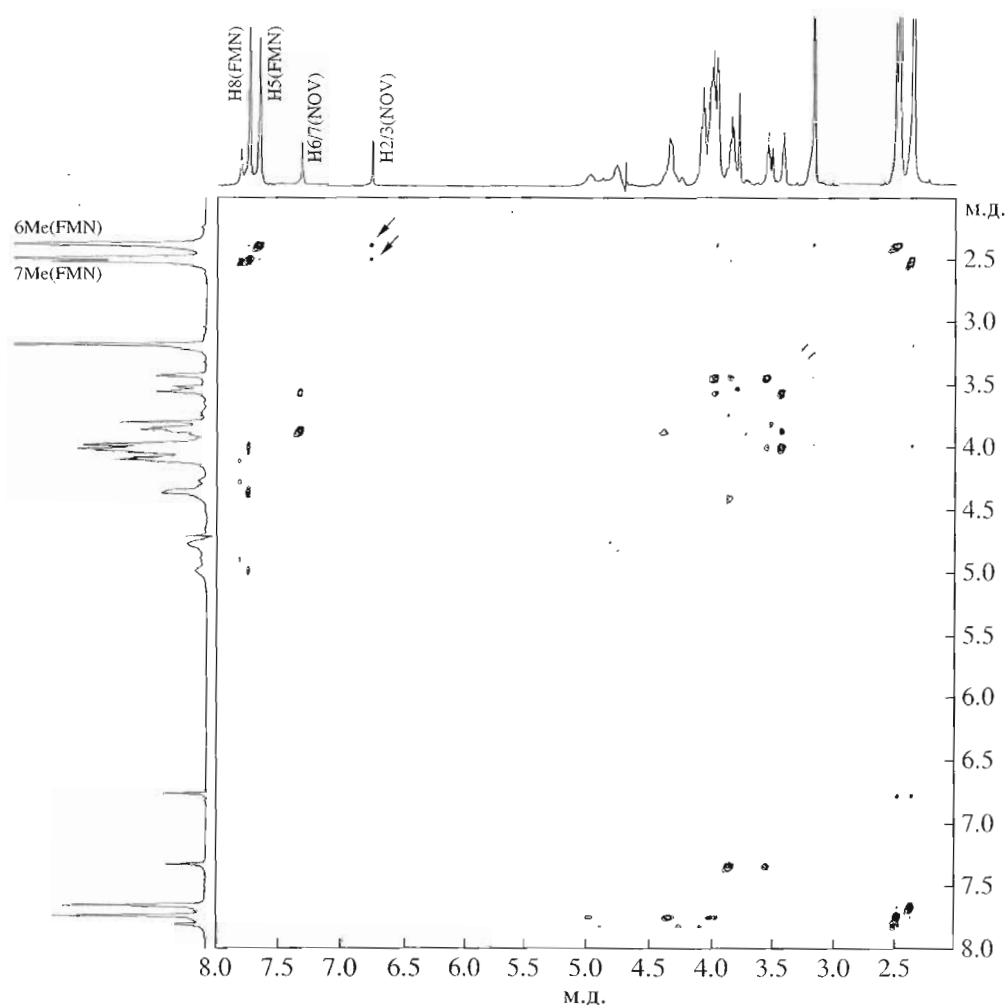
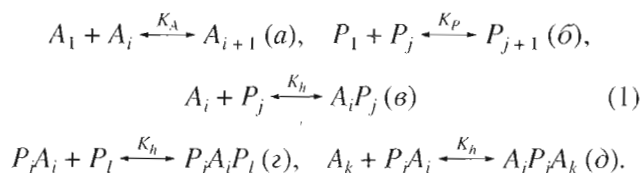


Рис. 1. Двумерный ROESY-спектр смешанного раствора NOV–FMN ( $C_{\text{NOV}} = 0.6$  мМ,  $C_{\text{FMN}} = 3$  мМ,  $T 303$  К) с указанием межмолекулярных контактов.

