

УСПЕХИ ХИМИИ

ВЫПУСК 12

ДЕКАБРЬ — 1984

ТОМ LIII

МОСКВА

ЖУРНАЛ ОСНОВАН В 1932 ГОДУ
ВЫХОДИТ 12 РАЗ В ГОД

УДК 543.422.27 : 615.332.017 : 615.277.3].015.407

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
В ЦИТОТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ
АНТИБИОТИКОВ*Эмануэль Н. М., Богданов Г. Н., Орлов В. С.*

Обобщены результаты исследований свободнорадикальных механизмов действия различных противоопухолевых антибиотиков. Приведены данные, полученные при изучении физико-химическими методами (ЭПР, полярографии, спектрофотометрии, а также путем квантовохимических расчетов), процессов биотрансформации противоопухолевых антибиотиков, образования химически и биологически активных свободнорадикальных форм антибиотиков. Обсуждены пути их превращения, включающие передачу электрона из молекулы кислорода с образованием супероксидных радикалов, а также ковалентное связывание с биомакромолекулами. Рассмотрена важная роль кислотно-основных свойств антибиотиков в их свободнорадикальных превращениях, особенности биологического действия спин-меченых аналогов антрациклических антибиотиков.

Библиография — 76 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1929
II. Свободные радикалы противоопухолевых антибиотиков	1930
III. Взаимодействие семихиноновых радикалов антибиотиков с внутриклеточным кислородом	1949

I. ВВЕДЕНИЕ

Современный этап развития экспериментальной химиотерапии злокачественных новообразований, включающий различные аспекты биохимии раковой клетки и химической фармакологии противораковых препаратов, характеризуется широким использованием представлений и методов точных наук. Комплексный подход к решению проблемы о взаимосвязи между строением и биологическими свойствами канцеролитиков позволяет выработать фундаментальные принципы, необходимые для создания новых эффективных противораковых препаратов. Важным шагом в разработке таких принципов является новая классификация противоопухолевых препаратов по типу их реакционной способности [1]. Эта классификация носит общий характер и, создавая предпосылки для рационального планирования синтеза противораковых препаратов, позволяет также более детально анализировать и объяснять химические и биологические механизмы их действия. В рамках этой классификации укладываются полифункциональные соединения с гибридными структурами и реакционной способностью. К препаратам такого типа относится, в частности, большинство антибиотиков.

Антибиотические вещества в последние годы находят все более широкое применение в химиотерапии злокачественных заболеваний. Работы химиков в этой области направлены на синтез производных уже известных антибиотиков путем их химической модификации, а также на полный синтез структурных аналогов.

Известные в настоящее время противоопухолевые антибиотики с точки зрения химии представляют собой органические соединения нескольких типов, для большинства из которых цитотоксические свойства были известны уже давно. Так например, изучение строения митомицина-С показало наличие в его структуре хорошо известных цитотоксических группировок — бензохинона, уретана и азиридина. Целый ряд антрациклических антибиотиков характеризуется наличием в качестве агликона производных оксиантрахинона, а в качестве углеводного фрагмента — аминосахаров, противоопухолевые свойства которых также давно известны. Стрептозотоцин (углеводное производное нитрозометилмочевины) был найден после обнаружения противоопухолевых свойств нитрозокарбамидов.

Вследствие полифункциональности антибиотиков весьма существенными оказываются исследования роли различных химических механизмов (электрофильного замещения, комплексообразования и свободнорадикальных реакций) в проявлении биологического эффекта.

Окислительно-восстановительные процессы биотрансформации большинства противоопухолевых антибиотиков, сопровождающиеся промежуточным образованием свободных радикалов, стали предметом многочисленных исследований в последнее десятилетие. В значительной степени это связано с важной биологической ролью эндогенных (в том числе метаболически активных) и экзогенных свободных радикалов, а также с возможностью их детектирования в различных биологических средах методом электронного парамагнитного резонанса.

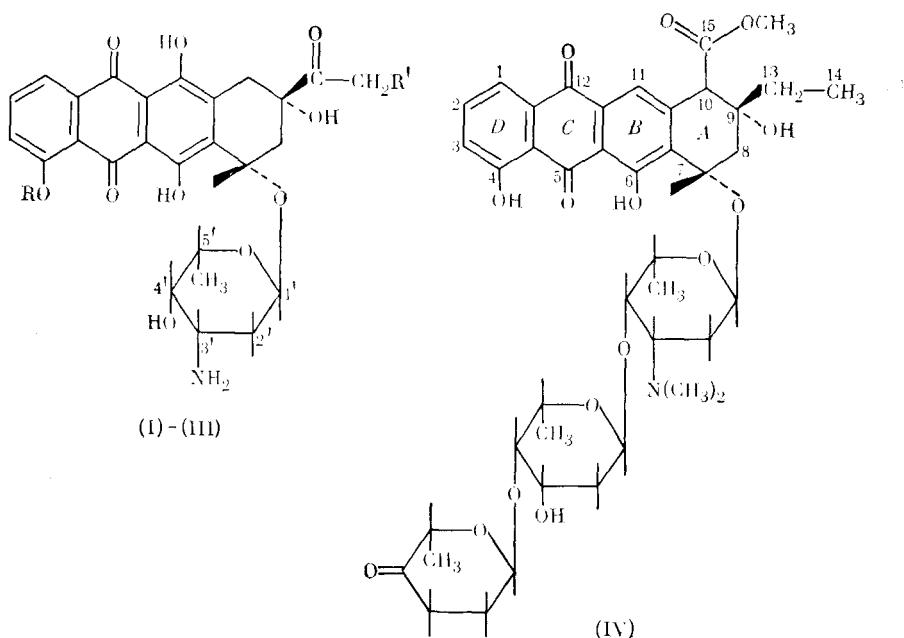
Следует отметить, что представления о свободнорадикальных механизмах применительно к условиям *in vivo* охватывают широкий круг биохимических процессов переноса одного электрона с участием парамагнитных частиц различного типа, в том числе свободных радикалов. Известно, что при действии многих ксенобиотиков в органах и тканях увеличивается содержание ион-радикальных форм органических коферментов и парамагнитных состояний молекул металлопротеинов, активируются процессы перекисного окисления липидов. Иногда регистрируются различные радикальные состояния ксенобиотиков, способные приводить к образованию активных форм восстановленного кислорода. Особый случай является действие на живые организмы стабильных свободных радикалов и других химических соединений с парамагнитным центром.

Различные химико-биологические аспекты свободнорадикальных механизмов изучены и при действии противоопухолевых антибиотиков. При этом основное внимание уделено трем типам свободных радикалов: 1) ион-радикалам, возникающим из антибиотиков при их редокс-превращениях; 2) нитроксильным производным антрацикличес; 3) супероксидам. Наибольший интерес представляет выяснение возможного участия этих радикалов в проявлении токсических и противоопухолевых свойств антибиотиков.

II. СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИБИОТИКОВ

1. Антрациклические антибиотики

В последние годы в химиотерапии злокачественных опухолей нашли широкое применение антибиотики антрациклического ряда. Наиболее известными представителями этого класса противоопухолевых препаратов являются адриамицин (I), рубомицин (дауномицин) (II), карминомицин (III) и аклациномицин А (IV) [2]. Несмотря на значительные различия биологического действия, эти антибиотики являются близкими химическими аналогами:



$R = \text{CH}_3, R' = \text{OH}$ (I); $R = \text{CH}_3, R' = \text{H}$ (II); $R = R' = \text{H}$ (III)

Механизм биологического действия противоопухолевых антрациклических антибиотиков (ПАА) связан с подавлением биосинтеза нуклеиновых кислот и (значительно меньшей мере) биосинтеза белка. В делящихся клетках наблюдается при этом нарушение структуры хромосом (фрагментация хромосом и митотические аберрации, главным образом, образование анафазных мостиков). В соответствии с этим основные морфологические изменения в клетках связаны с изменениями размеров и формы ядрышек и с появлением мелкогранулярного хроматина [3].

