

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА
БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 541127; 541.124.542.91; 547.563.4; 547.391

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИОКСИДАНТА
2-(КАРБОКСИ)-2-(N-АЦЕТИЛАМИНО)-3-(3,5-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛ-4-
ГИДРОКСИФЕНИЛ)ПРОПИОНАТА НАТРИЯ С ПЕПТИДАМИ В ВОДНОЙ
СРЕДЕ ПО ДАННЫМ РАСЧЕТА МЕТОДАМИ КВАНТОВОЙ ХИМИИ

© 2020 г. А. А. Володькин^{1*}, В. Н. Ерохин¹, Е. М. Миль¹, А. А. Албантова¹, В. И. Бинюков¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: AlVolodkin@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.09.2018;

после доработки 11.11.2019;

принята в печать 20.11.2019

Противоопухолевые свойства антиоксиданта-2-(карбокси)-2-(N-ацетиламино)-3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропионата натрия изучались на асцитной опухоли — саркоме 37 и на солидной опухоли — карциноме Льюис. Обнаружено полное торможение саркомы 37 при внутрибрюшинном введении препарата и усиление апоптоза (снижение уровня антиапоптозного белка Bcl-2) в клетках карциномы Льюис. Квантовохимическим методом осуществлен расчет структуры комплексов 2-(карбокси)-2-(N-ацетиламино)-3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропионата натрия с пептидами. Получены количественные данные, характеризующие внутри- и межмолекулярные взаимодействия вышеуказанных компонентов в наноассоциатах.

Ключевые слова: саркома 37, карцинома Льюис, белок Bcl-2, апоптоз, молекулярное моделирование, квантовая химия, наноассоциаты, энтропия, энтальпия, пептид, антиоксидант.

DOI: 10.31857/S0207401X20050131

ВВЕДЕНИЕ

Компьютерный дизайн становится важнейшей составляющей процесса рациональной разработки новых лекарственных препаратов [1] и новым инструментом исследований в молекулярной биологии и фармацевтике. Компьютерное моделирование имеет значение при исследовании таких проблем, как возникновение генетического кода [2], и рассматривается в качестве пути к управлению биохимическими процессами [3]. Описание механизмов трансформации молекул пептидов и белков — одна из неотложных задач молекулярной биоинженерии [4]. Одним из подходов в разработке нового лекарственного препарата является поиск веществ, способных связываться с выбранным белком-мишенью и блокировать пролиферацию клеток.

При построении квантовохимической модели этого взаимодействия возникает задача поиска глобального минимума энергии системы, заданной в многомерном пространстве. Несмотря на полуэмпирический характер программ серии NDDO, последние имеют преимущества перед программами *ab initio* вследствие существенно более высокой скорости и в настоящее время ис-

пользуются в практике расчетов биологических объектов [5]. Наиболее содержательно этот вид вычислительных программ оформлен в пакете программ МОРАС [6–8].

Цель настоящей работы — продолжение исследований биологических свойств антиоксиданта 2-карбокси-2-(N-ацетиламино)-3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропионата натрия (соединение 1) [9] — противоопухолевого препарата [10]. Это соединение образует кристаллогидраты, а в водной среде — ассоциаты [11]. По расчетным данным антиокислительная активность, свободная энергия и энтропия ассоциата зависит от его структуры. Это соединение обладает широким спектром биологической активности и исследовано при некрозе вследствие термического ожога у животных [10], в условиях стресса [12, 13], а также при воздействии на эритроциты [14]. В этих случаях соединение 1 проявило высокую активность в качестве антиоксиданта. Однако строение этого соединения предполагает возможность его участия во взаимодействии с пептидами по иному механизму — с участием атома натрия. Такой подход для понимания взаимодействия белков и пеп-

тидов с соединением **1** является перспективным, что определяет актуальность исследования в целом.