дель гетероассоциации молекул [14, 15], в которой предполагается динамическое равновесие взаимодействующих молекул, учитывающая образование бесконечномерных самоассоциатов, а также гетероассоциатов различного типа. При анализе экспериментальных данных использована следующая схема взаимодействия молекул в растворе:



Константы равновесия для реакций самоассоциации FMN ( $K_A$ ), новатрона ( $K_P$ ) и гетероассоциации молекул ( $K_h$ ) полагаются не зависящими от числа молекул в агрегатах и комплексах. В схеме (1)  $A_1$  и  $P_1$  соответствуют мономерам FMN и NOV,  $A_i, A_k, P_j, P_l$  – самоассоциатам, содержащим  $i, k$  молекул флавиномононуклеотида и  $j, l$  молекул новатрона соответственно.

В такой модели зависимость наблюдаемого химического сдвига протонов флавиномононуклеотида от концентрации молекул в смешанном растворе может быть записана в виде [14, 15]:

$$\begin{aligned}
 \delta_A = & \frac{a_1}{a_0} \left[ \delta_{mA} \left( 2(1 + K_A a_1) - \frac{1}{(1 - K_A a_1)^2} \right) + \right. \\
 & + 2\delta_{dA} \left( \frac{1}{(1 - K_A a_1)^2} - 1 - K_A a_1 \right) + \\
 & + \delta_{hA} \frac{K_h p_1}{(1 - K_A a_1)^2 (1 - K_P p_1)} \times \\
 & \left. \times \left( 1 + \frac{K_h p_1}{2(1 - K_P p_1)} + \frac{K_h a_1}{1 - K_A a_1} \right) \right].
 \end{aligned} \quad (2)$$

В силу симметрии схемы (1) по отношению к взаимодействующим ароматическим соединениям  $A$  и  $P$  в растворе соответствующее выражение для химического сдвига протонов новатрона  $\delta_P$