Цитотоксический эффект ПАА зависит от их концентрации, времени действия и способа введения в организм. Так, показано, что действие на опухолевые клетки *in vitro* зависит от внеклеточной концентрации и времени экспозиции ПАА [4], а выжившая фракция опухолевых клеток (N) описывается зависимостью:

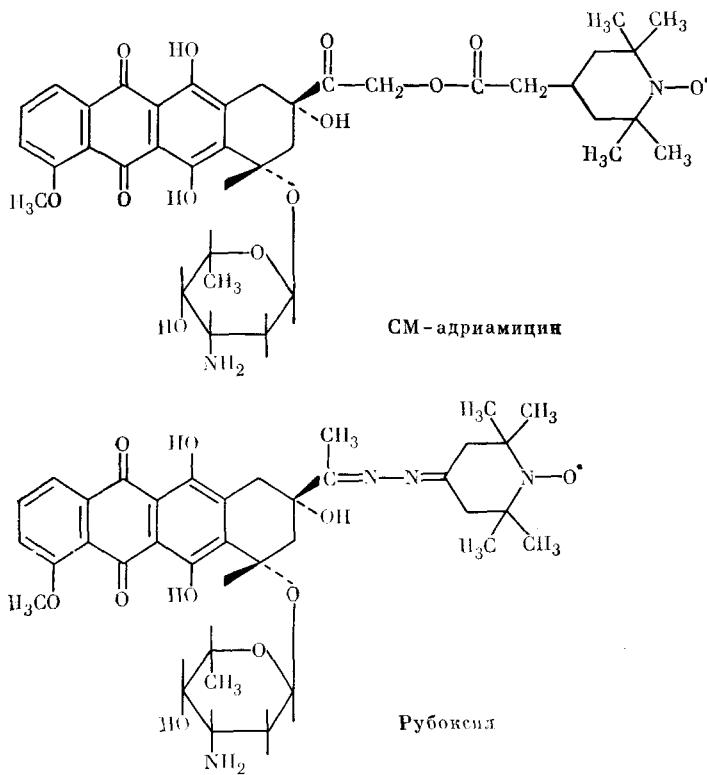
$$N = N_0 e^{-ktc}$$

где t — время экспозиции (мин), c — внеклеточная концентрация ПАА (мкг/моль). Константа k (моль/мкг·мин) характеризует чувствительность тех или иных опухолевых клеток к данному препарату. Для фибробластов китайского хомячка $k = 0,045$ моль/мкг·мин, а для клеток *HeLa* $k = 0,050$ моль/мкг·мин. Существует также прямая корреляция между внеклеточной и внутриклеточной концентрациями ПАА. Однако не наблюдается пропорциональности между временем экспозиции и внутриклеточной концентрацией препаратов [4].

Различия в чувствительности к действию ПАА связаны также с процессами их накопления в клетках. Так, в лейкемические клетки L-1210/R, резистентные к действию рубомицина, препарат проникает легко, но быстро метаболизируется в них, с другой стороны, в чувствительных к препарату клетках L-1210 и Р-388 рубомицин сохраняется в течение 24 ч. Поэтому при химиотерапии способ введения и фармакокинетическое поведение ПАА играют важную роль. Максимальный химиотерапевтический эффект достигается при способах введения ПАА, обеспечивающих непосредственный контакт препарата с опухолевыми клетками. Этот достаточно очевидный из общих соображений факт показан [5] на примере меланомы B-16, привитой внутрибрюшинно или подкожно. Значительно большее количество адриамицина проникает и содержится в опухолевых клетках при внутрибрюшинном росте опухоли и внутрибрюшинном введении препарата.

В целях повышения эффективности химиотерапевтического действия было синтезировано много производных ПАА и комплексов на их основе, различающихся фармакокинетическим поведением в организме. Получены и исследованы комплексы: ПАА—ДНК [6], ПАА—декстран [7], ПАА—аминокислоты [8], ПАА-3 \times Fe³⁺ [9], ПАА, включенные в липосомы [10], а также комплексы адриамицина с антителами [11], которые отличались лучшими противоопухолевыми свойствами и пониженной кардиотоксичностью.

Среди большого числа работ по химической модификации ПАА можно выделить приоритетные разработки [12—14] по синтезу нитроксильных производных ПАА. Такая модификация структуры антрациклинов придает им свойства органических парамагнетиков, наличие в которых свободнорадикального центра существенно изменяет окислительно-восстановительные свойства препаратов и их способность к участию в реакциях с переносом одного электрона. Синтезированы и изучены спин-меченные производные адриамицина (нитроксильный фрагмент связан с агликоном сложноэфирной связью) и рубомицина (нитроксильный фрагмент связан с агликоном посредством азинового мостика):



Введение в молекулу антибиотиков фрагментов, содержащих свободнорадикальный центр, приводит к значительному снижению острой токсичности и увеличению противоопухолевого действия препаратов (табл. 1). Методом ЭПР изучены закономерности восстановления нитроксильных фрагментов и фармакокинетические особенности модифицированных ПАА. Возможные химические причины разницы в фармакокинетическом поведении нитроксильных производных ПАА могут быть связаны с различиями в скоростях и направлениях ферментативного восстановления. Из нескольких возможных центров восстановления (хиноидная, кетонные и нитроксильная группировки) предпочтительно происходит восстановление свободнорадикального фрагмента.

Методом ЭПР изучено взаимодействие спин-меченого аналога адриамицина (СМ-адриамицин) с ДНК [13]. Прежде всего следует отметить устойчивость сложноэфирной связи СМ-адриамицина к гидролизу при его взаимодействии с ДНК. При нейтральных рН спектры ЭПР комп-

ТАБЛИЦА 1

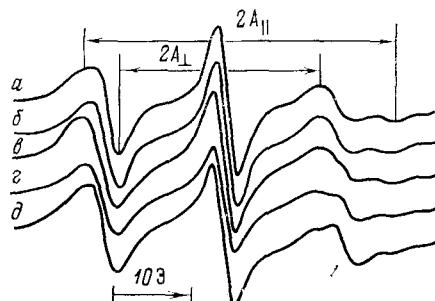
Сравнительные данные по острой токсичности и антилейкемической активности рубоксила и рубомицина [14]

Препарат	ЛД ₅₀ , мг/кг	УПЖ, %	
		лейкемия Р-388	лейкемия La
Рубоксил	44,0	155	243
Рубомицин	5,6	68	63

Обозначения: ЛД₅₀ — однократная доза препарата, вызывающая гибель 50% экспериментальных животных (мыши); УПЖ — увеличение средней продолжительности жизни по сравнению с контролем.

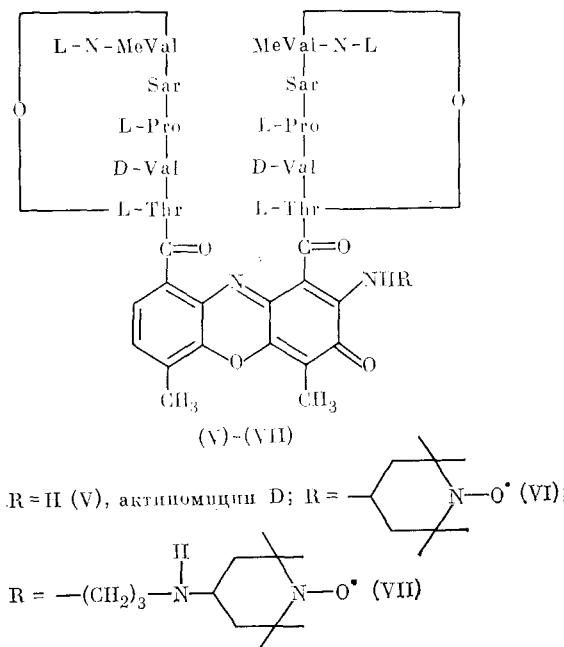
лекса СМ-адриамицина с ДНК остаются неизменными в течение нескольких суток, что указывает на отсутствие гидролитического отщепления нитроксильного фрагмента. Форма спектров ЭПР СМ-адриамицина не обнаруживает зависимости от его относительной концентрации, если на 20 пар оснований ДНК приходятся от одной до четырех молекул антибиотика. Последующее увеличение концентрации СМ-адриамицина приводит к тому, что в высокополовой области спектра ЭПР появляется узкая линия, характерная для СМ-адриамицина в растворе (рис. 1). Ана-

Рис. 1. Изменение спектров ЭПР спин-меченого адриамицина в присутствии ДНК в зависимости от его концентрации (0,01 M NaCl, 1,2 мг/мл ДНК). Соотношение антибиотика и ДНК (пар оснований): *a* — 1 : 20; *b* — 2 : 20; *c* — 4 : 20; *d* — 7 : 20; *e* — 10 : 20 [13]



лиз спектров ЭПР позволил установить, что в этих условиях СМ-адриамицин образует комплекс с ДНК за счет интеркаляции между азотистыми основаниями [13].

Аналогичный механизм взаимодействия с ДНК характерен и для некоторых других полициклических соединений, например, антибиотиков ряда актиномицина. В работе [15] были изучены спин-меченные аналоги актиномицина D:



Интересно, что нитроксильные производные актиномицина D в меньшей степени, чем исходный антибиотик, связывались с ДНК и слабее ингибировали ДНК-зависимую РНК-полимеразу. В то же время в опытах на лейкемии Р-388 спин-меченные аналоги актиномицина D показали в полтора раза лучший противоопухолевый эффект [15]. Этот пример свидетельствует об отсутствии взаимосвязи между степенью интеркаляции и величиной противоопухолевого действия для производных антибиотиков, содержащих свободнорадикальный фрагмент.

При сравнительном изучении адриамицина, карминомицина и 11-метилового эфира карминомицина на асцитной гепатоме Новикова *in vitro* было показано, что их цитотоксический эффект не может быть объяснен способностью ингибировать биосинтез нуклеиновых кислот или связываться с молекулами ДНК [16].

Тем не менее преимущественно способностью ПАА к интеркаляции между основаниями ДНК объясняются различные типы биологического действия антрациклинов (цитотоксический, мутагенный и канцерогенный эффект).

