



УДК 577.182.36.088.53:543.422.25

# <sup>1</sup>H-ЯМР-АНАЛИЗ ГЕТЕРОАССОЦИАЦИИ КОФЕИНА С АНТИБИОТИКОМ АКТИНОЦИЛ-БИС(3-ДИМЕТИЛАМИНОПРОПИЛАМИНОМ) В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

© 2002 г. А. Н. Веселков\*#, А. О. Лантушенко\*, Д. А. Веселков\*\*, Д. Б. Дэвис\*\*

\* Севастопольский государственный технический университет,  
99053, Украина, г. Севастополь, Стрелецкая балка;

\*\* Беркбек колледж Лондонского университета, департамент химии, Лондон, Великобритания

Поступила в редакцию 12.10.2001 г. Принята к печати 18.10.2001 г.

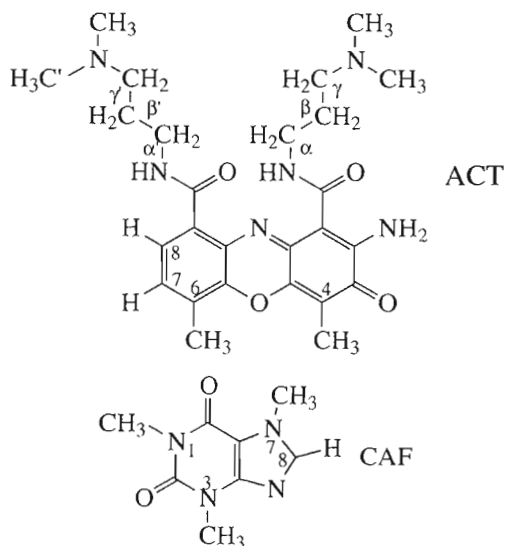
Исследована гетероассоциация синтетического антибиотика актиноцил-бис(3-диметиламинопропиламина) (АСТ) и кофеина (САФ) в водном растворе методом одномерной и двумерной <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии (500 МГц). Исходя из концентрационных и температурных зависимостей химических сдвигов протонов взаимодействующих ароматических молекул, определены равновесные константы реакций, индуцированные протонные химические сдвиги, термодинамические параметры ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ) гетероассоциации, а также пространственная структура гетерокомплекса АСТ–САФ. Проведен сравнительный анализ параметров гетероассоциации кофеина с актиномицином *D* и его синтетическим аналогом АСТ. Сделан вывод об определяющей роли стэкинг-взаимодействий хромофоров ароматических молекул кофеина и феноксазоновых антибиотиков при образовании гетерокомплексов в водном растворе.

**Ключевые слова:** гетероассоциация; кофеин; ЯМР-спектроскопия; антиопухолевый антибиотик; синтетический аналог актиномицина *D*.

## ВВЕДЕНИЕ

Многие противоопухолевые антибиотики, используемые в клинической практике и в экспериментальных исследованиях, проявляют свою цитотоксическую активность в результате специфического взаимодействия с ДНК, что приводит к генотоксическому стрессу и последующей инициации запрограммированной смерти клеток (апоптозу) [1, 2]. Синтетический аналог антибиотика актиномицина *D* (AMD), актиноцил-бис(3-диметиламинопропиламин) (АСТ), обладает противоопухолевой активностью, проявляющейся в опытах как *in vitro* [3], так и *in vivo* [4]. Анализ методом проточной цитофлуориметрии индуцированного апоптоза и фаз клеточного цикла в лейкемических клетках MOLT-3 человека показал, что АСТ проявляет значительную цитотоксическую активность в интервале концентраций 1–9 мкМ [3]. Спектрофотометрические исследования в УФ- и видимой области свидетельствуют о том, что феноксазоновый хромофор антибиотика АСТ интеркалирует между плоскостями оснований ДНК [3, 5]. Хотя роль структуры хромофора при интеркаляции феноксазоновых антибиотиков в ДНК до-

статочно хорошо изучена, вклад боковых цепей в комплексообразование аналогов AMD с ДНК однозначно не определен. АСТ, который отличается по своей структуре от антибиотика AMD тем, что к феноксазоновому хромофору АСТ вместо пентапептидных колец присоединены диметиламинопропильные группы, может служить в качестве модельного соединения для анализа влияния боковых структур феноксазонового хромофора на биологическую активность антибиотика.



Сокращения: AMD – актиномицин *D*; АСТ – актиноцил-бис(3-диметиламинопропиламин); САФ – кофеин.