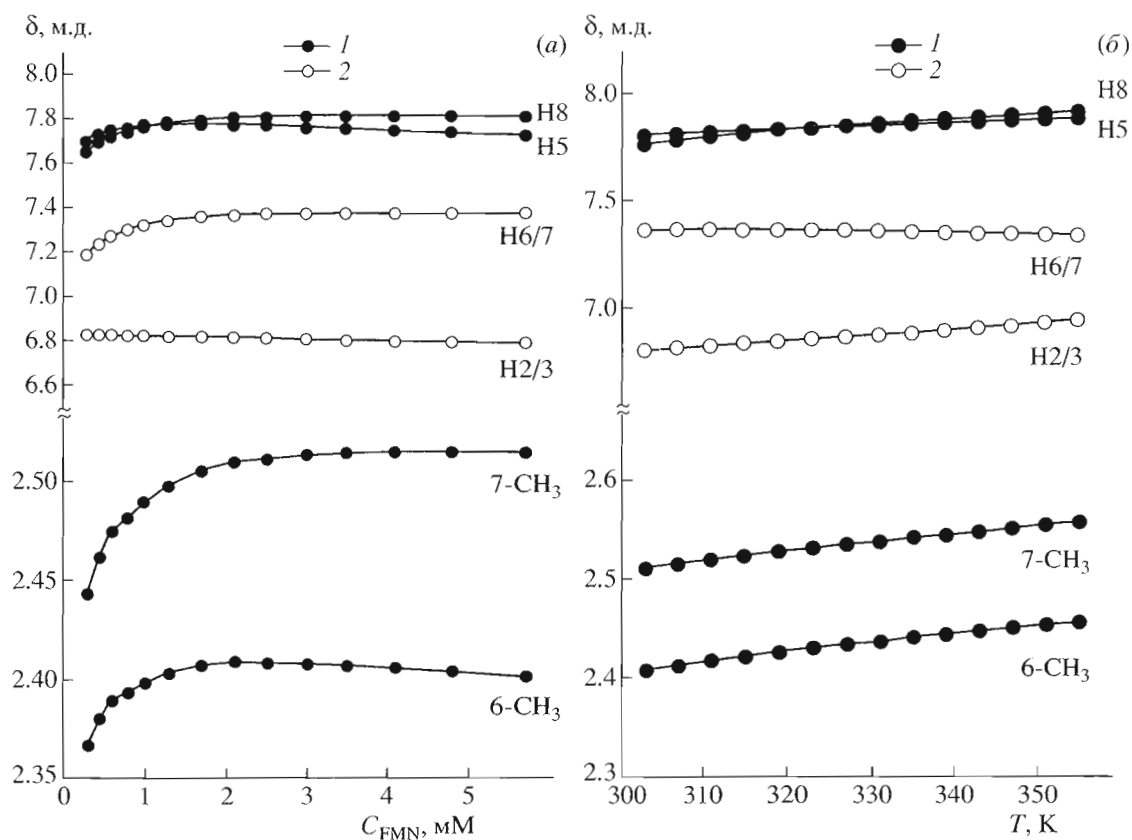


Рис. 2. Концентрационные (а) и температурные (б) зависимости химических сдвигов протонов FMN (1) и NOV (2) в смешанных растворах FMN–NOV. а)  $T$  303 К,  $C_{NOV} = 0.238$  мМ; б)  $C_{NOV} = 0.238$  мМ,  $C_{FMNI} = 2.5$  мМ.

может быть получено из системы (2) путем замены символов  $a$  на  $p$  и  $p$  на  $a$ . Здесь величины  $a_0, p_0$  – исходные концентрации FMN и NOV;  $a_1, p_1$  – концентрации FMN и NOV в мономерной форме;  $\delta_{m_A}, \delta_{d_A}, \delta_{h_A}$  и  $\delta_{m_P}, \delta_{d_P}, \delta_{h_P}$  – протонные химические сдвиги FMN и NOV в мономерной, димерной формах и в гетероассоциатах соответственно. Значения протонных химических сдвигов  $\delta_{m_A}, \delta_{d_A}, \delta_{m_P}, \delta_{d_P}$  и констант равновесия  $K_A, K_P$  для взаимодействующих молекул определены из независимых экспериментов, при исследовании самоассоциации молекул в идентичных экспериментальных условиях [13, 16]. Тогда из системы (2) следует, что наблюдаемые химические сдвиги сигналов протонов молекул FMN и NOV в смешанном растворе являются функциями неизвестных  $\delta_h$  и  $K_h$ , которые можно найти, используя экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов сигналов различных протонов ароматических молекул (рис. 2а). Процедура расчета параметров подробно описана в работах [14, 15]. Полученные в результате расчетов параметры гетероассоциации FMN с NOV при температурах 303 и 313 К представлены в таблице. Видно, что значение константы гетероассоциации FMN с NOV при 303 К превышает равновесные констан-

ты их самоассоциации. Прежде всего следует отметить, что для большинства других молекулярных систем, исследованных ранее [4, 13], величина константы гетероассоциации молекул принимает промежуточное значение между равновесными константами их самоассоциации. Превышение константы гетероассоциации над константами самоассоциации наблюдалось только для систем, в которых имела место дополнительная стабилизация гетерокомплексов за счет образования межмолекулярной водородной связи [15, 17]. Следовательно, можно предположить, что и в системе FMN–NOV межмолекулярные водородные связи дают определенный вклад в стабилизацию гетерокомплексов ароматических молекул.

Значения равновесных констант реакций самоассоциации FMN [13] и NOV [16] и их гетероассоциации (таблица), определенные в настоящей работе, были использованы для расчета относительного содержания различных типов комплексов в водном растворе в зависимости от  $r = a_0/p_0$  – отношения исходных концентраций FMN и NOV в водном растворе. Из рис. 3 видно, что с увеличением концентрации витамина (FMN) в растворе растет относительное содержание гетерокомплексов ( $A_iP_j$ ), ( $P_jA_iP_l$ ) и ( $A_iP_jA_k$ ) флавинмоноукле-

Значения параметров гетероассоциации новатрона ( $P$ ) и флавиномононуклеотида ( $A$ ) в 0.1 М фосфатном буфере, рD 7.1

