



УДК 577.182.99.03 : 543.422.27

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ
ПИРИМИДОТРИАЗИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

Орлов В. С., Богданов Г. Н., Эмануэль Н. М.

Отделение Института химической физики Академии наук СССР,
Черноголовка, Московской области

Есипов С. Е., Навашин С. М.

Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков, Москва

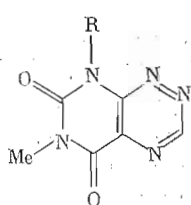
Спектры ЭПР анион-радикалов пириимидотриазиновых антибиотиков: реумицина, фервенеулина, 7-О-метилреумицина, ксантотрицина — получены при их химическом и ферментативном восстановлении при различных рН. В присутствии кислорода эти анион-радикалы легко образуют супероксидные радикалы. Высказано предположение, что большая избирательность противоопухолевого действия реумицина обусловлена разными потенциалами восстановления нейтральной и ионизированной форм молекул антибиотика. Эффективность реумицина, вероятно, можно повысить, снижая рН внутри опухолевых клеток путем интенсификации гликолиза, например при введении глюкозы.

Недавно разработанная новая классификация противоопухолевых соединений по типу их химической реакционной способности [1] позволяет систематизировать данные о химических и биологических механизмах действия препаратов сложного строения, к числу которых относится большинство противоопухолевых антибиотиков. С этих позиций представляет интерес влияние полярных факторов в реализации свободнорадикальных механизмов биотрансформации нового класса противоопухолевых препаратов — пириимидотриазиновых антибиотиков.

Действительно, методом ЭПР доказано, что при электрохимическом восстановлении пириимидотриазинов возникают устойчивые анион-радикалы [2]. *In vivo* восстановление пириимидотриазинов катализируют ферментные системы клеток; *in vitro* для изучения этого процесса можно использовать микросомы, где локализована система превращений и детоксикации ксенобиотиков. Показано, что антибиотики этого ряда способны акцептировать электрон с NADH-цитохром- b_5 — редуктазой цепи [3].

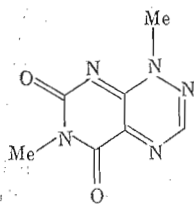
Цель настоящей работы состояла в изучении свободнорадикальных промежуточных соединений, образующихся при химическом и ферментативном восстановлении пириимидотриазиновых антибиотиков, а также в исследовании влияния кислотно-основных свойств пириимидотриазинов на процессы их биотрансформации.

В работе изучены реумицин (I), фервенеулин (II), ксантотрицин (III) и 7-О-метилреумицин (IV).

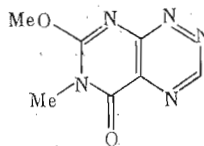


(I): R=H

(II): R=Me



(III)



(IV)

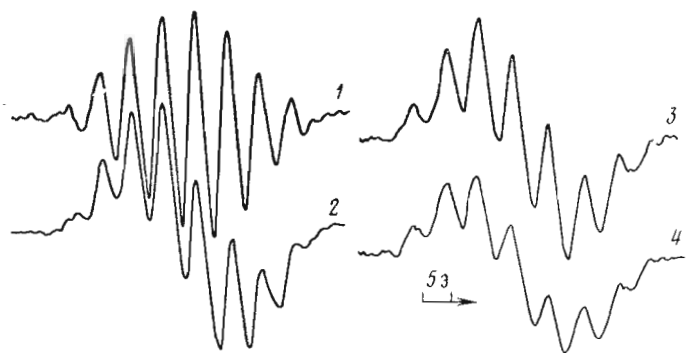


Рис. 1. Спектры ЭПР анион-радикалов реумицина (I), полученных при восстановлении KBH_4 при pH 9,0 (1) и 4,0 (3), а также при микросомном восстановлении в присутствии NADPH при pH 8,0 (2) и 6,0 (4)