В связи с этим обращает на себя внимание альтернативная точка зрения на молекулярный механизм биологического действия ПАА, связанный с промежуточным образованием свободнорадикальных интермедиатов.

Особенности химиотерапевтических свойств антрациклинов находят качественное объяснение в различной способности к донорноакцепторным взаимодействиям, проницаемости и в отличиях в окислительно-восстановительных свойствах препаратов. В настоящее время принципиальное значение приобретают попытки строго количественного описания отдельных свойств ПАА и установления корреляций между структурой и биологической активностью веществ.

Проведенные квантовохимические расчеты модельных аналогов агликонов ПАА и соответствующих анион-радикалов для изолированных молекул и их гидратных комплексов показали необходимость учета влияния растворителя на их электронные и конформационные свойства, так как эффекты сольватации могут приводить к существенным конформационным перестройкам. Полуэмпирические методы INDO, CNDO/2 достаточно хорошо качественно описывают состояние системы, хотя и дают менее реальные значения энергий сольватации и прочности водородных связей по сравнению с методами *ab initio*. Расчеты структуры гидратных комплексов, включающих четыре молекулы воды, проведены с учетом образования водородных связей по атомам кислорода антрахинонового фрагмента [17].

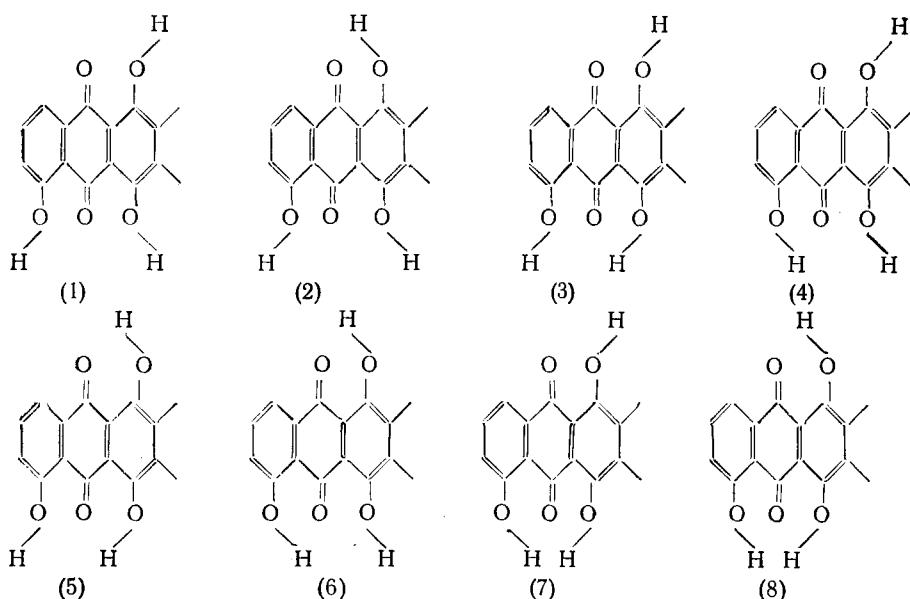


ТАБЛИЦА 2

Вычисленные значения энергий образования внутримолекулярных водородных связей ($\Delta E_B = E_i - E_1$) в изолированных молекулах и значения энергий сольватации тетрагидратных комплексов карминомицина для различных конформаций оксигрупп антрахинонового цикла (ΔE_F) [17]

Структура	ΔE_B , ккал/моль	ΔE_F , ккал/моль	Структура	ΔE_B , ккал/моль	ΔE_F , ккал/моль
(1)	0	59,8	(5)	15,5	36,2
(2)	7,6	47,2	(6)	17,1	33,2
(3)	8,1	49,0	(7)	17,3	42,5
(4)	9,5	46,4	(8)	24,9	28,2

ТАБЛИЦА 3

Значение спиновых плотностей на s -орбиталях атомов водорода ($Q^s \cdot 10^2$) в анион-радикалах агликонов карминомицина, вычисленные при конформации оксигрупп, отвечающей структуре (1), для различных конформаций кольца A : a — без учета, b — с учетом гидратации антрахинона [17]

Атом H	Кресло		Полукресло	
	a	b	a	b
H(1)	0,01	-0,03	0,02	-0,03
H(2)	-0,01	-0,01	-0,02	-0,02
H(3)	-0,10	-0,11	-0,10	-0,11
H(4)	0,01	0,01	0,00	0,01
H(6)	0,04	0,01	0,00	0,00
H(7)	0,53	0,50	0,47	0,38
H(7) ^{OH}	-0,09	-0,09	-0,46	-0,44
H(8)	-0,03	-0,03	-0,02	-0,02
H(8)	-0,05	-0,04	-0,01	-0,01
H(10)	0,46	0,41	0,52	0,27
H(10) ^a	0,91	0,80	0,74	0,77

Обозначения. H(7)^{OH} — атом водорода оксигруппы в положении 7 агликона; H(10)^a — аксиально расположенный атом водорода в положении 10.

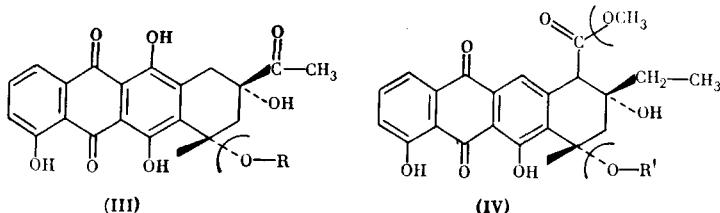
Найдено, что в приближении изолированной молекулы энергетически выгодно образование внутримолекулярных водородных связей, причем возникновение каждой следующей связи пропорционально понижает полную энергию системы. На примере гидратных комплексов показано, что образование межмолекулярных водородных связей более выгодно по сравнению с внутримолекулярными водородными связями оксантрахиона (табл. 2) [17].

С учетом строения нейтральных изолированных молекул и эффектов гидратации агликонов исследовано распределение зарядов и спиновых плотностей в соответствующих анион-радикалах. При образовании анион-радикалов происходит перестройка электронной структуры в хромофорной части ПЛА. Основной электронный заряд локализуется при этом на атомах кислорода карбонильных групп: $\Delta q_5 = q_5^a - q_5^b = 8,25 \cdot 10^{-2}$ е, $\Delta q_{12} = 7,41 \cdot 10^{-2}$ е. Неспаренный электрон занимает нижнюю вакантную π -орбиталь антрахинонового цикла, а спиновые плотности имеют максимальные значения на атомах кислорода карбонильных групп ($\rho_{\pi_z}^5 = 0,489$; $\rho_{\pi_z}^{12} = 0,443$) и на атомах углерода карбонильных групп ($\rho_{\pi_z}^5 = 0,107$; $\rho_{\pi_z}^{12} = 0,128$).

Теоретические значения спиновых плотностей на атомах водорода агликона карминомицина (с учетом и без учета гидратации) представлены в табл. 3. Анализ этих данных показывает, что экспериментально наблюдаемые расщепления в спектре ЭПР ($a_H = 4,1$ Э и $a_H = 2,1$ Э) можно объяснить взаимодействием неспаренного электрона с протонами кольца A . Константы СТС могут быть определены по формуле: $a = K \rho^s$, где ρ^s — значение спиновой плотности на s -орбитали протона, K — кон-

ТАБЛИЦА 4

Значения порядков связей по Вибергу в нейтральных молекулах и анион-радикалах карминомицина (III) и аклациномицина А (IV) [17]



Состояние	(III)		(IV)				
	C(7)—O(7)	O(7)—R	C(7)—O(7)	O(7)—R'	C(10)—C(15)	C(15)≡O	C(15)—O
Нейтральная молекула	0,4620	0,4890	0,4790	0,4790	0,4866	0,9274	0,4849
Анион-радикал	0,4522	0,4950	0,4631	0,4793	0,4891	0,9319	0,4740

станта, равная 539,86 в случае атомов водорода [18]. Теоретические значения распределения спиновых плотностей для агликонов других ПАА мало отличаются от данных для карминомицина. Значения расщепления на протонах кольца *A* несколько различаются для двух возможных конформаций: кресла и полукресла, однако на основе расчетных значений нельзя сделать выбор в пользу существования той или иной конформации в растворе.