В настоящей работе квантовохимическим методом осуществлен расчет структур комплексов соединения **1** с молекулами ряда пептидов и H_2O и установлено строение этих комплексов, а также найдены изменения свободной энергии и энтальпии при их образовании. Указанные термодинамические функции являются физическими критериями реакционной способности соединения **1** по отношению к биологическим объектам, и такой подход в поиске биологически активных соединений уже применялся ранее [5]. Поэтому исследования роли молекул воды в образовании водородных связей с молекулами пептидов и соединения **1** актуальны, так как участие воды в биологической жизни очевидно.

В экспериментах на мышах с саркомой 37 показано, что препарат количественно подавляет развитие опухоли. При исследовании апоптоза опухолевых клеток карциномы Льюис установлено снижение содержания антиапоптозных белков, что приводит к гибели опухолевых клеток путем апоптоза. Расчет структуры комплексов соединения **1** апоптозным пептидом Mcl-1 из домена ВНЗ белка Bcl-2 [15] указывает на увеличение свободной энергии, т.е. исследуемое соединение изменяет свойства этого пептида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Квантово-химические расчеты

Метод PM7 является последним по времени создания в семействе методов NDDO [5, 8]. В нем улучшено описание дисперсионных взаимодействий, а также образования водородных связей за счет введения на стадии параметризации поправок, аналогичных использованным в методе функционала плотности DFT (density functional theory). Эти поправки в методе PM7 включаются в расчет на стадии параметризации, для которой были использованы экспериментальные и высокоуровневые *ab initio* данные для ранее известных соединений (подробнее см. в [5]).

Расчет многокомпонентных систем, состоящих из двух соединений, взаимодействующих в водной среде, накладывает определенные условия на создание файла с исходными данными. Исходные начальные конфигурации рассматриваемых молекулярных систем описаны в работе [11]. Первую структуру H_2O в исходном файле фиксировали путем создания строки в комбинации $HNO-Na$. Последующие структуры H_2O фиксировали путем создания строк в комбинациях $HNO-[HNO]_m-HNO-Na$. Координаты молекул H_2O в окружении структуры соединения **1** программа находила по минимуму энергии образования. При моделировании исходных данных

молекул пептидов атом H^n , где n есть n^{-1} , n^{-3} , n^{-4} , — соответствующие координаты в структуре молекулы из комбинации $H^nHO-[HNO]_m-HNO-Na$ заменяли на атом Н карбоксильной группы аминокислоты (аспарагина) и далее последовательно конструировали исходные данные атомов O^{n+1} ($n - n^{-1}$, n^{-3}) и C^{n+2} (карбоксильной группы аминокислоты) в многомерном пространстве. Координату Н с индексом n переформатировали в координату с индексом n^{-1} , n^{-2} . При оптимизации энергии системы варьировались внутренние координаты всех атомов нейтральных молекул. В рассматриваемой системе внутреннее вращение ограничено образованием водородных связей и наличием заместителей с заторможенным вращением (*трет-*бутильные группы и наличие заместителей у одного из углеродных атомов). В данной работе расчет останавливается при глобальном минимуме образования, что соответствует структуре, в которой заместители в молекулах пептидов находятся в *транс*-положении. Для расчета по модели COSMO в командную строку дополнительно вводили ключ расчета в следующем виде: $Nspa = 60$ $gradients$ $1SCF$ $eps = 78.4$ $charge = 0$.

Противоопухолевая активность

Противоопухолевые свойства соединения **1** изучались на мышах весом 18–22 грамма с асцитной саркомой 37 при внутрибрюшинной трансплантации $\sim 10^6$ опухолевых клеток в 0.2 мл асцитической жидкости, разведенной физиологическим раствором по методу [10]. Для построения кинетических кривых роста опухоли забивали по несколько животных и определяли у каждого из них объем асцитической жидкости и общее количество взвешенных в ней опухолевых клеток.