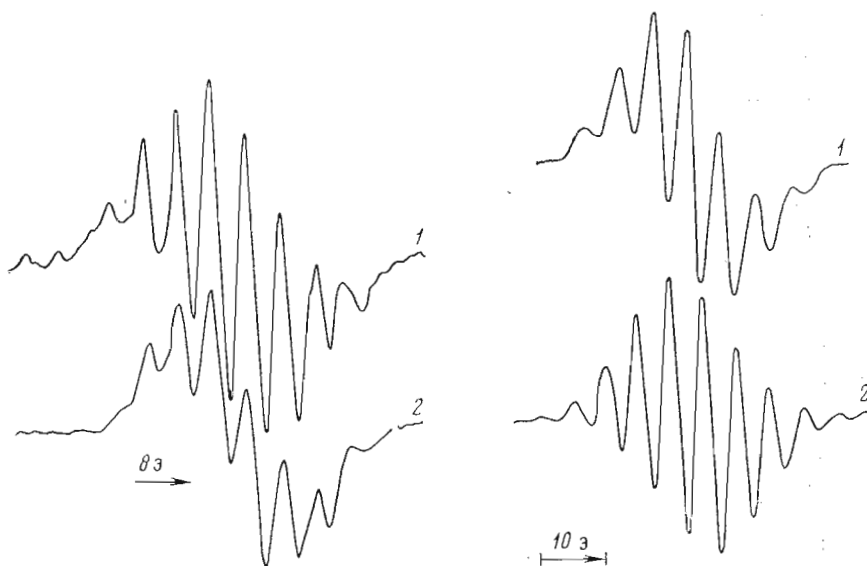


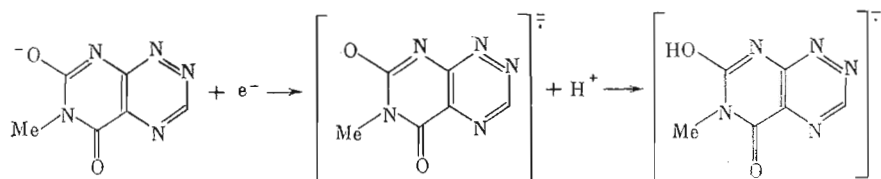
Рис. 2

Рис. 3

Рис. 2. Спектры ЭПР анион-радикалов соединения (IV), полученных при химическом восстановлении KBH_4 (pH 4,0) (1) и микросомном восстановлении в присутствии NADPH (pH 8,0) (2)

Рис. 3. Спектры ЭПР анион-радикалов ферредоксина (II) и ксаитотрицина (III), полученных при ферментативном восстановлении в микросомах в присутствии NADPH (pH 7,8)

Реумицин восстанавливали при различных pH химически, KBH_4 , и ферментативно в микросомах в присутствии NADPH. При восстановлении реумицина в щелочной среде (химическое восстановление проведено при pH 9,0, а микросомное при pH 8,0) спектр ЭПР представлял собой октэт линий с константами расщепления — $a_H \approx a_N \approx 5,7$ э на трех эквивалентных атомах азота и атоме водорода триазинового цикла (см. спектры 1 и 2 на рис. 1). При микросомном восстановлении метилированного производного реумицина (IV) был зарегистрирован аналогичный восьмикомпонентный спектр (рис. 2), откуда следует, что электронная структура и распределение спиновой плотности в анион-радикалах соединений (I) и (IV) близки между собой. Поскольку при pH 8 реумицин ($pK_a=6,5$) находится преимущественно в анионной форме, можно предположить, что в микросомах происходит одноэлектронное ферментативное восстановление аниона реумицина до дианион-радикала, в котором атом кислорода в 7-м положении быстро протонируется:



Спектр ЭПР анион-радикала реумицина, однако, отличается от спектра анион-радикала, полученного при электрохимическом восстановлении 7-О-метилреумицина в диметилформамиде [2], что, вероятно, объясняется особенностями реакции в апротонной среде.

В кислой среде, когда восстанавливаются неионизованные формы антибиотиков (химическое восстановление проводили при pH 4,0, а ферментативное при pH 6,0), спектры ЭПР меняются. Так, анион-радикалу, образующемуся из реумицина, отвечает семикомпонентный спектр с константами расщепления ($a_N=5,6$ э) на ядрах трех приблизительно эквивалентных атомов азота триазинового цикла (см. спектры 3 и 4 на рис. 1). При меньшей модуляции видно дальнейшее расщепление этих семи линий.