Важным результатом проведенных расчетов является вывод об ослаблении связи $C(7)-O(7)$ при образовании анион-радикалов, что следует из анализа значений индексов Виберга. Подобное ослабление связи, полученное из теоретических расчетов для модельных соединений, показывает, что при восстановлении ПАА может происходить отщепление углеводного фрагмента (табл. 4) [17]. Действительно, это было подтверждено экспериментально. Например, показано [19], что при ферментативном восстановлении рубомицина в условиях гипоксии расходование антибиотика сопровождается увеличением содержания в системе свободного агликсона (рис. 2). Антрациклиновые антибиотики в клетке

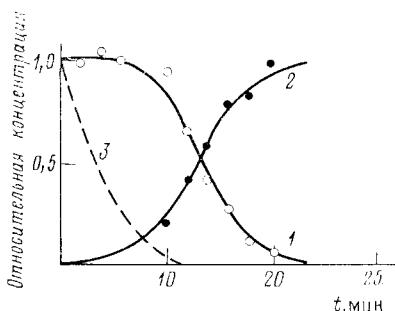
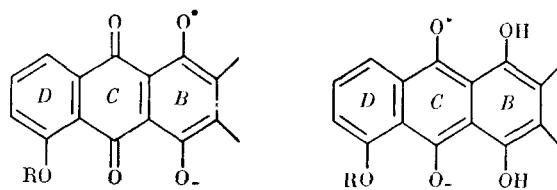


Рис. 2. Кинетические кривые изменения содержания рубомицина (1), его агликона (2) и парциального давления кислорода (3) в микросомальной системе в присутствии НАДФН (по данным [29])

постепенно превращаются в дезоксиагликоны, которые более липофильны и, возможно, более прочно связываются с мембранами микросом. Согласно квантовохимическому расчету, при восстановлении аклашина-мицина А кроме отщепления углеводного фрагмента может происходить также отщепление 15-метоксильной группировки (см. табл. 6).

Эти результаты указывают на потенциально важную роль окислительно-восстановительных превращений с промежуточным образованием свободнорадикальных состояний. Можно было бы ожидать образования свободных радикалов из ПАА как за счет окисления гидрохиноновой группировки (кольцо *B*), так и за счет восстановления анграхинона (кольцо *C*).



Образующиеся при этом свободнорадикальные интермедиаты характеризуются различной реакционной способностью, чем может обуславливаться избирательность биологического действия ПАА, в частности, соотношение между степенью токсичности и противоопухолевым эффектом.

Оценка способности агликонов ПАА к восстановлению и окислению произведена на основе расчета энергий низшей незанятой молекулярной орбитали ($E_{\text{ННМО}}$) и энергий высшей занятой молекулярной орбитали ($E_{\text{ВЗМО}}$) [20]. Значения $E_{\text{ННМО}}$ и $E_{\text{ВЗМО}}$ для карминомицина, рубомицина, адриамицина и аклациномицина А и их O_6^- -анионов представлены в табл. 5. Видно, что в нейтральном состоянии все агликоны характеризуются близкими величинами как $E_{\text{ННМО}}$, так и $E_{\text{ВЗМО}}$. Следовательно, рассмотренные выше антрациклические антибиотики обладают примерно одинаковыми электроноакцепторными свойствами. Весьма высокие абсолютные значения $E_{\text{ВЗМО}}$ указывают на то, что в нейтральном состоянии все агликоны достаточно устойчивы к окислению. В то же время анионы ПАА, характеризующиеся значительно меньшими значениями $E_{\text{ВЗМО}}$, имеют повышенную способность к окислению. Из табл. 7 следует, что наименьшей способностью к окислению обладает анион аклациномицина А, что и следовало ожидать в связи с отсутствием в его структуре гидрохинонового фрагмента. Наиболее выраженные электронодонорные свойства характерны для аниона агликона карминомицина.

На окислительно-восстановительные свойства ПАА при физиологических значениях pH могут влиять кислотно-основные характеристики агликонов. Изучение электронных спектров поглощения антибиотиков в видимой области при различных pH среды показало наличие изобестнических точек (рис. 3), что свидетельствует о наличии в щелочных растворах равновесия между нейтральной и ионизованной формами антибиотиков. Из приведенных в табл. 5 данных следует, что при физиологических значениях pH молекулы антрациклических антибиотиков находятся в частично ионизованном состоянии.

Образование ионизованных форм ПАА — процесс достаточно сложный, что определяется их полифункциональным характером. Помимо оксигрупп агликона, способных к диссоциации, в нем принимают участие нуклеофильные центры молекулы, обуславливающие возможность ассоциации. Например, в водных растворах рубомицина ($5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) спектро-

ТАБЛИЦА 5

Значения энергий ВЗМО и ННМО для нейтральных молекул и анионов ряда антрациклических антибиотиков и их токсичность при внутрибрюшинном введении [20, 21]

Параметр	Карминомицин	Рубомицин	Адриамицин	Аклациномицин А
$E_{\text{ВЗМО}}^{\text{H}}$, эВ	-10,306	-10,288	-10,217	-10,342
$E_{\text{ВЗМО}}^{\text{a}}$, эВ	-3,203	-3,209	-3,288	-3,670
$E_{\text{ННМО}}^{\text{H}}$, эВ	0,690	0,690	0,719	0,633
$E_{\text{ННМО}}^{\text{a}}$, эВ	4,680	4,678	4,810	3,095
LD_{50} , мг/кг	1,3	5,5	8,5	25,0
$\text{p}K_a$	8,4	9,6	9,6	9,0

Обозначения: $E_{\text{ВЗМО}}^{\text{H}}$ и $E_{\text{ННМО}}^{\text{H}}$ — энергии ВЗМО и ННМО нейтральных молекул агликонов ПАА. $E_{\text{ВЗМО}}^{\text{a}}$ и $E_{\text{ННМО}}^{\text{a}}$ — энергии ВЗМО и ННМО анионов агликонов ПАА.

фотометрически, методами ЯМР и кругового диахроизма показано образование димеров [22]. Поэтому с увеличением концентрации ПАА при постоянном значении pH наблюдается снижение степени диссоциации.

Для сравнительного исследования электронодонорных свойств ПАА была изучена реакция их окисления феррицианидом калия [20]. Изучены зависимости эффективных констант скорости ($k_{\text{эфф}}$) реакции их окисления от концентрации окислителя и pH среды. На рис. 4 представлены зависимости $k_{\text{эфф}}$ для процесса окисления карминомицина, рубомицина и адиамицина в зависимости от концентрации феррицианида при pH 7,6. Видно, что замена атома водорода в положении 14 на оксигруппу не влияет на электронодонорные свойства антибиотиков. В то же время замена 4-метоксильного фрагмента на оксигруппу резко уменьшает pH K_a агликона и увеличивает его электронодонорные свойства. Константы реакции окисления сильно зависят от pH среды. Так, при окислении рубомицина и карминомицина ($5 \cdot 10^{-5}$ M) феррицианидом калия ($5 \cdot 10^{-3}$ M) для $k_{\text{эфф}}$ при pH 7,0 получены значения 0,3.

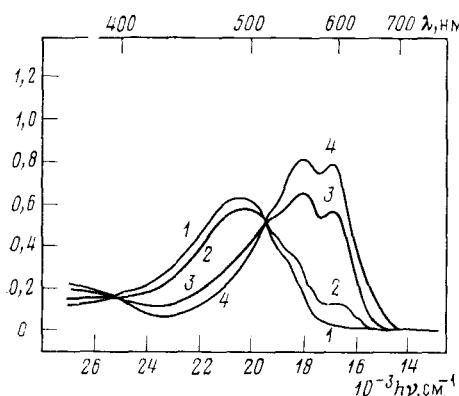


Рис. 3

Рис. 3. Спектры оптического поглощения рубомицина при следующих значениях pH среды: 1 — 6,8; 2 — 9,2; 3 — 10,5; 4 — 13 [20]

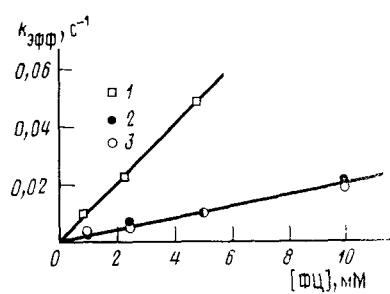


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость констант скорости окисления карминомицина (1), рубомицина (2) и адиамицина (3) от концентрации феррицианида (pH 7,6, $T=25^\circ\text{C}$) [20]

$\cdot 10^{-2}$ с^{-1} и $0,7 \cdot 10^{-2}$ с^{-1} и при pH 8,0 — значения $1,3 \cdot 10^{-2}$ с^{-1} соответственно. Окисление малотоксичного аклациномицина А феррицианидом не наблюдалось даже при pH 9,5.

Таким образом, электронодонорные свойства ПАА увеличиваются в ряду: аклациномицин А < адиамицин \approx рубомицин < карминомицин; при этом возрастает и их острая токсичность (уменьшается LD_{50}). С учетом этих результатов снижение цитотоксических свойств 11-метилового эфира карминомицина может быть объяснено модификацией структуры, сопровождающейся понижением способности к окислению (в структуре нет гидрохинонового фрагмента).

В этой связи заслуживает внимания наличие статистически достоверной корреляции между значениями LD_{50} для ряда 4-замещенных 2,2,6,6-тетраметилпиперидил-1-оксила и $E_{\text{взмо}}$ соответствующих анионов (рис. 5) [24]. С достоверностью 95% уравнение линейной регрессии имеет вид:

$$\text{LD}_{50} = aE_{\text{взмо}} + b$$

где $a = -2352 \pm 1208$ и $b = 371 \pm 119$. Этот результат свидетельствует о том, что за токсичность нитроксилов ответственны не реакции их эндогенного восстановления, а процессы окисления их восстановленных форм.