$T, K$	Протоны FMN ( $A$ )	$\delta_{hA}$ , м.д.	$\delta_{dA}$ , м.д.	$\delta_{mA}$ , м.д.	Протоны NOV ( $P$ )	$\delta_{hP}$ , м.д.	$\delta_{dP}$ , м.д.	$\delta_{mP}$ , м.д.	$K \cdot 10^3, M^{-1}$
303	H8	7.52	7.85	8.00	H6/7	7.33	7.18	7.68	$K_A = 0.215 \pm 0.038$ $K_P = 22.2 \pm 7.2$ $K_h = 33.7 \pm 0.1$
	H5	7.59	7.69	8.00	H2/3	6.81	6.91	7.30	
	7-CH <sub>3</sub>	2.40	2.52	2.59					
	6-CH <sub>3</sub>	2.33	2.40	2.49					
313	H8	7.41	7.85	8.00	H6/7	7.33	7.18	7.68	$K_A = 0.144 \pm 0.025$ $K_P = 15.0 \pm 4.8$ $K_h = 13.9 \pm 1.2$
	H5	7.59	7.69	8.00	H2/3	6.83	6.91	7.30	
	7-CH <sub>3</sub>	2.39	2.52	2.59					
	6-CH <sub>3</sub>	2.33	2.40	2.49					

отида с антибиотиком новатроном. При  $r > 1$  роль гетерокомплексов ( $A_iP_jA_k$ ) становится преобладающей в смешанном растворе, что, очевидно, приводит к снижению эффективности медико-биологического действия новатрона и флавиномононуклеотида.

Анализ индуцированных само- и гетероассоциацией химических сдвигов протонов (таблица) позволяет объяснить ход экспериментальных кривых, представленных на рис. 2а. Действительно, для всех протонов FMN индуцированный химический сдвиг в самоассоциате  $\Delta\delta_d$  меньше, чем  $\Delta\delta_h$  в гетероассоциате. Поэтому при низких концентрациях флавиномононуклеотида ( $C_{FMN}$ ) экранирование протонов молекул FMN определяется, в основном, значением  $\Delta\delta_h$  в гетерокомплексах с NOV, т.е. химический сдвиг протонов флавиномононуклеотида находится в области высокого поля. С увеличением  $C_{FMN}$  растет доля самоассоциатов FMN, а следовательно, и вклад  $\Delta\delta_d$  в экспериментально наблюдаемый химический сдвиг, что приводит к его смещению в область более слабого поля. При дальнейшем увеличении  $C_{FMN}$  вклад самоассоциатов FMN в экспериментально наблюдаемый химический сдвиг становится преобладающим, и он смещается в область более сильного поля, как это имеет место при самоассоциации ароматических молекул в водном растворе [4, 16]. Аналогичное объяснение справедливо и для протонов H6/H7 NOV, для которых  $\Delta\delta_d > \Delta\delta_h$ . Вместе с тем, для протонов H2/H3 NOV имеет место обратное соотношение между индуцированными химическими сдвигами в самоассоциате и гетероассоциате, т.е. значения  $\Delta\delta_h > \Delta\delta_d$  (таблица), что и определяет монотонный ход экспериментальной кривой (рис. 2а).

*Структура гетероассоциата FMN–NOV (1 : 1) в водном растворе.* Полученные значения химических сдвигов  $\delta_h$  для протонов FMN и NOV (таблица) были использованы для расчета наиболее вероятной структуры комплекса (1 : 1) новатрона с

флавиномононуклеотидом в водном растворе. Характер концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов FMN и NOV, межмолекулярные кросс-пики в 2D-ROESY-спектрах и значения индуцированных химических сдвигов протонов молекул в составе гетерокомплекса NOV–FMN (таблица) позволяют сделать однозначный вывод о расположении ароматического кольца хромофора молекулы NOV, где находятся протоны H2/H3, над ароматическим кольцом FMN, содержащим протоны H8, 7-CH<sub>3</sub>, 6-CH<sub>3</sub> и H5.