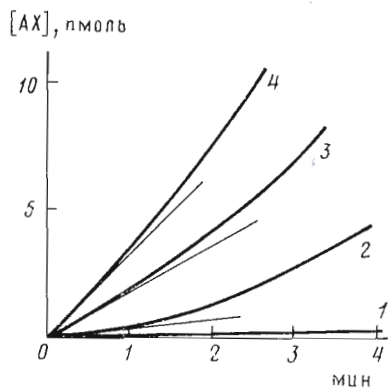
Аналогичный спектр был зарегистрирован при микросомном восстановлении фервинулина (см. спектр 3 на рис. 3). Вероятно, замена атома водорода на метильный остаток в 8-м положении не влияет на характер распределения спиновой плотности в анион-радикалах. При микросомном восстановлении ксантотрицина был получен 10-компонентный спектр (см. спектр 3 на рис. 2), обусловленный расщеплением на трех эквивалентных атомах азота и трех атомах водорода метильной группы в триазиновом фрагменте. По-видимому, спиновая плотность в анион-радикалах пиримидотриазинов локализована преимущественно в триазиновом цикле. Можно отметить, что при электрохимическом восстановлении фервинулина и ксантотрицина в диметилформамиде были зарегистрированы такие же спектры ЭПР с несколько различающимися значениями констант сверхтонкого расщепления [2].

В биологических системах в зависимости от pH может восстанавливаться как реумицин, так и его анион. Анион реумицина восстанавливается труднее, так как его потенциал восстановления выше (соответственно $E_{1/2}^a = 1,86$ и $E_{1/2}^H = 1,28$ В [1]).

Образующиеся в биологических системах анион-радикалы антибиотиков могут гибнуть, передавая электрон кислороду с образованием супероксидных радикалов. Скорость образования супероксидных радикалов удобно оценивать по окислению в микросомах адrenaлина до адренохрома [4]. Добавление супероксиддисмутазы (10 мкг/мл) полностью ингибирует образование адренохрома.

Нами была изучена генерация супероксидных радикалов пиримидотриазиновыми антибиотиками в микросомах печени крыс (рис. 4). В отсутствие NADPH скорость образования этих радикалов в микросомах очень мала ($0,3$ нмоль \cdot (мг белка) $^{-1} \cdot$ мин $^{-1}$) и не увеличивается при добавлении реумицина, который в этих условиях не восстанавливается до анион-радикала. В присутствии NADPH наблюдается перенос электронов с NADPH на кислород с образованием супероксидных радикалов ($1,8$ нмоль \cdot (мг белка) $^{-1} \cdot$ мин $^{-1}$). При добавлении в систему реумицина скорость образования супероксидных радикалов резко увеличивается ($6,5$ нмоль \cdot (мг белка) $^{-1} \cdot$ мин $^{-1}$) благодаря переносу электронов на кислород с анион-радикалов антибиотика. В этих условиях спектры ЭПР анион-радикалов реумицина регистрировались только после исчерпания кислорода, подобно тому как это наблюдалось нами с антрациклиновыми антибиотиками [5]. Ксантотрицин, обладающий наименьшим потенциалом восстановления [2], способен восстанавливаться в микросомах без добавления NADPH. Анион-радикалы ксантотрицина наименее стабильны и генерируют супероксидные радикалы с наибольшей скоростью ($11,1$ нмоль \cdot (мг белка) $^{-1} \cdot$ мин $^{-1}$). Вероятно, именно этим можно объяснить высокую токсичность ксантотрицина и его низкий терапевтический индекс. Это подтверждает выска-

Рис. 4. Кинетика окисления адреналина в адrenoхром (АХ) в микросомах печени крыс (рН 7,8) в присутствии реумидина (1), NADPH (2), реумидина и NADPH (3), ксантотрицина (4)



занные ранее положения о роли легкости образования и стабильности промежуточных активных форм противоопухолевых препаратов на избирательность их действия [6].

Совокупность полученных данных позволяет высказать некоторые предположения относительно возможных молекулярных механизмов токсического и противоопухолевого действия активных свободнорадикальных форм пиримидотриазиновых антибиотиков. Можно указать по крайней мере три возможных механизма действия:

- 1) потребление кислорода и субстратов восстановления, вызывающее гипоксию и нарушение дыхания;
- 2) генерация супероксидных, гидроксильных и перекисных радикалов;
- 3) ковалентное связывание активных радикальных форм антибиотиков с макромолекулами.