# Автор для переписки (тел.: 38-(0692) 235-251; эл. почта: veselkov@sevgtu.sebastopol.ua).

Кофеин (1,3,7-триметилксантин, CAF) – один из наиболее широко употребляемых психомоторных стимуляторов [6, 7]. Кофеин вызывает множественные эффекты на клеточном уровне, в частности, он ингибирует процесс репарирования в бактериальных системах [8, 9]. Принято считать, что биологическая активность кофеина связана с его взаимодействием с биополимерами – белками и ДНК [9–11]. Вместе с тем экспериментальные данные свидетельствуют о том, что кофеин уменьшает цитотоксическое действие бромистого этидия [12] и ряда противоопухолевых препаратов, таких, как доксорубин и его аналоги, эллитидин и др. [13–17]. В работах [16–18] сделан вывод о том, что кофеин выступает в роли комплексообразователя-интерцептора ароматических биологически активных веществ, связывающихся с ДНК путем интеркаляции, тем самым уменьшая их эффективную концентрацию и соответственно фармакологическую активность. Изучение закономерностей процессов гетероассоциации кофеина с биологически активными веществами, определение характера равновесия между мономерными и ассоциированными формами важно для анализа механизма конкурентного связывания этих молекул с нуклеиновыми кислотами в растворе [19]. Гетероассоциация кофеина и AMD в водно-солевом растворе была исследована ранее методами одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии [19, 20]. Вместе с тем сведения о структурных и термодинамических параметрах взаимодействия этих молекул в водном растворе в литературе отсутствуют.

В настоящей работе гетероассоциация АСТ и кофеина в водном растворе анализирована на основе экспериментальных концентрационных и температурных зависимостей протонных химических сдвигов взаимодействующих молекул так же, как это сделано ранее [19–22] для гетерокомплексов кофеина с ароматическими молекулами красителей и антибиотиков. Это позволило определить структурные и термодинамические характеристики гетероассоциации АСТ–CAF. Двумерные спектры гомоядерной корреляционной спектроскопии (TOCSY и ROESY) использованы для полного отнесения сигналов необменивающихся протонов антибиотика и кофеина и для качественного анализа взаимного расположения исследуемых молекул в гетерокомплексе. Самоассоциация АСТ [23] и кофеина [19] была исследована ранее методом ЯМР-спектроскопии в аналогичных экспериментальных условиях.

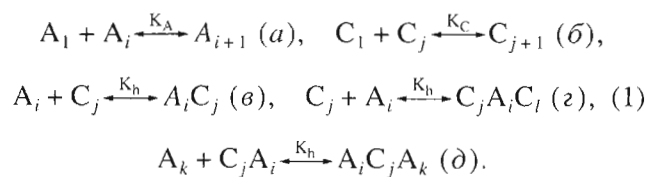
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В NOESY- и ROESY-спектрах смешанных растворов АСТ и кофеина не наблюдались межмолекулярные кросс-пики даже при максимальных исследованных концентрациях молекул. Пренебре-

жимо малая интенсивность межмолекулярных кросс-пиков может быть связана со смещением молекулярного равновесия при добавлении кофеина вследствие образования различных гетероассоциатов АСТ–АСТ с относительно малым содержанием каждого типа комплексов в растворе [19].

Структурные и термодинамические параметры гетероассоциатов АСТ–CAF, как и в случае рассмотренных ранее комплексов кофеина с другими ароматическими лигандами [19–22], определяли путем анализа зависимостей химических сдвигов необменивающихся протонов обоих ароматических соединений в смешанных растворах от концентрации (рис. 1а) и температуры (рис. 1б). В процессе измерений концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов изучаемых ароматических молекул концентрация кофеина поддерживалась постоянной ( $c_0 = 0.7$  мМ) при изменении процентного содержания АСТ в растворе (рис. 1а). Это связано с тем, что при 298 К равновесная константа самоассоциации молекул АСТ ( $K_A = (3100 \pm 1400) \text{ M}^{-1}$ ) более чем на два порядка превышает константу самоассоциации для кофеина ( $K_C = (11.8 \pm 0.3) \text{ M}^{-1}$  [19, 23]), и, следовательно, изменение концентрации антибиотика оказывает значительно большее влияние на равновесное распределение агрегатов, чем вариация содержания кофеина в растворе.

Для анализа экспериментальных данных использована предложенная нами модель гетероассоциации молекул [24], в которой учитывается динамическое равновесие взаимодействующих молекул, включающее образование бесконечно-мерных самоассоциатов, а также гетероассоциатов различного типа, согласно следующей схеме взаимодействия ароматических молекул в растворе:



Константы равновесия для реакций самоассоциации АСТ ( $K_A$ ), кофеина ( $K_C$ ) и гетероассоциации молекул ( $K_h$ ) полагаются независимыми от числа молекул в агрегатах и комплексах. В схеме (1)  $A_1$  и  $C_1$  соответствуют мономерам АСТ и CAF,  $A_i$ ,  $A_k$ ,  $C_j$ ,  $C_l$  – самоассоциатам, содержащим  $i$ ,  $k$  молекул антибиотика и  $j$ ,  $l$  молекул кофеина соответственно. Так как равновесная константа самоассоциации для кофеина существенно меньше, чем для АСТ ( $K_C \ll K_A$ ), то вероятность образования гетерокомплексов  $A_k C_j A_i$ , где  $C_j$  – самоассоциаты фланкированы самоассоциатами антибиотика ( $A_k$  и  $A_i$ ), как показывают расчеты [24], очень мала и, следовательно, реакцией (1д) в этом случае можно пренебречь. Тогда зависимость наблюдаемого химического сдвига прото-