Указанную корреляцию между способностью к окислению и токсическими свойствами противоопухолевых препаратов необходимо учитывать при их химической модификации и разработке комплексной полихимиотерапии. Однако к настоящему времени процесс образования свободных радикалов из антрациклиновых антибиотиков изучен в основном при их восстановлении.

При восстановлении рубомицина в воде боргидридом калия в первые две минуты в спектре ЭПР наблюдается интенсивный сигнал ($g=2,004$ и $\Delta H=4$ Э) от первичного семихинонового радикала. Уже через три минуты на фоне первого сигнала ЭПР появляется другой сигнал ($g=2,004$, $\Delta H=12$ Э) с характерной сверхтонкой структурой. Еще через несколько минут наблюдается уширение обоих сигналов, так что регистрируется только одиничный синглет шириной в 9 Э (рис. 6). В это же время в реакционной смеси происходит образование осадка, что может быть связано с отщеплением углеводного фрагмента и образованием плохо растворимых в воде радикальных форм агликонов. При восстановлении ПАА в метиловом спирте регистрируются стабильные радикалы с хорошо разрешенной сверхтонкой структурой [17].

Рис. 5. Корреляция между энергией высшей занятой молекулярной орбитали восстановленных форм (R^-) производных 2,2,6,6-тетраметил-4- X -пиперидин- N -оксида ($X=-(CH_2)_2NH_2$ (1); $-\text{OC(O)NH-Ph}$ (2); $-\text{OH}$ (3); $-\text{NHC(O)-NCH}_2\text{CH}_2$ (4); $=\text{O}$ (5)) и острой токсичностью LD_{50} [24]

Рис. 6. Изменение спектра ЭПР семихиноновых радикалов рубомицина, полученных при восстановлении KBH_4 через: 1 — 2 мин, 2 — 5 мин, 3 — 6 мин, 4 — 30 мин [17]

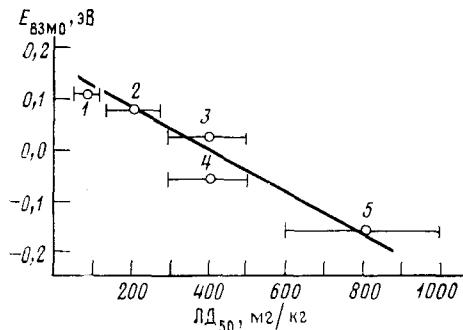


Рис. 5

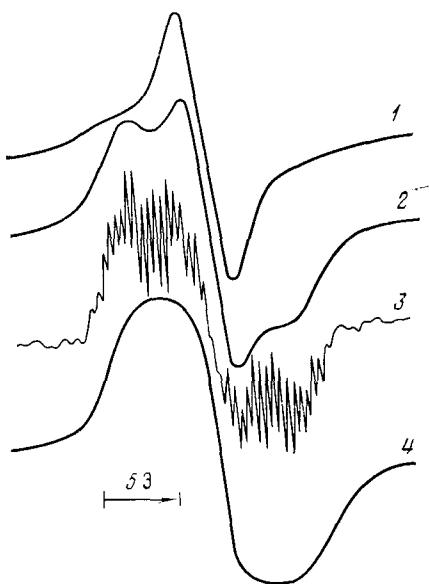


Рис. 6

Обнаружено также спонтанное образование семихиноновых радикалов ПАА при физиологических значениях рН. В этом случае скорость образования радикалов не зависит от содержания кислорода, однако образующиеся семихиноновые радикалы претерпевают гибель на атомах кислорода. Скорость образования семихиноновых радикалов адриамицина (20 мг/мл) менялась от 7,0 нмоль/мин при рН 7,65 до 48,0 нмоль/мин при рН 8,85 [25].

Образование свободных радикалов было доказано также при ферментативном восстановлении ПАА [26—30]. Семихиноновые радикалы регистрируются методом ЭПР при инкубации ПАА с клетками асцитного рака Эрлиха [26, 27], а также с микросомальной или ядерной фракцией клеток печени крыс в условиях гипоксии в присутствии НАДФН [25, 28—30]. Перенос электрона на ПАА с НАДФН катализируют флавопротеины одноэлектронного переноса, такие как НАДФН-цитохром Р-450-редуктаза, нитратредуктаза, НАДФН-цитохром С-редуктаза. Это свидетельствует об отсутствии специфичности восстановления хиноидной группировки в ПАА. Различного типа редуктазы способны восстанавливать кетогруппу рубомицина в положении 13 с образованием 13-дигидробубомицина (дауномицинол). Адриамицин и карминомицин претерпевают аналогичные превращения, однако трансформируются заметно медленнее. Реакцию восстановления кетогруппы может катализировать альдокеторедуктаза из печени и почек крыс в присутствии НАДФН [31]. При действии редуктаз может происходить отрыв сахарного фрагмента с образованием свободных агликонов, однако восстановленные

агликоны в 100 раз менее активны, чем исходные ПАА [5]. По-видимому, это связано с меньшей растворимостью агликонов ПАА и обусловленными этим фармакокинетическими особенностями.

Чувствительность опухолевых клеток к ПАА зависит от наличия в них ферментных систем, способных активировать и метаболизировать ПАА. Так, в клетках меланомы В-16, опухоли, наиболее чувствительной к действию ПАА, рубомицин восстанавливается в дауномицинол наиболее интенсивно. Это свидетельствует о важности ферментативной активации рубомицина в опухолях и о возможной роли дауномицина в проявлении противоопухолевого эффекта (рис. 7). В связи с этим можно отметить также, что локальная гипертермия опухоли увеличивает

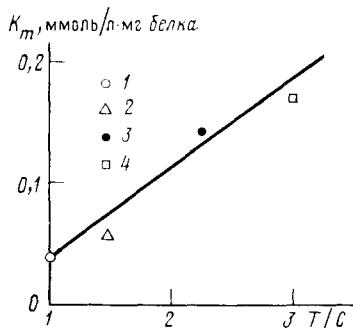


Рис. 7

Рис. 7. Соотношение между противоопухолевой эффективностью (T/C) и константами Михаэлиса K_m в случае ферментативного восстановления рубомицина: 1 — L-1210/R, 2 — L-1210, 3 — P-388, 4 — В-16 (T — продолжительность жизни животных в опытной группе при введении рубомицина, C — продолжительность жизни животных в контроле) (по данным [5])

Рис. 8. Полярографическая волна восстановления: 1 — рубомицин; 2 — рубомицин+ДНК (молярное отношение ДНК : рубомицин = 8,7 : 1) [3]

эффективность адриамицина на фоне повышенной интенсивности его метаболизма [32].

Ферменты двухэлектронного переноса, такие как глутатионредуктаза и лактатдегидрогеназа, не участвуют в процессе образования радикалов [30]. Кинетика восстановления хинонов флавопротеинами зависит как от редокс-потенциалов хинонов, так и от ферментов, их восстанавливающих. Так, нижний предел редокс-потенциала для восстановления хинонов НАДФН-цитохром Р-450-редуктазой составляет -240 мВ, а для НАДН-цитохром В₅-редуктазы и НАДН-убихиноноксидоредуктазы этот предел равен -170 мВ. Липофильность, по-видимому, играет малую роль в процессе восстановления этих препаратов ферментами [33].

Спектр ЭПР семихинонового метаболита антрациклинов в микросомах появляется не сразу, а по мере расходования растворенного в них кислорода, и наблюдается затем в течение нескольких часов [27]. В процессе инкубации антибиотиков с микросомами происходит уменьшение парциального давления кислорода за счет переноса электрона с семихиноновых частиц на кислород [26, 29, 30, 34, 35]. Пока в микросомах существует кислород, сигнал семихиноновых радикалов в спектре ЭПР антибиотика не наблюдается. По мере уменьшения парциального давления кислорода начинает регистрироваться сигнал ЭПР, относящийся к семихиноновому радикалу антрациклина. Симметричный в начальный момент времени сигнал с $g=2,0036$ становится затем асимметричным, а через несколько часов спектр приобретает характер сильно заторможенного аксиально-симметричного сигнала с $g=2,0046$ и $g=2,0021$ [27].