Влияние на апоптоз опухолевых клеток карциномы Льюис изучали в опытах *ex vivo* смешиванием суспензии опухолевых клеток в питательной среде 199 (концентрация $5 \cdot 10^8$ кл/мл) с раствором соединения **1**. Суспензию клеток делили на две части по 2 мл каждая. К одной части добавляли среду 199, а к другой — такой же раствор соединения **1** в концентрации 2.5 мг/мл. Соответствующим образом готовили контрольный образец, где вместо раствора соединения **1** использовали среду 199. Суспензию опухолевых клеток с соединением **1** инкубировали при 37°C от 0.5 до 3 ч. Далее методом иммуноблоттинга [16] определяли содержание антиапоптозного белка Bcl-2 с помощью антител “Monoclonal Anti-BCL-2 clone ab 32124” и препарата “кроличьи антитела Ig G” компании Sigma-Aldrich. Визуализацию полос белка на нитроцеллюлозной мембране проводили с помощью набора Kit компании Sigma-Aldrich. Затем после оптического сканирования и обработки сканов исследуемых полос с использо-

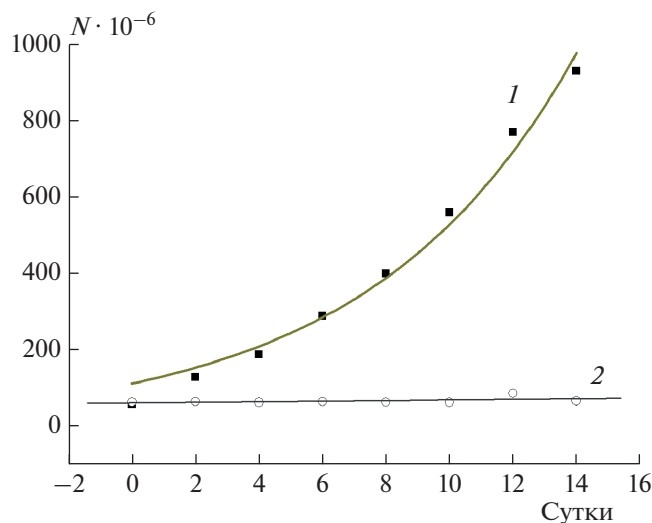


Рис. 1. Зависимости роста количества (N) опухолевых клеток саркомы 37 в контроле (1) и в присутствии соединения 1 (2).

ванием программы BMP Scale проводили расчет оптической плотности каждой полосы на компьютере, что пропорционально концентрации белков.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Свойства водорастворимого антиоксиданта 1 в водной среде в присутствии пептида представляют интерес как в плане влияния на него белков и отдельных пептидов, так и возможности взаимодействия с полярными группами молекул, выбранных для расчета пептидов. При инъекции соединения 1 мышам в дозе 10 и 100 мг/кг спустя сутки после трансплантации, наблюдалось практически полное торможение опухолевого роста (рис. 1, кривая 2) при экспоненциальном росте показателей опухолевого роста в контроле (рис. 1, кривая 1).

Изучение процесса апоптоза в опухолевых клетках на примере карциномы Льюиса показало, что соединение 1 усиливает апоптоз опухолевых клеток. На рис. 2 приведены результаты эксперимента по измерению методом иммуноблоттинга уровня гомодимера антиапоптозного белка Bcl-2 в суспензии опухолевых клеток карциномы Льюис при инкубации с соединением 1. Содержание димера Bcl-2 (51 кДа) в присутствии соединения 1 существенно снижается с 1-го по 3-й час инкубации, что может привести к изменению баланса в системе про- и антиапоптозных белков и к запуску процесса апоптоза.