Сопоставление реумидина с другими антибиотиками этого ряда позволяет объяснить его более высокую избирательность противоопухолевого действия. В опухолевых клетках, где рН ниже, чем в нормальных [7], равновесие диссоциации реумидина смещено в сторону неионизированной формы. Эта форма благодаря меньшему потенциалу восстановления легче превращается в анион-радикалы и в силу указанных выше причин проявляет более выраженное цитотоксическое действие. В нормальных клетках при $\text{pH} \approx 7,5$ реумидин находится на 90% в ионизированной форме, способность к восстановлению у которой значительно ниже. Возможно, реумидин должен быть более эффективен при лечении опухолей с низким значением внутриклеточного рН. С другой стороны, эффективность реумидина, вероятно, можно повысить, если искусственно увеличить кислотность опухолевых клеток, интенсифицируя гликолиз, например подняв концентрацию глюкозы в крови.

Экспериментальная часть

Реумидин (I) и продукты его метилирования (II) — (IV) получили по описанной ранее методике [8].

Спектры ЭПР регистрировали при комнатной температуре в плоской ячейке на спектрометре E-104 (Varian, США). Концентрация веществ составляла $(1-5) \cdot 10^{-3}$ М. Микросомы, полученные по методике [9], замораживали в жидком азоте и перед экспериментом размораживали. Концентрация белка в препаратах микросом составляла 15 мг/мл.

Скорость образования O_2^- определяли по скорости образования адrenoхрома из адреналина при 28°C на спектрометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss, ГДР). К 2 мл раствора микросом в 0,15 М фосфатном буфере (рН 7,8), содержащего 0,35 мг/мл белка, добавляли 20 мкл раствора антибиотика $5 \cdot 10^{-2}$ М, 20 мкл 0,1 М раствора адреналина и 20 мкл $2 \cdot 10^{-2}$ М раствора NADPH. Скорость образования адrenoхрома определяли по изменению поглощения при 480 нм, используя коэффициент экстинкции $4,02 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Эмануэль Н. М. В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Матер. Всес. совещания. Черноголовка, 1980, т. 1, с. 7-18.
2. Казакова В. М., Макаров Н. Г., Милина Н. Е., Есипов С. Е., Чернышев А. И. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1404-1408.
3. Акименко В. К., Головченко Н. П., Есипов С. Е., Сабурова Л. А., Терентьева Т. Г. В сб.: Противоопухолевые антибиотики. Советско-итальянский симпозиум. М.: 1975, с. 238-251.
4. Брусов О. С., Герасимов А. М., Панченко Л. Ф. Бюл. exper. биол. и мед., 1976, № 1, с. 33-35.
5. Орлов В. С., Лужков В. Б., Богданов Г. Н. В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Матер. II Всес. совещания. Свердловск - Черноголовка, 1982, с. 30-32.
6. Богданов Г. Н., Эмануэль Н. М. В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Матер. II Всес. совещания. Свердловск - Черноголовка, 1982, с. 22-25.
7. Сибельдина Л. А., Сенетов Н. Ф., Коновалова Н. П., Васильева Л. С. В сб.: Всес. симпозиум «Магнитный резонанс в биологии и медицине». Черноголовка: 1981, с. 197-198.
8. Esipov S. E., Kolosov M. N., Saburova L. A. J. Antibiot., 1973, v. 26, № 9, p. 537-538.
9. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Учебное пособие/Ред. Прохорова М. И. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982, с. 33.

Поступила в редакцию
4.X.1982

FREE RADICAL MECHANISMS OF ACTION OF PYRIMIDO-TRIAZINE ANTIBIOTICS

ORLOV V. S., BOGDANOV G. N., EMANUEL N. M., ESIPOV S. E.,
NAVASHIN S. M.

*Department of the Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Chernogolovka; All-Union Institute of Antibiotics, Moscow*

EPR spectra of anion radicals were recorded as a result of chemical or enzymatic reduction at various pH of the pyrimido-triazine antibiotics. These anion radicals easily form superoxide radicals in the presence of oxygen. It is supposed that a higher selectivity of reumycin action is due to difference in the redox potentials of the neutral and ionized antibiotic forms. A possibility of enhance the reumycin potency may involve the pH lowering inside the tumor cells - for example, by glucose injections.