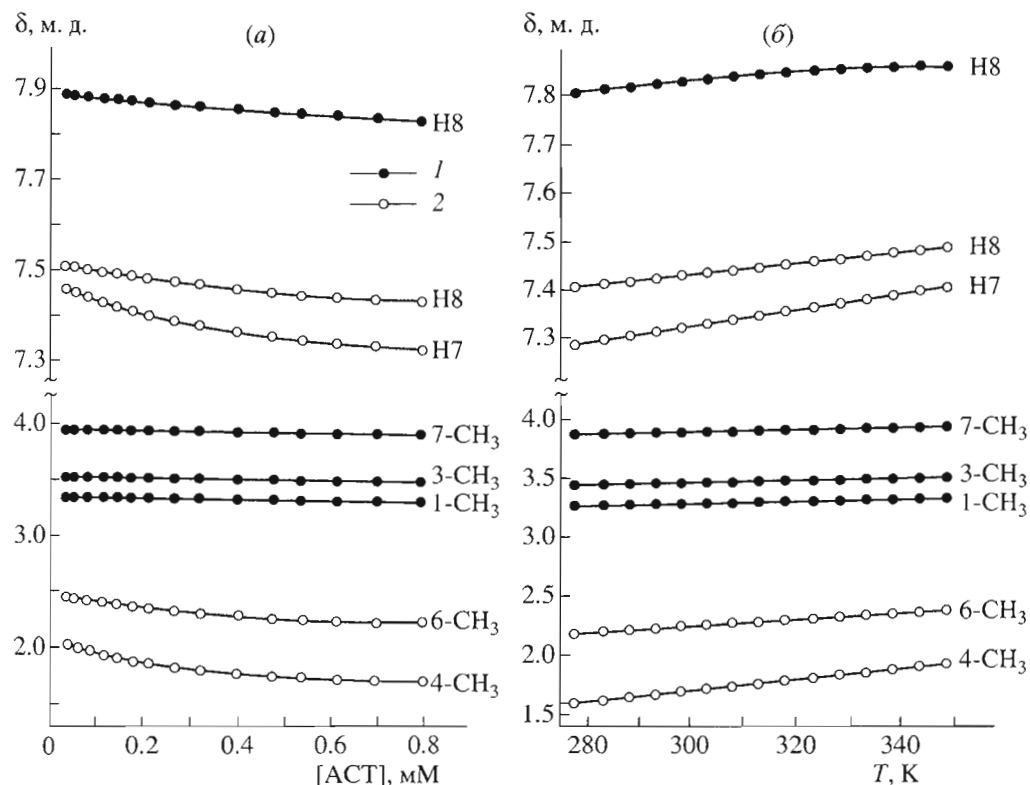


Рис. 1. Экспериментальные зависимости химических сдвигов протонов АСТ (1) и кофеина (2) в смешанном растворе от концентрации АСТ при 298 К, [CAF] =  $c_0 = 0.7$  мМ (а); и от температуры при  $c_0 = 0.7$ , [АСТ] =  $a_0 = 0.8$  мМ (б).

на АСТ от концентрации молекул в смешанном растворе может быть записана в виде [24]:

$$\delta_A = \frac{[a_1]}{[a_0]} \left[ \delta_{mA} \left( 2(1 + K_A[a_1]) - \frac{1}{(1 - K_A[a_1])^2} \right) + 2\delta_{dA} \left( \frac{1}{(1 - K_A[a_1])^2} - 1 - K_A[a_1] \right) + \delta_{hA} \frac{K_h[c_1]}{(1 - K_A[a_1])^2 (1 - K_C[c_1])} \left( 1 + \frac{K_h[c_1]}{2(1 - K_C[c_1])} \right) \right] \quad (2)$$

и соответствующее выражение для протонов кофеина:

$$\delta_C = \frac{[c_1]}{[c_0]} \left[ \delta_{mC} \left( 2(1 + K_C[c_1]) - \frac{1}{(1 - K_C[c_1])^2} \right) + 2\delta_{dC} \left( \frac{1}{(1 - K_C[c_1])^2} - 1 - K_C[c_1] \right) + \delta_{hC} \frac{K_h[a_1]}{(1 - K_C[c_1])^2 (1 - K_A[a_1])} \left( 1 + \frac{K_h[c_1]}{1 - K_C[c_1]} \right) \right]. \quad (3)$$