Также наблюдали снижение содержания белка мономера Bcl-2 (26 кДа) на 40–50% в течение первых 1–1.5 ч, которое несколько увеличивается к

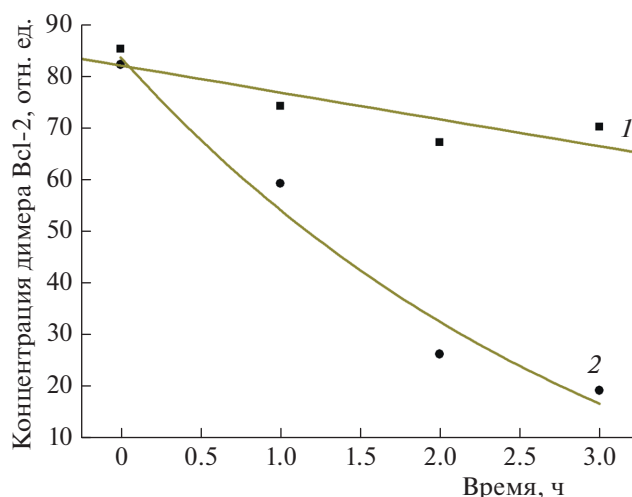


Рис. 2. Изменение концентрации димера белка Bcl-2 в суспензии клеток карциномы Льюис в контроле (1) и при инкубации соединением 1 (2) в течение 0–3 ч.

3-му часу инкубации, возможно, за счет распада димера (рис. 3). При этом в контрольной группе уровень антиапоптозного белка оставался достаточно стабильным в течение 3 ч.

Факт снижения содержания белка Bcl-2, по-видимому, связан с воздействием соединения 1 на внутриклеточные мишени путей апоптоза. Как следует из данных работы [15], белок Bcl-2 состоит из нескольких групп полипептидов, объединенных в домены. В настоящей работе для расчета структуры выбрана молекула пептида Mcl-1 домена ВН3, состоящая из цепочки аминокислот лейцин – аргинин – аргинин – глицин – аспарагиновая кислота – аргинин, в молекуле белка Bcl-2. Из

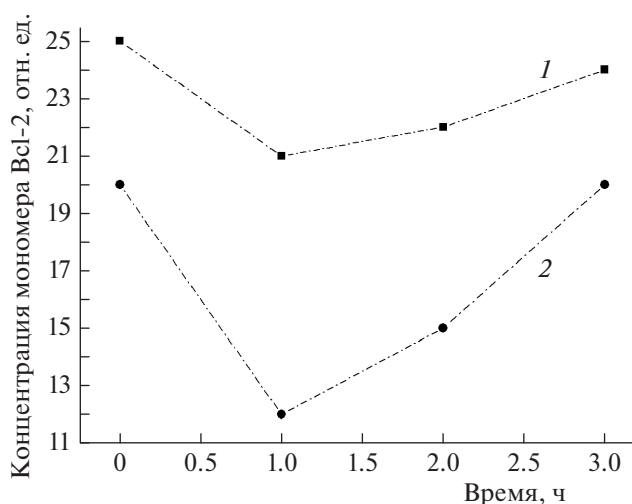


Рис. 3. То же, что и на рис. 2, но для мономера белка Bcl-2 в суспензии клеток карциномы Льюис.