На рис. 4 представлена найденная в результате расчетов методом молекулярной механики наибо-

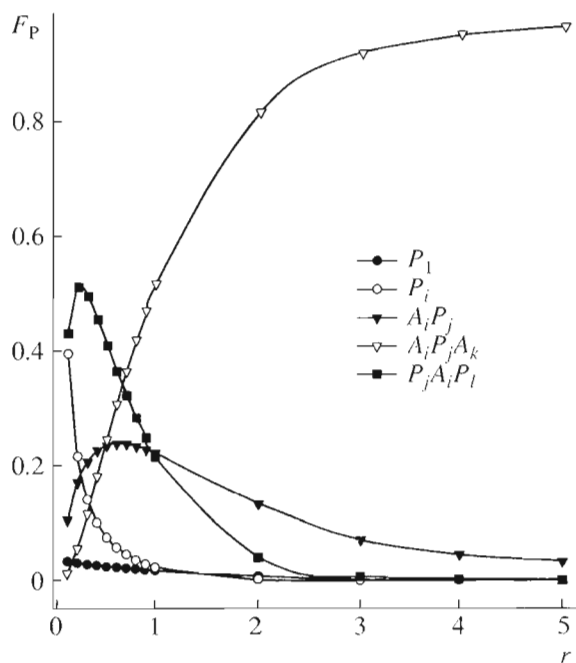
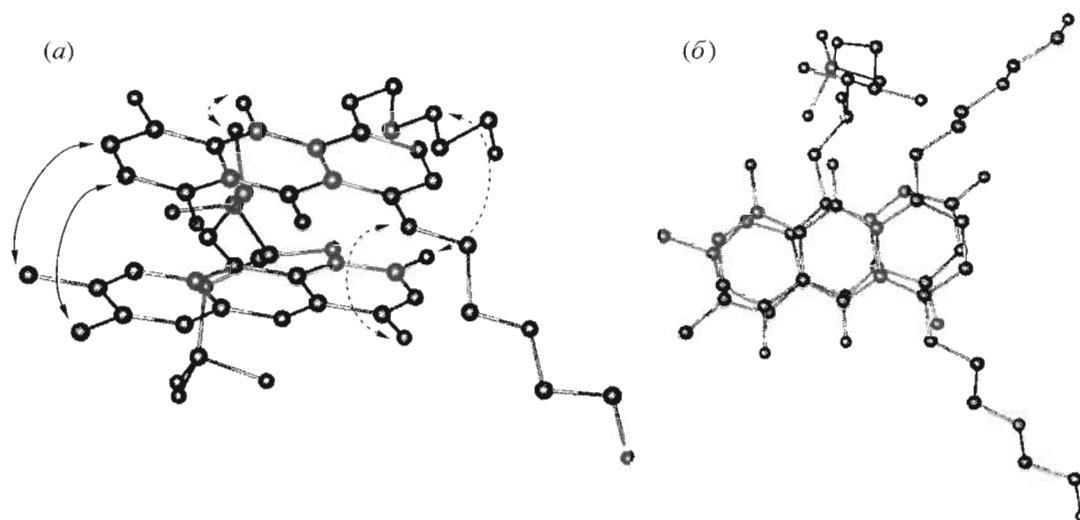


Рис. 3. Относительное содержание ( $F_p$ ) гетерокомплексов новатрона в зависимости от отношения  $r$  ( $a_0/p_0$ ) исходных концентраций FMN ( $a_0$ ) и NOV ( $p_0$ ),  $p_0 = 1.0$  мМ = const.



**Рис. 4.** Структура гетерокомплекса FMN–NOV (1 : 1): *a*) – вид на комплекс сбоку; *б*) – вид сверху, показывающий взаимное расположение плоскостей хромофоров молекулы FMN и NOV. Межмолекулярные водородные связи показаны пунктиром. Межмолекулярные ROE-контакты – сплошными стрелками.

лее вероятная (низкоэнергетическая) пространственная структура FMN–NOV (1 : 1) гетерокомплекса в водном растворе. В таком комплексе имеет место довольно сильное перекрытие ароматических колец взаимодействующих молекул (стэкинг-взаимодействие), что предполагает существенную роль дисперсионных взаимодействий при образовании гетероассоциата. Вместе с тем, структура FMN–NOV (1 : 1) комплекса свидетельствует о возможности образования трех водородных связей: между 5-NH-группой боковых цепей NOV и C4=O-группой FMN, 12-NH (NOV) – C2=O (FMN), C9=O (NOV) – C $\alpha$ -OH боковой цепи FMN (показаны пунктиром на рис. 4). Структура комплекса FMN–NOV (1 : 1) соответствует как предельным протонным химическим сдвигам для этой молекулярной системы, так и минимуму ее потенциальной энергии, определенной методом молекулярного моделирования.