Здесь  $\delta_{mA}$ ,  $\delta_{dA}$ ,  $\delta_{hA}$  и  $\delta_{mC}$ ,  $\delta_{dC}$ ,  $\delta_{hC}$  – химические сдвиги протонов АСТ и САФ в мономерной, димерной формах и в гетероассоциатах соответственно. Значения  $\delta_{mA}$ ,  $\delta_{dA}$ ,  $\delta_{mC}$ ,  $\delta_{dC}$  и равновесных

констант  $K_A$ ,  $K_C$  для взаимодействующих молекул определены при исследовании самоассоциации молекул в идентичных условиях растворителя [19, 23]. Тогда из уравнений (2) и (3) следует, что наблюдаемые химические сдвиги протонов молекул антибиотика и кофеина являются функциями неизвестных  $\delta_h$  и  $K_h$ , которые можно найти, используя экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов различных протонов ароматических молекул в смешанном растворе (рис. 1а). Вычислительная процедура расчета параметров подробно описана в работе [24]. Полученные в результате расчетов параметры гетероассоциации АСТ с кофеином при температурах 298 и 308 К представлены в табл. 1.

Анализ результатов показывает, что, как и для других молекулярных систем, исследованных ранее [19–22], величина константы гетероассоциации АСТ и кофеина принимает промежуточное значение между равновесными константами самоассоциации кофеина и антибиотика. Сравнение констант гетероассоциации кофеина с АСТ и АМД [19, 20] показывает, что в пределах погрешности для исследованных молекулярных систем в одном и том же растворителе (0.1 М фосфатный буфер, рD 7.1) они совпадают. Следовательно, можно сделать заключение, что наличие массивных боковых цепей – пентапептидных лактонных

**Таблица 1.** Расчетные значения параметров гетероассоциации кофеина и АСТ в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.1)

<i>T</i> , К*	Протоны АСТ	$\delta_{нА}$ , м.д.	$\delta_{мА}$ , м.д.	Протоны САФ	$\delta_{нС}$ , м.д.	$\delta_{мС}$ , м.д.	$K_h$ , М <sup>-1</sup>
298 [ $K_A = 3100 \pm 1400$ $K_C = 11.8 \pm 0.3$ ]	H8	7.53	7.51	H8	7.38	7.89	297 ± 18
	H7	7.45	7.47	H7	3.47	3.95	
	6-CH <sub>3</sub>	2.45	2.50	3-CH <sub>3</sub>	2.86	3.54	
	4-CH <sub>3</sub>	1.88	2.11	1-CH <sub>3</sub>	2.79	3.35	
308 [ $K_A = 2900 \pm 1350$ $K_C = 8.9 \pm 0.4$ ]	H8	7.54	7.52	H8	7.36	7.89	228 ± 12
	H7	7.46	7.48	H7	3.49	3.95	
	6-CH <sub>3</sub>	2.40	2.53	3-CH <sub>3</sub>	2.81	3.54	
	4-CH <sub>3</sub>	1.86	2.16	1-CH <sub>3</sub>	2.79	3.35	

\* В квадратных скобках приведены константы самоассоциации АСТ ( $K_A$ ) и САФ ( $K_C$ ) при соответствующей температуре.

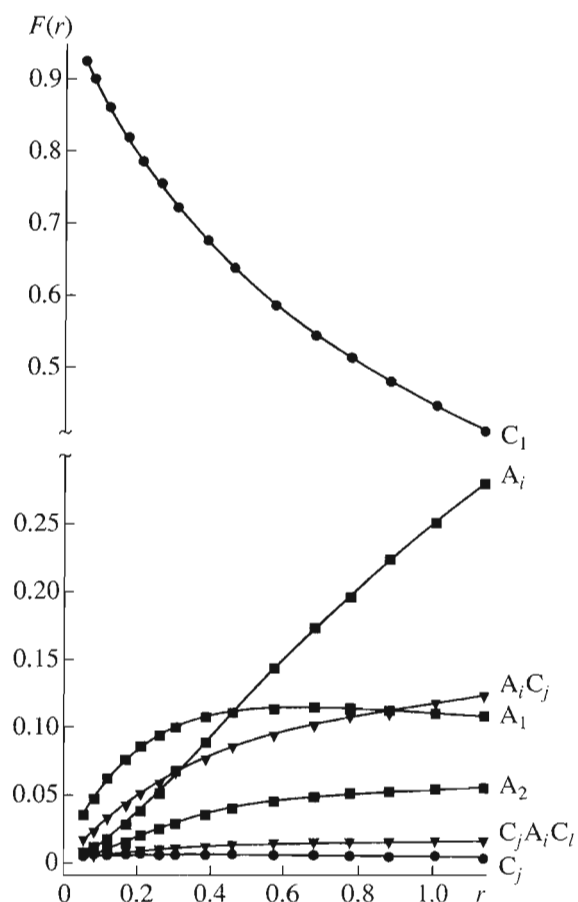
колец в антибиотике AMD – не оказывает существенного влияния на вероятность образования гетерокомплексов феноксазоновых антибиотиков с молекулами кофеина в водном растворе, т.е. при их ассоциации определяющую роль играет стэкинг-взаимодействие хромофоров ароматических молекул.