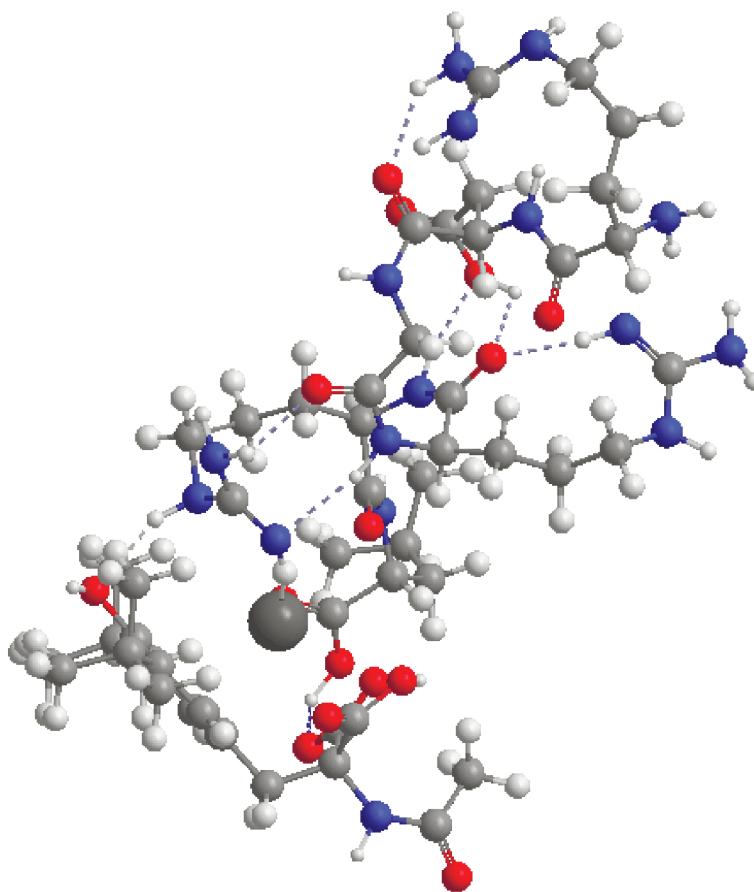


Рис. 4. Структура комплекса соединения **1** с пептидом Mcl-1 белка Bcl-2.

расчета комплекса соединения **1** пептидом Mcl-1 (рис. 4) следует, что при его образовании уменьшается энтропия ($\Delta S = -92.12 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{град}$; 298 K) по сравнению с суммой энтропий индивидуальных компонентов. Изменение энтальпии $\Delta H^\circ \sim 7 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, что свидетельствует об увеличении свободной энергии комплекса соединения **1** с пептидом Mcl-1. Эти данные указывают на возможность взаимодействия соединения **1** с антиапоптозными белками семейства Bcl-2 опухолевых клеток.

В структуру соединения **1** включены фрагменты *трет*-бутильных групп в 2,6-положениях молекулы фенола и функциональные заместители производных ацетиламиномалоновой кислоты с участием атома натрия. Указанное сочетание заместителей в молекуле ограничивает свободное вращение и позволяет стабилизировать структуры, находящиеся в виде ассоциатов [9]. В расчете структуры комплекса соединения **1** с молекулами H_2O использовали ассоциат с глобальным максимумом образования [11]. В такой структуре атом натрия связан с двумя атомами кислорода карбонильных групп и сохраняет свое положение в

окружении 12 молекул H_2O . Такому составу соответствует кристаллогидрат соединения **1**. Исследование структуры комплексов соединения **1**, молекул H_2O и пептидов методом квантовой химии является одним из этапов установления механизма дезактивации пептидов в биологической среде. Количественную оценку этого механизма, связанного со структурными изменениями пептидов, можно получить в результате термодинамического расчета изменения энтропии в начальном и конечном состояниях системы. Поскольку в молекулах пептида, полипептида или белка концевой группой является карбоксильная группа, то при расчете вид пептида не важен. Результат будет зависеть от координации атома металла в структуре соединения **1** с карбоксильной группой молекулы пептида.

Проведены расчеты трехкомпонентной системы, состоящей из молекул соединения **1**, 12 молекул H_2O и ряда пептидов. В пептидах были использованы аминокислоты с полярными группами и аминокислоты с алкильными заместителями. Что касается торсионных степеней свободы, то этот подход справедлив для пептидов, содержащих

Таблица 1. Энергии образования, энтальпии и энтропии наноассоциатов, образованных из трех компонентов: соединения 1, 12 молекул H₂O и пептида

Номер структуры	Пептид	Энергия образования H_f , кДж · моль ⁻¹	Энтальпия H° , кДж · моль ⁻¹	Энтропия S , Дж · моль ⁻¹ · град (298 К)
1	—	4627.51	175.17	1509.06
2	Asn—Ser—Cys	6060.87	236.11	1947.21
3	Asn—Ser—Cys—Ala	6244.38	248.63	2016.06
4	Asn—Ser—Cys—Ala—LLe	6552.73	276.38	2236.47
5	Asn—Ser—Cys—Ala—Lle—Thr	6929.27	299.12	2412.36
6	Asn—Ser—Cys—Ala—Lle—Thr—Asn	7531.73	319.02	2512.18
7	Asn—Ser—Cys—Ala—Lle—Thr—Asn—Orn	7819.48	343.01	2686.07
8	Asn—Ser—Cys—Ala—Lle—Thr—Asn—Orn—Gln	8240.83	369.60	2882.44