*Термодинамика гетероассоциации молекул новатрона и флавиномононуклеотида в водном растворе.* Термодинамические параметры  $\Delta H_h^0$  и  $\Delta S_h^0$  реакций гетероассоциации NOV и FMN были определены на основе экспериментальных температурных зависимостей химических сдвигов протонов молекул с использованием аддитивной модели для описания наблюдаемого химического сдвига и формализма Вант-Гоффа [14]. Качественно сходный характер экспериментальных зависимостей  $\delta(T)$  для всех необменивающихся протонов FMN и NOV (рис. 2б) позволяет допустить, что экспериментально наблюдаемые изменения химических сдвигов при повышении температуры вызваны в основном перераспределением мо-

лекулярного равновесия в растворе, связанным с разрушением само- и гетероассоциатов.

При вычислении термодинамических параметров использовали соотношение (2), в котором влияние температуры на значение  $\delta(T)$  определяется температурной зависимостью равновесных констант самоассоциации и гетероассоциации молекул, согласно соотношению:

$$K_i(T) = \exp(\Delta S_i^0 / R - \Delta H_i^0 / RT), \quad (3)$$

в предположении, что величины  $\Delta S_i^0$  и  $\Delta H_i^0$  не зависят существенным образом от температуры в исследованном диапазоне температур. В результате расчетов были получены усредненные значения энергии Гиббса, энтальпии и энтропии реакций гетероассоциации NOV и FMN в водном растворе:  $\Delta G_h^0 = -(26.25 \pm 0.01)$  кДж/моль,  $\Delta H_h^0 = -(55 \pm 6)$  кДж/моль,  $\Delta S_h^0 = -(87 \pm 11)$  Дж/(моль К). Довольно большие отрицательные значения энтальпии и энтропии реакции гетероассоциации ароматических молекул NOV и FMN позволяют заключить, что дисперсионные взаимодействия играют существенную роль при образовании гетерокомплексов этих молекул. Известно, что дисперсионные взаимодействия характеризуются отрицательными значениями энтальпии и энтропии [18]. Количественный анализ термодинамических параметров образования гетерокомплекса NOV и FMN качественно подтверждает выдвинутое выше предположение о стабилизации гетерокомплекса ароматических молекул в водном растворе межмолекулярными водородными связями. Формирование водородной связи в гетерокомплексе NOV и FMN также приводит к отрицательным

значениям  $\Delta H$  и  $\Delta S$  [18, 19]. Энтальпия образования водородной связи в водном растворе по различным оценкам находится в пределах от  $-8$  до  $-13$  кДж/моль [18].

Таким образом, можно сделать вывод, что ароматические молекулы витаминов, в частности рибофлавин, могут образовывать энергетически прочные гетероассоциаты с ароматическими антиопухолевыми антибиотиками в водном растворе и тем самым, возможно, оказывать влияние на эффективность их медико-биологического действия.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Антибиотик новатрон (1,4-дигидрокси-5,8-бис-[[[2-(2-гидроксиэтил)амино]этил]амино]-9,10-антрацендион) и флавиномононуклеотид фирмы "Sigma" растворяли в  $D_2O$  (Sigma, изотопная чистота 99.95%) и лиофилизировали. Растворы готовили путем добавления требуемого количества образца в дегтерированном 0.1 М фосфатном буфере (pD 7.1), содержащем  $10^{-4}$  М 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 двух температурах: 303 и 313 К, в интервале концентраций FMN от 0.3 до 5.67 мМ в смешанном растворе NOV-FMN. Равновесная константа самоассоциации молекул NOV почти на два порядка превышает константу самоассоциации для FMN ( $K_{FMN} = 215 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_{NOV} = 22000 \text{ M}^{-1}$  при  $T$  303 К [13, 16]), поэтому изменение концентрации NOV оказывает существенно большее влияние на распределение агрегатов, чем вариация концентрации FMN в процессе измерений концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов изучаемых ароматических молекул. Однако, в отличие от ранее проведенных экспериментов [4, 13–16] по исследованию гетероассоциации биологически активных ароматических молекул, в системе NOV-FMN поддерживалась постоянная концентрация NOV ( $p_0 = 0.238$  мМ) при изменении процентного содержания FMN в растворе (рис. 2а). Это связано со значительно более низкой растворимостью новатрона в сравнении с FMN. Температурные зависимости химических сдвигов протонов молекул в смешанном растворе измерены в диапазоне температур от 303 до 355 К (рис. 2б). Химический сдвиг определяли относительно 2,2-диметил-2-силантанта-5-сульфоукислоты (DSS), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония.