По значениям констант само- и гетероассоциации АСТ и САФ было рассчитано относительное содержание молекулярных комплексов в зависимости от концентрации антибиотика в растворе (рис. 2). С увеличением концентрации АСТ в смешанном растворе наблюдались значительный рост содержания димерных и *n*-мерных агрегатов АСТ и соответствующее падение относительного содержания мономеров антибиотика, в то время как удельный вес комплексов АСА практически не менялся. При этом относительное содержание мономеров и *n*-мерных агрегатов САФ, концентрация которого поддерживалась постоянной в смешанном растворе, уменьшалось, а доля гетерокомплексов САФ–АСТ росла монотонно с возрастанием концентрации антибиотика в растворе.

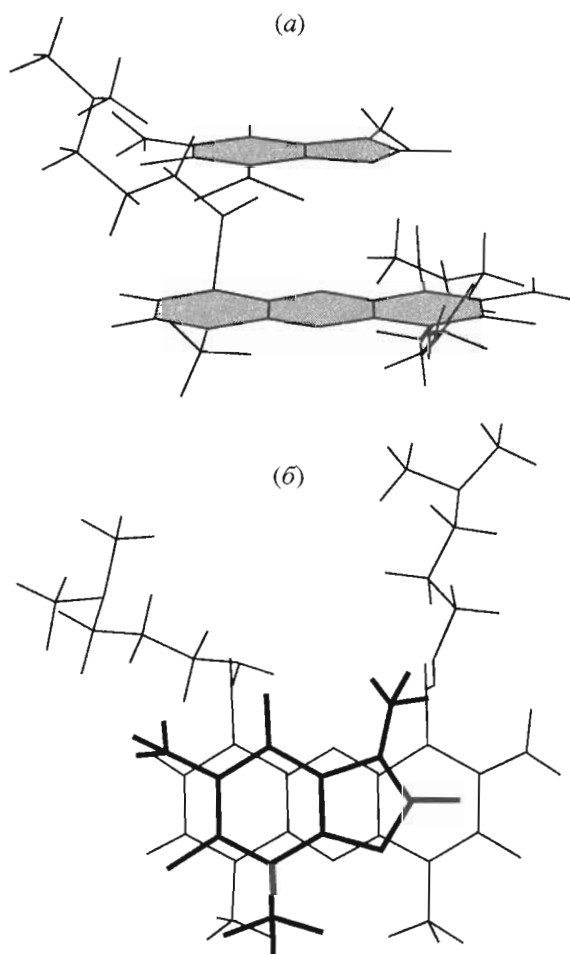
*Структура 1 : 1-гетероассоциата АСТ–САФ в водном растворе.* Полученные значения  $\delta_{нС}$  для протонов АСТ и САФ (табл. 1) были использованы для расчета наиболее вероятной структуры 1 : 1-комплекса. Взаимное расположение молекул в гетероассоциате определяли, как и ранее [19, 24], путем установления соответствия значений индуцированных протонных химических сдвигов ( $\delta = \delta_{мС} - \delta_{нС}$ ) теоретическим кривым экранирования, рассчитанным квантово-механически для ароматических молекул [25].

Рассчитанная наиболее вероятная пространственная структура 1 : 1-гетерокомплекса АСТ–САФ в водном растворе представлена на рис. 3. Плоскости хромофоров взаимодействующих молекул в 1 : 1-гетероассоциате параллельны друг другу и расположены на расстоянии 0.30 нм. Рассчитанная структура гетерокомплекса АСТ–САФ не-

сколько отличается от определенной ранее для 1 : 1-комплекса САФ с AMD [19]: наряду с меньшим расстоянием между хромофорами молекул АСТ и САФ плоскость хромофора кофеина в гетерокомплексе повернута приблизительно на 180°