только алкильные заместители в пептидной цепочке. В данном исследовании использовались пептиды из аминокислот с функциональными группами в заместителях, что приводит к образованию внутримолекулярных водородных связей (внутренний скелет). Разрушение внутреннего скелета у белков приводит к потере биологической активности.

Для расчета были выбраны структуры восьми аминокислот: аспарагина (Asn), серина (Ser), цистина (Cys), аланина (Ala), изолейцина (Ile), треонина (Thr), орнцина (Orn), глутамина (Gln).

Термодинамические величины при учете движения молекул рассчитывали с учетом жесткости структур. Результаты квантовохимических расчетов структур 2–8, представлены в табл. 1.

Наноассоциаты 2–8 представляют собой образования из трех компонентов: соединения 1, 12 молекул H₂O и пептида. В зависимости от природы пептида взаимное расположение молекул этих компонентов изменяется. Наиболее подвижной является структура из 12 молекул H₂O, которая преимущественно локализована между молекулами соединения 1 и пептидом (рис. 5).

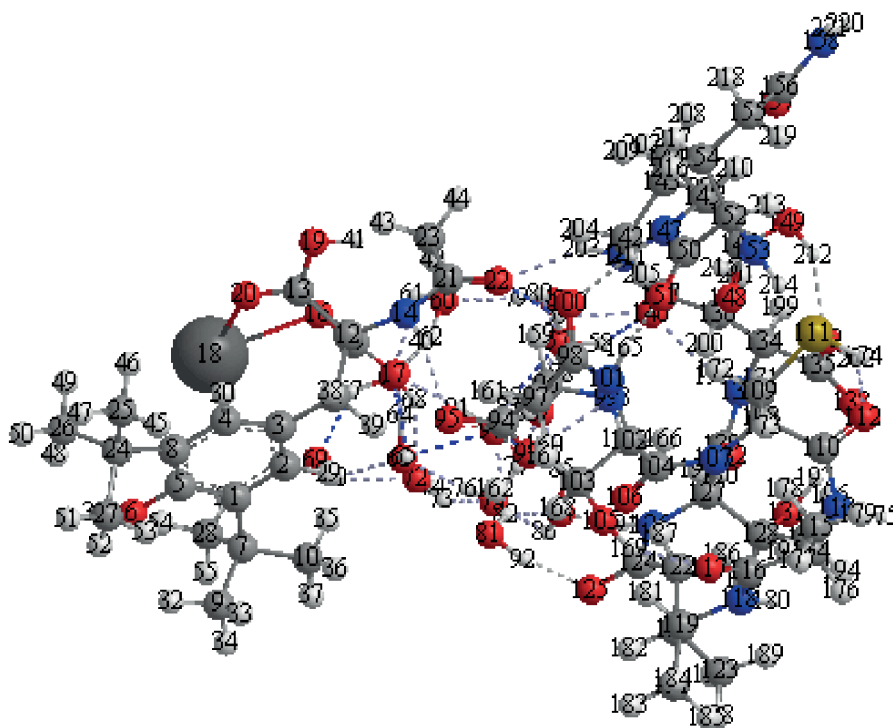


Рис. 5. Структура наноассоциата 8.