Отнесение сигналов в спектрах  $^1H$ -ЯМР проводили с помощью двумерных гомоядерных экспериментов TOCSY, NOESY и ROESY. Методика приготовления образцов и проведения экспериментов описана в [4, 14]. Двумерные спектры снимались при условиях, соответствующих стабиль-

ному состоянию смеси NOV-FMN в растворе в процессе проведения ЯМР-эксперимента ( $C_{NOV} = 0.6$  мМ,  $C_{FMN} = 3$  мМ,  $T$  303 К).

Расчет пространственной структуры гетерокомплекса FMN-NOV (1 : 1) выполнен методами молекулярной механики с использованием программы X-PLOR (версия 3.851) [20]. Водное окружение моделировалось молекулами воды в виде TIP3P [21], размещенными в прямоугольном боксе размерами  $30 \times 30 \times 37 \text{ \AA}^3$  (1100 молекул). Топология молекул FMN и NOV в комплексе и параметризация их валентных взаимодействий получены с помощью программы X-PLO2D [22] с использованием кристаллических структур этих молекул, имеющих в PDB-банке данных [23]. Параметры невалентных взаимодействий между атомами соответствовали силовому полю MM3 [24]. Начальная структура гетерокомплекса для последующей минимизации по энергии задавалась на основании анализа расчетных значений индуцированных химических сдвигов, а также путем введения в программу X-PLOR известных из двумерных ROESY-спектров межмолекулярных контактов между протонами NOV и FMN. Начальное расстояние между хромофорами в 1 : 1 гетерокомплексе задавалось на уровне  $3.4 \text{ \AA}$ , известного из кристаллографических исследований комплексов ароматических молекул [25].

Выражаем благодарность Объединенному исследовательскому центру Лондонского университета за предоставленную возможность в Беркбек колледже использовать для измерений ЯМР-спектрометр Bruker DRX (500 МГц) и Королевскому Обществу Великобритании за предоставленный грант НАТО (ЕМП) на проведение ЯМР-исследований в Беркбек колледже.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Traganos F., Kapuscinsky J., Darzynkiewicz Z.* // *Cancer Res.* 1991. V. 51. P. 3682–3689.
2. *Lyles M.B., Cameron I.L.* // *Biophys. Chem.* 2002. V. 96. P. 53–76.
3. *Piosik J., Zdunek M., Kapuscinsky J.* // *Biochem. Pharm.* 2002. V. 63. P. 635–646.
4. *Davies D.B., Veselkov D.A., Djimant L.N., Veselkov A.N.* // *Eur. Biophys. J.* 2001. V. 30. P. 354–366.
5. *Birchall L.A., Bailey N.P., Blackledge G.R.P.* // *Br. J. Clin. Pract.* 1991. V. 45. P. 208–211.
6. *Kapuscinsky J., Darzynkiewicz Z.* // *Biochem. Pharm.* 1985. V. 34. P. 4203–4213.
7. *Kapuscinsky J., Darzynkiewicz Z.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. P. 6302–6306.
8. *Roboz J., Richardson C.L., Holland J.F.* // *Life Sci.* 1982. V. 31. P. 25–30.
9. *Веселков А.Н., Евстигнеев М.П., Высоцкий С.А., Веселков Д.А., Дэвис Д.Б.* // *Биофизика.* 2002. Т. 47. С. 459–466.
10. *Pullman B.* // *Adv. Drug Res.* 1989. V. 18. P. 2–112.