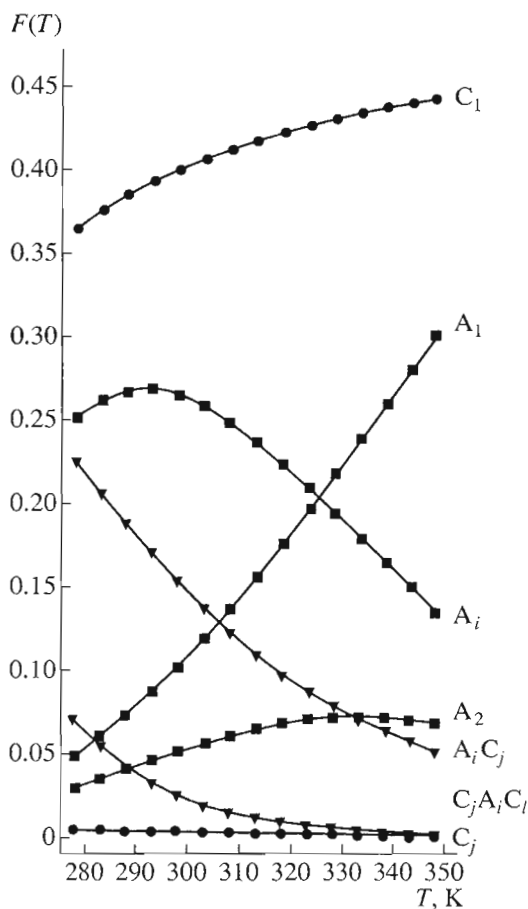
**Рис. 2.** Относительное содержание (*F*) самоассоциатов и гетероассоциатов АСТ и кофеина в зависимости от отношения исходных концентраций АСТ и САФ,  $r = a_0/c_0$ ,  $c_0 = 0.7 \text{ mM} = \text{const}$ .



**Рис. 3.** Структура 1 : 1-гетерокомплекса АСТ–кофеина: (а) – вид на комплекс сбоку; плоскости хромофоров молекул АСТ и кофеина заштрихованы; (б) – вид сверху, показывающий взаимное расположение плоскостей хромофоров молекулы АСТ и кофеина в гетерокомплексе.

вокруг поперечной оси молекулы и наблюдается несколько большее перекрытие ароматических колец молекул в 1 : 1-гетерокомплексе АСТ–САФ по сравнению с АМД–САФ. Можно предположить, что основной вклад в стабилизацию гетерокомплекса АСТ–САФ дают стэкинг-взаимодействия ароматической молекулы кофеина с хромофором антибиотика.

*Термодинамика гетероассоциации молекул САФ и АСТ в водном растворе.* Термодинамические параметры  $\Delta H_h^0$  и  $\Delta S_h^0$  реакций гетероассоциации САФ и АСТ были определены на основе экспериментальных температурных зависимостей протонных химических сдвигов молекул в смешанном растворе (рис. 1б) с использованием аддитивной модели для описания наблюдаемых химических сдвигов протонов и формализма Вант–Гоффа [26, 27].



**Рис. 4.** Относительное содержание ( $F$ ) самоассоциатов и гетероассоциатов АСТ и кофеина в зависимости от температуры при  $a_0 = 0.8$  мМ,  $c_0 = 0.7$  мМ.

При вычислении термодинамических параметров использовали соотношения (2) и (3), в которых влияние температуры на значение  $\delta(T)$  определяется температурной зависимостью равновесных констант самоассоциации и гетероассоциации молекул согласно соотношению:

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

в предположении, что величины  $\Delta S_i^0$  и  $\Delta H_i^0$  не зависят существенным образом от температуры в исследованном диапазоне температур. На рис. 4 приведены расчетные зависимости относительного содержания различных типов ассоциатов в смешанном растворе от температуры, полученные с использованием найденных 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 практически всех ассоциатов монотонно уменьшается, что сопровождается увеличением кон-

центрации мономеров САФ и АСТ в смешанном растворе. Вместе с тем доля димеров ( $A_2$ ) антибиотика имеет слабовыраженный максимум в средней части исследованного температурного диапазона. Такая зависимость для димеров АСТ может быть объяснена тем, что гетероассоциаты ( $A_iC_j$ ) и ( $C_jA_iC_l$ ) разрушаются при более низких температурах по сравнению с димерными ассоциатами антибиотика  $A_2$ , что приводит первоначально к возрастанию содержания димеров АСТ с увеличением температуры и последующему их уменьшению вследствие диссоциации в области более высоких температур. Вклад в общее равновесие в растворе гетероассоциатов ( $A_iC_j$ ) более существен, чем вклад ( $C_jA_iC_l$ ), однако при повышении температуры разница между их относительными содержаниями становится менее значительной. 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.

Довольно большие отрицательные значения энтальпии и энтропии реакции гетероассоциации ароматических молекул АСТ и САФ в водном растворе (табл. 2) позволяют заключить, что дисперсионные взаимодействия играют существенную роль при образовании гетерокомплексов этих молекул. Известно, что дисперсионные взаимодействия характеризуются как отрицательной энтальпией, так и отрицательной энтропией [28]. Сравнение абсолютных значений энтальпии реакций гетероассоциации САФ с АСТ (табл. 2) и с актиномицином  $D$  [19, 20] показывает, что величины  $\Delta H$  для рассматриваемых систем совпадают в пределах погрешности их определения. Близкие значения энтропии и энтальпии для реакций гетероассоциации АСТ и AMD с кофеином позволяют сделать вывод о существенно меньшем вкладе боковых цепей антибиотиков в стабилизацию гетерокомплексов в водном растворе.