Таблица 2. Характерные длины водородных связей между атомами кислорода и водорода в наноассоциатах 2–8

Номер структуры	Длина водородной связи О–Н, Å							
	O17–H62	O95–H40	O100–H41 H202 H211	O112–H185 H193 H202	O117–H137 H144 H152 H160 H169	O132–H153 H144 H160 H170	O139–H212	O148–H156
2	1.819	1.744	H41 1.838	—	—	—	—	—
3	—	1.724	H41 1.817	—	—	—	—	—
4	1.867	1.834	H41 1.692	—	H137 2.065	—	—	—
5	—	1.859	H41 1.758	—	H144 1.942	H144 1.942	—	—
6	—	2.378	—	H185 1.790	H152 1.955	H153 2.009	—	—
7	—	1.928	H202 2.073	H193 1.792	H160 2.013	H160 2.013	—	1.901
8	1.928	1.902	H211 1.952	H202 1.793	H169 2.031	H170 2.118	2.072	—

На рис. 4 представлены два обособленных компонента, а на рис. 5 три компонента образуют единое целое, причем молекулы H_2O образуют с молекулой соединения **1** и пептидом многочисленные водородные связи, длины которых определяли по расстояниям между соответствующими атомами. Например, связь с пептидом происходит посредством цепочки из водородных связей (табл. 2): O(17)–H(62)–O(66)–H(68)–O(72)–H(73)–O(75)–H(86)–O(84)–H(191), где номера в скобках соответствуют номерам атомов в исходных данных.

Молекула соединения **1** состоит из 56 атомов (номера 1–56), 12 молекул H_2O представлены номерами атомов от O(57) до H(91) и далее – номера пептидов от H(92) до H(221). Номер O(17) при-

надлежит карбоксильной группе молекулы **1**, O(95) – молекуле пептида. Номера O(66) и O(84) связаны с атомами кислорода молекул H_2O . Атом водорода H(41) является атомом молекулы соединения **1**. Атомы водорода от номера H(137) и выше принадлежат структурам пептида. В структурах пептидов с атомами O(100), O(112), O(117), O(132) водородные связи образуются с различными атомами водорода в порядке увеличения пептидной цепочки из аминокислот. Данные, по изменению энтальпии и энтропии наноассоциатов (**2–8** в зависимости от количества и природы аминокислот в структуре пептида представлены в табл. 3.

Таблица 3. Изменения энтальпии, энтропии и свободной энергии при межмолекулярном взаимодействии соединения 1, молекул воды и молекул пептида в зависимости от строения наноассоциата

Номер структуры	Пептид			Наноассоциат		
	состав из аминокислот	энтальпия H° , кДж · моль ⁻¹	энтропия S , Дж · моль ⁻¹ · град (298 К)	ΔH° , кДж · моль ⁻¹	ΔS , Дж · моль ⁻¹ · град (298 К)	ΔE , кДж · моль ⁻¹
2	Asn–Ser–Cys	66.17	730.58	+5.23	+292.43	–81.91
3	Asn–Ser–Cys–Ala	81.84	857.19	+8.38	+350.19	–95.98
4	Asn–Ser–Cys–Ala–LLe	112.15	1094.91	+10.99	+367.50	–98.53
5	Asn–Ser–Cys–Ala–LLe–Thr	135.60	1286.27	+11.65	+382.97	–102.48
6	Asn–Ser–Cys–Ala–LLe–Thr–Asn	157.04	1437.75	+13.19	+434.62	–116.33
7	Asn–Ser–Cys–Ala–LLe–Thr–Asn–Orn	181.00	1623.93	+13.16	+446.97	–120.04
8	Asn–Ser–Cys–Ala–LLe–Thr–Asn–Orn–Gln	207.91	1839.07	+13.48	+465.69	–125.32

Расчеты однозначно указывают на существенное увеличение энтропии при образовании наноассоциатов, т.е. этот процесс может протекать самопроизвольно с уменьшением свободной энергии. Из данных табл. 2 следует, что процесс сопровождается преимущественно взаимодействием соединения 1 с пептидом посредством водородных связей молекул H₂O.