11. *Armitage J.O.* // *Oncology*. 2002. V. 16. P. 490–518.
12. *Adel A.L., Dorr R.T., Liddil J.D.* // *Cancer Invest.* 1993. V. 11. P. 15–24.
13. *Веселков А.Н., Лантушенко А.О., Чубаров А.С., Веселков Д.А., Дэвис Д.Б.* // *Физ. химия*. 2002. Т. 76. С. 1313–1320.
14. *Davies D.B., Veselkov D.A., Veselkov A.N.* // *Mol. Phys.* 1999. V. 97. P. 439–451.
15. *Davies D.B., Veselkov D.A., Kodintsev V.V., Evstigneev M.P., Veselkov A.N.* // *Mol. Phys.* 2000. V. 98. P. 1961–1972.
16. *Davies D.B., Veselkov D.A., Evstigneev M.P., Veselkov A.N.* // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. 2001. P. 61–67.
17. *Веселков Д.А., Евстигнеев М.П., Кодициев В.В., Дымант Л.Н., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н.* // *Физ. химия*. 2001. Т. 75. С. 879–884.
18. *Ross R.D., Subramanian S.* // *Biochemistry*. 1981. V. 20. P. 3096–3102.
19. *Record M.T., Anderson C.F., Lohman T.M.* // *Quart. Rev. Biophys.* 1978. V. 11. P. 103–178.
20. *Brunger A.T.* *X-PLOR, A System for X-PLOR Crystallography and NMR*. Yale: Univ. Press, 1992. P. 382 p.
21. *Jorgensen W., Chaindrasekhar J., Madura J., Imprey R., Klein M.* // *J. Chem. Phys.* 1983. V. 79. P. 926–935.
22. *Kleywegt G.L.* *Dictionaries for Heteros/News from Uppsala Software Factory*. 5. 1998. 4 p.
23. *Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E.* // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 235–242.
24. *Allinger N.L.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1977. V. 99. P. 8127–8134.
25. *Falk M., Chew W., Walter J.A., Kwiatkowski W., Barclay K.D., Klassen G.A.* // *Can. J. Chem.* 1998. V. 76. P. 48–56.

## A Structural and Thermodynamic Analysis of Novatrone and Flavin Mononucleotide Heteroassociation in Aqueous Solution by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy

A. N. Veselkov\*, M. P. Evstigneev\*\*#, A. O. Rozvadovskaya\*,  
Yu. V. Mukhina\*, and D. B. Davis\*\*

#Phone: 38 (0692) 235-251; e-mail: max\_evstigneev@mail.ru

\*Sevastopol National Technical University,  
Streletskaya balka, Sevastopol, 99053 Ukraine

\*\*School of Biological and Chemical Sciences, Birkbeck College, University of London,  
Malet Street, London WC1E 7HX, UK

A heteroassociation of antitumor antibiotic novatrone (NOV) and flavin mononucleotide (FMN) in aqueous solution was studied by one- and two-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectroscopy (500 MHz) to elucidate the molecular mechanism of the possible combined action of the antibiotic and vitamin. The equilibrium reaction constants, induced proton chemical shifts, and the thermodynamic parameters ( $\Delta H$  and  $\Delta S$ ) of the NOV and FMN heteroassociation were determined from the concentration and temperature dependences of proton chemical shifts of the aromatic molecules. The most favorable structure of the 1 : 1 NOV–FMN complex was determined by both the method of molecular mechanics (X-PLOR software) and the induced proton chemical shifts of the molecules. An analysis of the results suggests that the NOV–FMN intermolecular complexes are mainly stabilized by stacking interactions of their aromatic chromophores. An additional stabilization is possible due to intermolecular hydrogen bonds. It was concluded that the aromatic molecules of vitamins, in particular, FMN, can form energetically favorable heterocomplexes with aromatic antitumor antibiotics in aqueous solutions, which could result in a modulation of their medical and biological action. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* antitumor antibiotic, flavin mononucleotide, heteroassociation, novatrone, NMR spectroscopy