Таким образом, проведенный анализ свидетельствует о том, что комплексообразование кофеина с ароматическими феноксазоновыми антибиотиками, несущими существенно различные боковые цепи, характеризуются близкими значениями термодинамических параметров. Это дает основание заключить, что такие гетерокомплексы стабилизируются главным образом дисперсионными взаимодействиями между ароматическими молекулами кофеина и антибиотика в водном растворе. Вместе с тем при интеркаляции феноксазоновых антибиотиков в ДНК характер боковых цепей и их укладка в малой канавке двойной спирали оказывает существенное влияние на антиопухольную активность синтетических аналогов AMD [3].

**Таблица 2.** Термодинамические параметры реакций гетероассоциации кофеина и феноксазоновых антибиотиков (АСТ и AMD) в 0.1 М фосфатном буфере, рD 7.1 при 298 К

Гетеро-ассоциаты	$-\Delta G^0$ , кДж/моль	$-\Delta H^0$ , кДж/моль	$-\Delta S^0$ , Дж/(моль К)
САФ-АСТ	$14.1 \pm 0.2$	$27.0 \pm 2.4$	$43.3 \pm 5.0$
САФ-AMD*	$13.6 \pm 0.4$	$27.2 \pm 4.3$	$45.6 \pm 12.1$

\* Данные взяты из работы [20].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез актиноцил-бис(3-диметиламинопропиламина) проведен, как описано ранее [29, 30], путем окисления производного *орто*-аминофенола *пара*-хиноном, образованным в результате каталитического гидрирования соответствующих амидов 2-нитро-3-бензилокси-4-метилбензойной кислоты. Данные элементного анализа, наличие характеристических полос в ИК-спектрах и характерного для феноксазонового хромфора поглощения в видимой области электронных спектров, а также данные 1D- и 2D-<sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии подтвердили состав и строение полученного соединения [26, 27]. АСТ и САФ растворяли в D<sub>2</sub>O (99.95% дейтерия, Sigma) и лиофилизировали. Растворы готовили путем добавления взвешенного количества образца в дейтерированном 0.1 М фосфатном буфере (рD 7.1, 0.1 мМ EDTA). Концентрацию ароматических молекул в водном растворе определяли спектрофотометрически – для АСТ молярный коэффициент поглощения  $\epsilon_{450} = 36700 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [23], для САФ –  $\epsilon_{273} = 9740 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [31].

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектры измерены на спектрометре Bruker DRX с резонансной частотой 500 МГц. Концентрационные зависимости химических сдвигов протонов измерены в интервале концентраций АСТ от 0.800 до 0.037 мМ при двух температурах 298 и 308 К; температурные зависимости химических сдвигов протонов молекул в смешанном растворе измерены в диапазоне температур от 278 до 348 К. Химический сдвиг определяли относительно 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфо-кислоты, в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония. Методика приготовления образцов и проведения одно- и двумерных (TOCSY, ROESY) <sup>1</sup>H-ЯМР-экспериментов описана в [19, 24].

Пространственное изображение гетерокомплекса получено с помощью программы Mathematica 2.2 (Wolfram Res. Inc.).