Влияние внешних факторов на строение и свойства наноассоциатов исследовано в модели COSMO, имитирующей воздействие континуальной воды на наноассоциат. Свойства наноассоциатов 2–8 в модели COSMO не соответствуют данным, приведенным в табл. 3. Результаты расчетов указывают на то, что при значении диэлектрической энергии, равном ~3.4 эВ, энтропия наноассоциата 8 составляет 678.89 ед., что на 1.5% меньше исходного значения (табл. 3), но при этом геометрические параметры и структура наноассоциата сохраняются. Уменьшение величины энтропии может указывать на увеличение свободной энергии, что согласуется с данными сравнения расчетных полных энергий (total energy) в модели COSMO (~–21107.41 эВ) и энергий расчета в PM7 (~–21104.37 эВ).

ВЫВОДЫ

Установлено, что антиоксидант 2-(карбокси)-2-(N-ацетиламино)-3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидро-

ксифенил)пропионат натрия тормозит развитие асцитной саркомы 37 и вызывает снижение уровня антиапоптозного белка Bcl-2 в суспензии клеток карциномы Льюис, что связано, по-видимому, с усилением апоптоза в опухолевых клетках под влиянием препарата.

Квантово-химическим методом осуществлен расчет структур, образованных из молекул соединения 1, H₂O и пептидов.

Получены количественные данные, характеризующие внутри- и межмолекулярные взаимодействия вышеуказанных компонентов.

Предположено, что аналогичная ассоциация может иметь место при взаимодействии соединения 1 с некоторыми белками, в том числе с белками семейства Bcl-2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Садовничий В.А., Сулимов В.Б. // Суперкомпьютерные технологии в науке, образовании и промышленности / Под ред. Воеводина Вл.В., Садовничего В.А., Савина Г.И. М.: Изд-во МГУ, 2009. С.16.
2. Дементьев В.А. Проблемы зарождения и эволюции биосферы. Т. 2. М.: URSS, 2013.
3. Yolamanova M., Meier Ch. // Nat. Nanotechnol. 2013. V. 8. P. 130.
4. Кондратьева М.С., Кабанов А.В., Комаров В.М. // Компьютерные исследования и моделирование. 2010. Т. 2. № 1. С. 83.

5. Каткова Е.В., Офёркин И.В., Сулимов В.Б. // Вычислительные методы и программирование. 2014. Т. 15. С. 258.
6. Dewar M.J.S., Zuebisch E.G., Healy E.F. et al. // J. Amer. Chem. Soc. 1985. V.107. P. 3902.
7. Stewart J.J.P. // J. Comp. Chem. 1989. V. 10. P. 209.
8. Stewart J.J.P. // J. Mol. Modeling. 2007. V. 13. P. 1173.
9. Володькин А.А., Заиков Г.Е., Курковская Л.Н., Бурлакова Е.Б. // Хим. физика. 2011. Т. 30. № 10. С. 72.
10. Володькин А.А., Ерохин В.Н., Бурлакова Е.Б., Заиков Г.Е., Ломакин С.М. // Хим. физика. 2013. Т. 32. № 2. С. 66.
11. Володькин А.А., Заиков Г.Е., Ломакин С.М., Коверзанова Е.В., Ярошевская Х.М. // Вестн. Казанского технол. ун-та. 2016. Т. 19. № 14. С. 19.
12. Volodkin A.A., Zaikov G.E., Kłodzinska E. et al. // Physics, Chemistry, Biology, Medicine and Agriculture. 2014. V. 1. P. 11.
13. Volod'kin A.A., Zaikov G.E., Burlakova E.B. et al. // Organic chemistry, Biochemistry, Biotechnology, and Renewable Resources and Development. V. 24. N.Y.: Nova Sci. Publ., 2013. P. 271.
14. Паршина Е.Ю., Силичева Т.А., Володькин А.А. и др. // Биофизика. 2017. Т. 62. № 5. С. 920.
15. Gabellini Ch., Trisciuglio D., Bufalo D. // Carcinogenesis. 2017. V. 38. Issue 6. P. 579.
16. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: уч. для мед. вузов. 3-е издание, испр. и доп. СПб.: СпецЛит, 2002.