Антрациклические антибиотики, интеркалированные между основаниями ДНК, плохо восстанавливаются до семихиноновых радикалов. Это согласуется с отсутствием полярографической волны восстановления

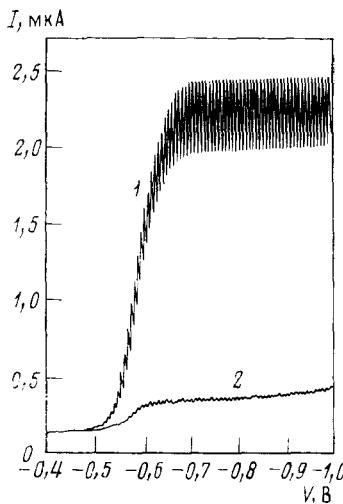


Рис. 8

ТАБЛИЦА 6
Ковалентное связывание ^{14}C -адриамицина, меченного в положении 14, с белками микросом [13]

Экспериментальные условия	α , %
Денатурированные микросомы + адриамицин + НАДФН	1,1
Микросомы + адриамицин	0,8
Микросомы + адриамицин + НАДФН	4,4
Микросомы + адриамицин + СОД	1,0
Микросомы + адриамицин + НАДФН + СОД	4,5

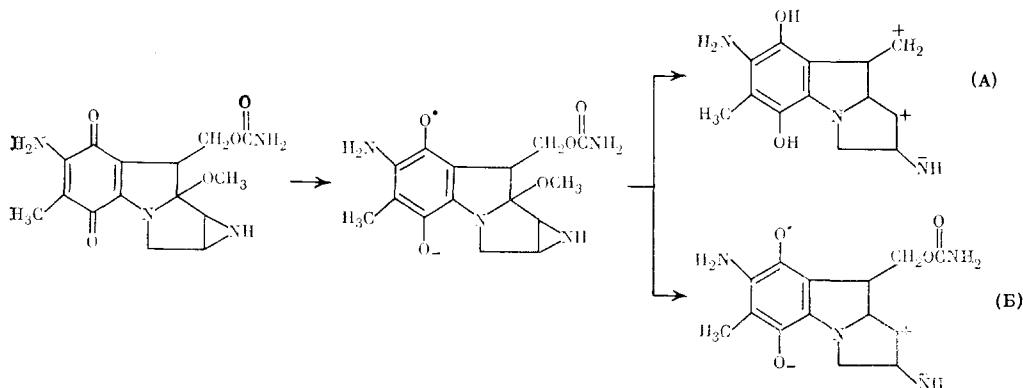
Обозначения: СОД \leftrightarrow супероксиддисмутаза. α — доля связанный радиоактивной метки.

рубомицина после его инкубации с ДНК [3] (рис. 8). Противоопухолевые антрациклические антибиотики, связанные с ДНК, плохо восстанавливаются микросомами при добавлении НАДФН, так что при этом методом ЭПР регистрируется только слабый сигнал семихиноновых радикалов [27]. Все это свидетельствует о том, что ПАА, интеркалированные в ДНК, являются «плохими» субстратами для ферментативного восстановления.

При химической и биологической активации молекулы ПАА обладают способностью ковалентно связываться с биомакромолекулами, что обусловлено промежуточным образованием семихиноновых радикалов [36]. Степень ковалентного связывания рубомицина с ДНК при УФ-облучении увеличивается в три раза в присутствии кислорода [36]. Ковалентное связывание адриамицина с белками микросом происходит только в присутствии НАДФН, обеспечивающего ферментативное восстановление препарата до семихинона. Добавление супероксиддисмутазы не влияло на связывание адриамицина с микросомальными белками, что исключает участие супероксидных радикалов в процессе (табл. 6) [37].

Генерирование семихиноновых радикалов, изученное на примере антрациклинов, вероятно, может иметь значение и в случае других антибиотиков, содержащих в своей структуре хиноидные (или аналогичные им) фрагменты. Ниже рассмотрены препараты, в механизме биологического действия которых важную роль могут играть процессы промежуточного образования свободных радикалов.

Митомицин С. В 1956 г. из культуральной среды *Streptomyces caspitosus* был выделен сложный комплекс веществ, обладавший антибиотическими свойствами и эффективно тормозивший рост асцитной опухоли Эрлиха. Позднее из него было выделено индивидуальное соединение, названное митомицином С. Быстро действующий бактерицидный и цитотоксический антибиотик митомицин С применяется при лечении рака желудка, рака молочной железы и рака поджелудочной железы [38]. Возможные пути химической активации митомицина С, включающие образование карбокатионов и семихиноновых радикалов, свидетельствуют о полифункциональном характере этого антибиотика:



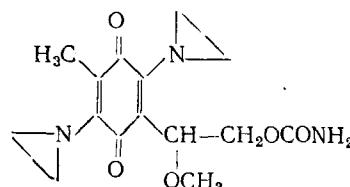
Цитотоксическое действие митомицина С объясняется его способностью как монофункционально алкилировать основания ДНК (вероятно, за счет раскрытия азиридинового цикла), так и образовывать поперечные связи (шивки) между комплементарными цепями ДНК [39–41] вследствие бифункциональности интермедиатов митомицина С. Показано, что ДНК, инкубированная с антибиотиком в течение одной минуты, характеризуется наличием ковалентных связей (шивок) между комплементарными цепями, что можно легко обнаружить по обратимости процесса ее денатурации.

Одним из возможных механизмов этого процесса является образование интермедиатов типа (А) с двумя электрофильными центрами, возникающими за счет уретановой и азиридиновой группировок митомицина С. Другой путь связан с образованием свободнорадикального интермедиата (Б), которое может осуществляться в несколько стадий. Вначале происходит наиболее (в 10–20 раз) вероятный процесс моноалкилирования, а затем — генерирование семихиноновых радикалов. Об этом свидетельствует тот факт, что ковалентно связанный с ДНК митомицин С также способен восстанавливаться до семихинонового радикала, взаимодействие которого с кислородом приводит к образованию супероксидных радикалов [39]. При химическом или ферментативном восстановлении митомицин С превращается в высокореакционноспособный бифункциональный агент, образующий ковалентные связи с нуклеиновыми кислотами, белками и другими молекулами повреждаемых клеток. Поэтому бифункциональность может быть следствием образования из препарата семихиноновых радикалов, содержащих электрофильный центр раскрытое азиридиновое кольцо (Б). Восстановленный митомицин также обладает высокой реакционной способностью и легко связывается *in vitro* с ДНК, образуя в ней шивки. По-видимому, активная форма (Б) митомицина С крайне нестабильна, так как шивки в ДНК возникают только в том случае, если ДНК добавить через несколько секунд после восстановления антибиотика. Восстановленный митомицин в первую очередь связывается с остатками гуанина в ДНК, но может так же легко взаимодействовать с РНК и белками клеток.

Восстановление раствора митомицина С в диметилсульфоксиде под действием боргидрида натрия приводит к образованию стабильного семихинонового радикала, в спектре ЭПР которого имеется 36 линий с величинами расщеплений $a_{\text{NH}_2}^{\text{N}} = 2,3\text{Э}$, $a_{\text{цик}}^{\text{N}} = 1,7\text{Э}$, $a_{\text{CH}_3}^{\text{H}} = 1,0\text{Э}$, $a_{\text{CH}_2}^{\text{H}} = 0,65\text{Э}$ и величиной $g = 2,0046$ (рис. 9) [39]. Обнаружение и регистрация семихинонового радикала митомицина С в водной среде усложнено из-за сравнительно короткого времени их жизни. При инкубации препарата с микросомами в отсутствие кислорода был зарегистрирован сигнал ЭПР семихинонового радикала митомицина С с $g = 2,0035$, $\Delta H = 9\text{ Э}$, исчезающий в течение четырех минут. Сигнал появляется только при совместном присутствии митомицина С, микросом и НАДФН-генерирующей системы (0,39 ммоль/л НАДН, 5,5 ммоль/л глюкозо-6-фосфата и 0,67 ед/мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы). По своим спектроскопическим характеристикам ($g = 2,0034$) он идентичен сигналу, зарегистрированному при химическом восстановлении митомицина С в водной среде [27].

Следует подчеркнуть, что митомицин С, ковалентно связанный с poly G, poly C, также давал спектр, характерный для семихинонового радикала при его восстановлении NaBH_4 [39].

Близким структурным аналогом митомицина С является карбокон, применяемый при лечении лейкемии.



Карбокон имеет две полярографические волны восстановления при $-0,23$ и $-1,6$ В относительно насыщенного каломельного электрода. В микросомах печени в присутствии НАДФН карбокон восстанавливается до семихинонового радикала; его спектр ЭПР характеризуется хорошо разрешенной сверхтонкой структурой (рис. 10), которая объясняется взаимодействием неспаренного электрона с тремя эквивалентными протонами метильной группы в положении 6 ($a_{\text{CH}_3}^{\text{H}} = 0,55$ Э) и с двумя ядрами азота азиридиновых групп в положениях 2 и 5 ($a_{\text{N}(2)}^{\text{N}} = 2,78$ Э; $a_{\text{N}(6)}^{\text{N}} = 3,03$ Э). После инкубации карбокона с клетками асцитной опухоли Эрлиха также

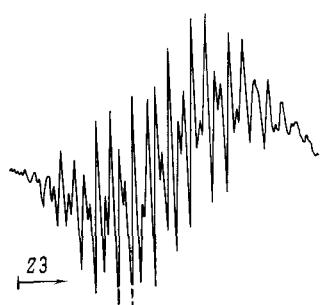


Рис. 9

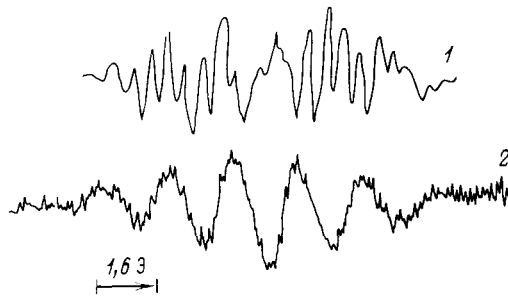


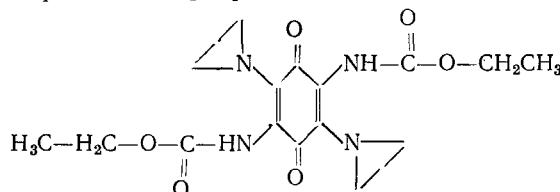
Рис. 10

Рис. 9. Спектр ЭПР семихинонового радикала митомицина С, восстановленного под действием NaBH_4 в фосфатном буфере при $\text{pH} 7,0$ [39]

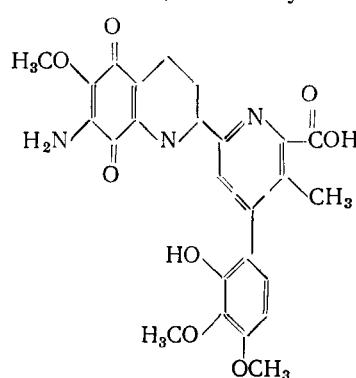
Рис. 10. Спектры ЭПР семихиноновых радикалов карбокона (1) [28] и AZQ (2) [42], полученных при микросомальном восстановлении в присутствии НАДФН

регистрируется образование радикалов карбокона. При этом давление ДНК или глюкозы не влияет на процесс радикалообразования [28].