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

Работа частично финансировалась Международной программой INTAS (грант INTAS-97-31753).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Au J.L., Panchal N., Li D., Gan Y. // *Pharm. Res.* 1997. V. 14. P. 1659–1667.
2. Lowndes N.F., Murguia J.R. // *Cur. Opin. Gen. Dev.* 2000. V. 10. P. 17–34.
3. Karawajew L., Glibin E.N., Maleev V.Ya., Czerwony G., Dorken B., Davies D.B., Veselkov A.N. // *Anticancer Drug Res.* 2000. V. 15. P. 331–338.
4. Яворская Н.П., Голубева И.С., Кубаева И.Ю., Глибин Е.Н. // *Хим.-фарм. журн.* 1996. Т. 30. С. 22–26.
5. Семенов М.А., Сагайдакова Н.Н., Большух Т.В., Гасан А.И., Круглова Е.Б., Березняк Е.Г., Малеев В.Я., Глибин Е.Н., Овчинников Д.В., Веселков А.Н. // *Биофиз. вестник ХНУ.* 2001. Вып. 3. С. 34–41.
6. Clementz G.L., Dailey J.W. // *Am. Fam. Physician.* 1988. V. 37. P. 167–172.
7. Машковский М.Д. // *Медицина.* 1985. Т. 2. С. 107.
8. Beetham K.L., Busse P.M., Tolmach L.J. // *J. Cell Physiol.* 1983. V. 115. P. 283–289.
9. Selby C.P., Sancar A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. P. 3522–3525.
10. Witte W., Böhme H. // *Mut. Res.* 1972. V. 16. P. 133–139.
11. Fritzsche H., Petri I., Shultz H., Weller K., Sedrema P., Lang H. // *Biophys. Chem.* 1980. V. 11. P. 109–119.
12. Kimura H., Aoyama T. // *J. Pharmacobiodyn.* 1989. V. 12. P. 589–595.
13. Ross W.E., Zwelling L.A., Kohn K.W. // *Int. J. Radiat. Biol. Phys.* 1979. V. 5. P. 1221–1224.
14. Ganapathi R., Grabowski D., Schmidt H., Yen A., Iliakis G. // *Cancer Res.* 1979. V. 46. P. 5553–5557.
15. Iliakis G., Nusse M., Ganapathi R., Egner J., Yen A. // *Int. J. Radiat. Biol. Phys.* 1986. V. 12. P. 1987–1995.
16. Traganos F., Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z. // *Cancer Res.* 1991. V. 51. P. 3682–3689.
17. Larsen R.W., Jasuja R., Hetzler R., Muraoka P.T., Andrada V.G., Jameson D.M. // *Biophys. J.* 1996. V. 70. P. 443–452.
18. Kapuscinski J., Kimmel M. // *Biophys. Chem.* 1993. V. 46. P. 153–163.
19. Davies D.B., Veselkov D.A., Djimant L.N., Veselkov A.N. // *Eur. Biophys. J.* 2001. V. 30. P. 354–366.
20. Веселков Д.А., Кодинцев В.В., Пахомов В.И., Дымант Л.Н., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н. // *Биофизика.* 2000. Т. 45. С. 197–206.
21. Веселков Д.А., Сигаев В.А., Высоцкий С.А., Дымант Л.Н., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н. // *Физ. химия.* 2000. Т. 74. С. 451–459.
22. Веселков Д.А., Сигаев В.А., Высоцкий С.А., Дымант Л.Н., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н. // *Журн. структур. химии.* 2000. Т. 41. С. 86–96.
23. Веселков Д.А., Лантушенко А.О., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н. // *Биоорг. химия.* 2002. Т. 28. С. 379–384.
24. Davies D.B., Veselkov D.A., Veselkov A.N. // *Mol. Phys.* 1999. V. 97. P. 439–451.
25. Giessner-Pretre C., Pullman B. // *Quart. Rev. Biophys.* 1987. V. 20. P. 113–172.
26. Davies D.B., Djimant L.N., Veselkov A.N. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1996. V. 92. P. 383–390.
27. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Болотин П.А., Паркес Х.Г., Дэвис Д.Б. // *Биофизика.* 1996. Т. 41. С. 979–988.
28. Ross R.D., Subramanian S. // *Biochemistry.* 1981. V. 20. P. 3096–3102.
29. Глибин Е.Н., Плеханова Н.Г., Овчинников Д.В., Коршунова З.И. // *Журн. орг. химии.* 1996. Т. 32. С. 406–408.
30. Глибин Е.Н., Овчинников Д.В., Плеханова Н.Г. // *Журн. орг. химии.* 1997. Т. 33. С. 1573–1576.
31. Lilley T.H., Linsdell H., Maestre A. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1992. V. 88. P. 2865–2870.

## Heteroassociation of Caffeine with the Antibiotic Actinocyl-bis(3-dimethylaminopropylamine) in Aqueous Solution: $^1\text{H}$ NMR Analysis

A. N. Veselkov<sup>#</sup>, A. O. Lantushenko<sup>\*</sup>, D. A. Veselkov<sup>\*\*</sup>, and D. B. Davies<sup>\*\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: 38 (0692) 235-251; e-mail: veselkov@sevgtu.sebastopol.ua

<sup>\*</sup> Department of Physics, Sevastopol State Technical University, Streletskaya balka, Sevastopol, Crimea, 99053 Ukraine

<sup>\*\*</sup> School of Biological and Chemical Sciences, Birkbeck College, University of London, Gordon House, 29 Gordon Square, London WC1H 0PP

The heteroassociation of caffeine (CAF) and the synthetic antibiotic actinocyl-bis(3-dimethylaminopropylamine) (ACT) was studied in aqueous solution by one- and two-dimensional  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy at 500 MHz. The equilibrium reaction constants, thermodynamic parameters ( $\Delta H$  and  $\Delta S$ ) of ACT heteroassociation with CAF, the limiting values of proton chemical shifts of their molecules in the heteroassociation complex, and the spatial structure of the ACT-CAF complex were determined from the experimental dependences of proton chemical shifts of the aromatic molecules on concentration and temperature. The parameters of CAF heteroassociation with the phenoxazine antibiotic actinomycin D and its synthetic analogue ACT were comparatively analyzed and conclusions were made on the crucial role of stacking interactions of the chromophores of CAF and the phenoxazine antibiotics in the formation of the heterocomplexes in aqueous solution. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* actinomycin D synthetic analogue, antitumor antibiotic, caffeine, heteroassociation, NMR spectroscopy