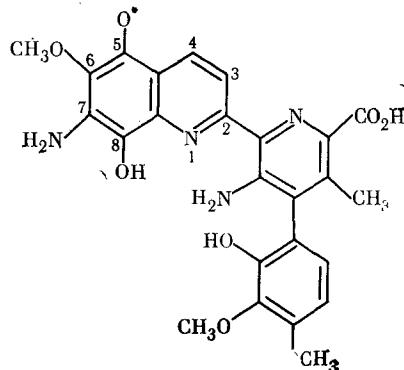
Другой структурный аналог митомицина С — хинонсодержащий алкилирующий агент AZQ, также может восстанавливаться в микросомах до семихиноновых радикалов [42].



Брунеомицин. Брунеомицин получен в СССР из культуры *Streptomyces albus var bruneomicini* и идентичен зарубежным препаратам стрептотингинну и рубохромомицину. Его применяют при лечении лимфогрануломатоза, лейкемической формы хронического лимфолейкоза, ретикулеза и некоторых других системных заболеваниях крови, а также при лечении аденосаркомы почки (опухоль Вильямса) и нейробластомы, устойчивой к другим противоопухолевым препаратам [43]. Брунеомицин подавляет синтез ДНК в культурах клеток животных и бактерий. Он остается связанным с ДНК, выделенной из асцитных опухолевых клеток мышей.



Как и в случае митомицина С, бактерицидное действие брунеомицина сопровождается деградацией молекул ДНК, однако он не вызывает образования сшивок ДНК [3]. Для проявления максимального бактерицидного действия необходимо одновременное наличие источника электронов и кислорода [43]. Восстановление брунеомицина KBH_4 в диметилсульфоксиде в отсутствие кислорода приводило к образованию семихи-



лонового радикала, спектр которого характеризуется константами расщепления на атомах азота в положениях 7 и 1 ($a_{\text{N}(7)}^{\text{N}} = 0,9 \text{ Э}$ и $a_{\text{N}(1)}^{\text{N}} = 0,3 \text{ Э}$), а также на протоне в положении 4 (2,1 Э) и на двух эквивалентных протонах аминогруппы (0,3 Э) [39].

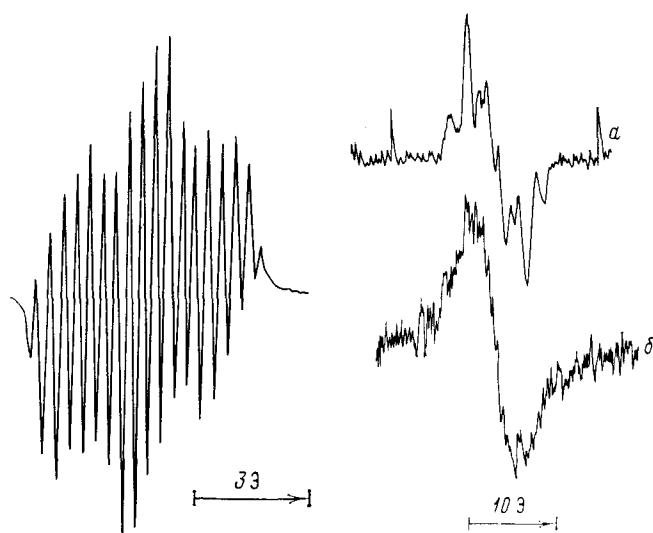


Рис. 11

Рис. 12

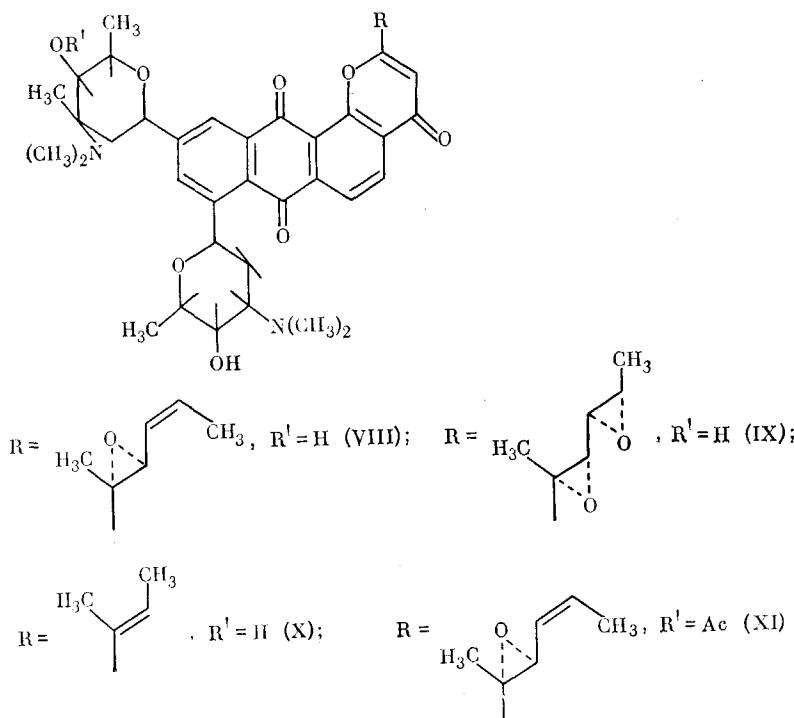
Рис. 11. Спектр ЭПР семихинонового радикала брунеомицина ($4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), полученного при восстановлении под действием NaBH_4 ($8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) в фосфатном буфере при $\text{pH} 7,0$ [39]

Рис. 12. Спектры ЭПР радикала рубифлавина, полученного:
 а — при химическом восстановлении под действием KBH_4 [44],
 б — при биологическом восстановлении в суспензии клеток

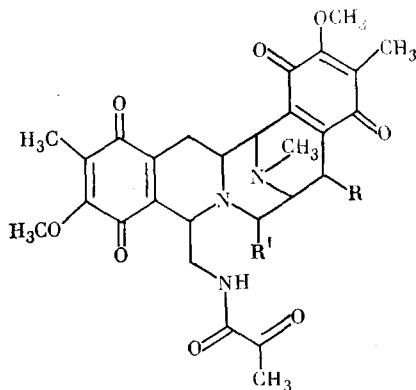
Аналогичный спектр ЭПР зарегистрирован и при биологическом восстановлении брунеомицина в суспензии клеток *E. coli*, что позволяет предполагать важную роль свободнорадикальных промежуточных состояний в молекулярных механизмах биологического действия брунеомицина [44] (рис. 11).

В работе [45] изучено связывание брунеомицина с нуклеиновыми кислотами в присутствии восстанавливающих агентов и ионов металлов. Инкубация химически восстановленного брунеомицина с ДНК *in vitro* сопровождалась необратимым связыванием и приводила к образованию комплекса, содержащего 1 моль брунеомицина на 250 нуклеотидов. Присутствие ионов Zn^{2+} значительно увеличивало степень связывания и полученный комплекс содержал 1 моль брунеомицина на 80 нуклеотидов. С другой стороны, присутствие Mg^{2+} уменьшало это связывание. Больше антибиотика связывалось с денатурированной ДНК, чем с нативной. Максимум связывания достигается при восстановлении брунеомицина в присутствии ДНК. Значительно больше брунеомицина связывается с ДНК при его ферментативной активации. Проведение исследований с синтетическими полинуклеотидами подтвердило, что в присутствии Zn^{2+} брунеомицин способен связываться как с пуриновыми, так и с пиримидиновыми основаниями [45].

Рубифлавин и его аналоги. Противоопухолевый бактерицидный антибиотик рубифлавин (VIII) получен на *Streptomyces* (SC 3728) Аналоги рубифлавина, такие как гедамицин (IX), кидамицин (X), плюрамицин (XI), также обладают противоопухолевыми свойствами [46]. Рубифлавин и гедамицин избирательно подавляют синтез ДНК в клетках и в меньшей мере влияют на синтез РНК. Эти антибиотики прочно (фактически необратимо) связываются с ДНК. Как рубифлавин, так и гедамицин могут восстанавливаться культурами *E. coli* с образованием свободных радикалов [44, 47], что свидетельствует о важности свободнорадикальных состояний этих антибиотиков при проявлении ими биологической активности. На рис. 12 представлены спектры ЭПР анион-радикалов рубифлавина, полученных при восстановлении препарата в клетках *E. coli* и при действии KBH_4 [44].



Сафрамицины A и C. Хинонсодержащие противоопухолевые антибиотики сафрамицин A и C выделены из *Streptomyces lavendulae* [48] ($R=H$, $R'=CN$ в случае сафрамицина A, и $R=OCH_3$, $R'=H$ в случае сафрамицина C):

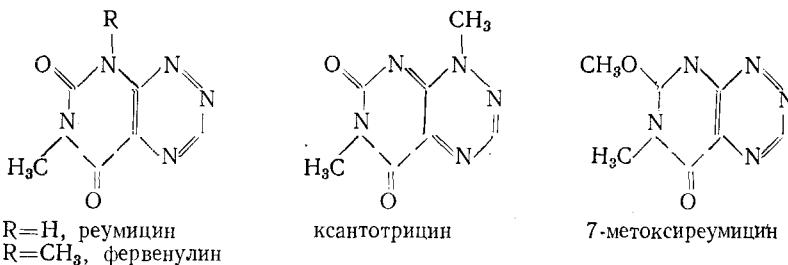


Сафрамицины А и С полностью ингибируют рост клеток L-1210 в культуре при концентрации 0,02 мкг/мл и 1,0 мкг/мл соответственно. Для мышей линии СЗН/Не ЛД₅₀ сафрамицина А и С составляет 10,5 мг/кг и 9,7 мг/кг соответственно. Противоопухолевая активность сафрамицина А в 50—100 раз больше, чем у сафрамицина С. Сафрамицин А был высокоактивен против лейкемии Р-388 и асцитной карциномы Эрлиха и умеренно активен против лейкемии L-1210 и меланомы В-16 [48].

Кроме того, многие другие природные физиологически активные вещества содержат хиноновые структуры, действие которых может быть связано с образованием свободнорадикальных интермедиатов. К препаратам такого типа можно отнести гербимицин В (XII) [49], джаваницин (XIII) [50], антибиотик WS-5995 А, полученный из *Streptomyces auranticolor* (XIV) [51], алканин (XV) [52], лютеоскрин (XVI) [53], лапахол (XVII) [54].

2. Антибиотики пиримидо-5,6-е-1,2,4-триазиновой группы

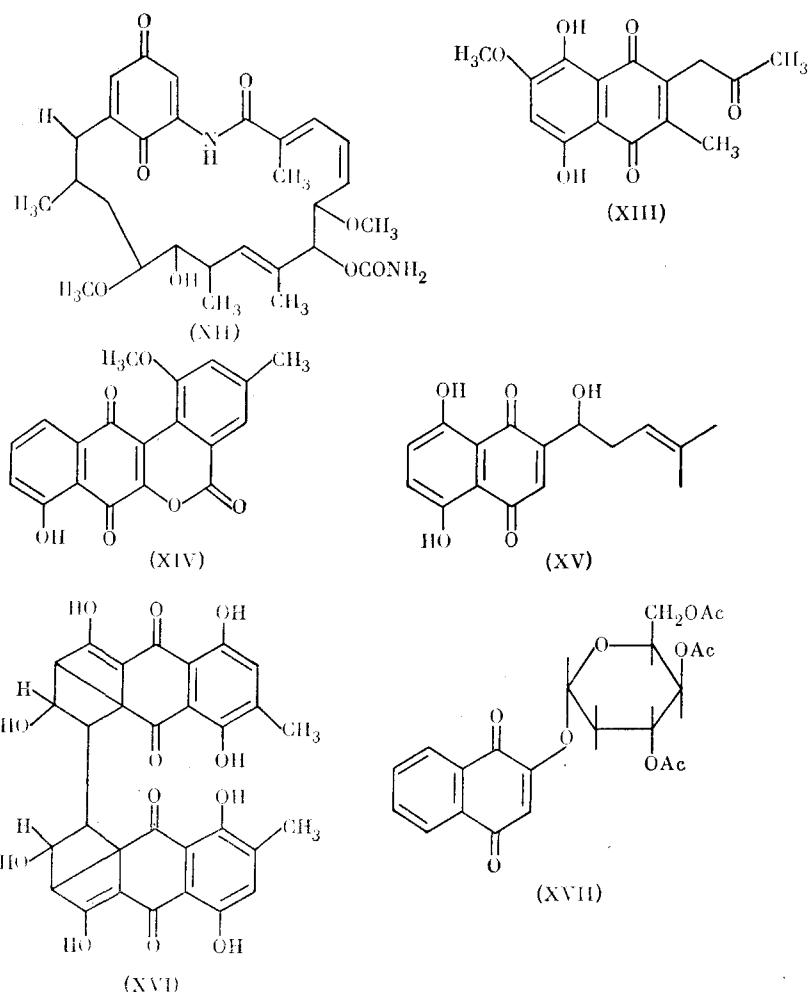
К антибиотикам этого ряда относятся реумицин, фервенулин, ксантотрицин и 7-метоксиреумицин.



Один из представителей этой группы антибиотиков — реумицин в эксперименте обладает широким спектром противоопухолевого действия.

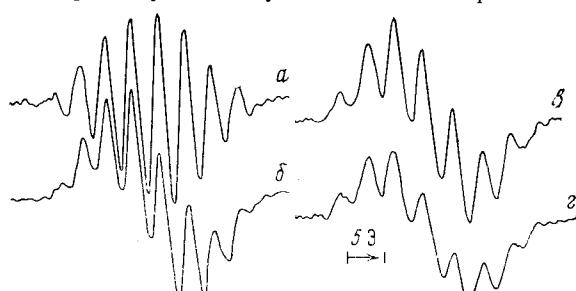
Молекулярные механизмы биологического действия и биотрансформации этих соединений могут быть связаны с промежуточным образованием активных свободнорадикальных состояний. Действительно, методом ЭПР доказано образование устойчивых анион-радикалов пиримидотриазинов при их электрохимическом восстановлении [55]. Для ферментативной активации пиримидотриазинов *in vitro* можно использовать микросомы, в которых локализована система превращений и детоксикации ксенобиотиков. Показано, что антибиотики этого ряда способны акцептировать электрон с НАДФН-цитохром-В₅-редуктазной цепи [56].

Восстановление реумицина в микросомах было изучено в присутствии НАДФН при различных рН. При восстановлении реумицина в щелочной среде (химическое восстановление проведено боргидридом калия при рН 9,0, а микросомальное при рН 8,0) спектр ЭПР представлял собой октет линий с константами расщепления $a^H = a^N = 5,7$ Гц за счет взаимо-



действия с тремя эквивалентными атомами азота и атомом водорода триазинового цикла (рис. 13, а, б). При микросомальном восстановлении метилированного производного реумицина был зарегистрирован аналогичный восьмикомпонентный спектр, откуда следует, что электронная

Рис. 13. Спектры ЭПР радикалов реумицина, полученных при: а — химическом восстановлении под действием KBH_4 , рН 9,0 [35]; б — микросомальном восстановлении в присутствии НАДФН, рН 8,0, в — химическом восстановлении под действием KBH_4 , рН 4,0; г — микросомальном восстановлении в присутствии НАДФН, рН 6,0



структура и распределение спиновой плотности в анион-радикалах реумицина и 7-метоксиреумицина близки между собой. Поскольку при рН 8 реумицин ($\text{p}K_a 6,5$) находится преимущественно в анионной форме, то можно предположить, что в микросомах происходит одноэлектронное восстановление аниона до дианион-радикала, который способен быстро протонироваться по атому кислорода O(7) или по атому азота N(1). Следует, однако, отметить, что спектр ЭПР этого радикала отличается от спектра анион-радикала, полученного при электрохимическом восстановлении 7-метоксиреумицина в диметилформамиде; это может быть связано с условиями его получения в аprotонной среде.

В кислой среде, когда восстанавливаются неионизованные формы реумицина (химическое восстановление проводилось при pH 4,0, а ферментативное при pH 6,0), характер регистрируемых спектров ЭПР меняется. Так, для анион-радикала реумицина получен семикомпонентный сигнал ЭПР с константами расщепления ($a=5,6$ Э) на трех приблизительно эквивалентных ядрах атомов азота триазинового цикла (рис. 13, в, г). При записи спектра при меньшей амплитуде модуляции видно еще

более тонкую структуру, обусловленную дальнейшим подрасщеплением этих семи линий.

Аналогичный спектр был зарегистрирован при микросомальном восстановлении фервенулина. Вероятно, замена атома водорода на метильный фрагмент в положении 8 не влияет на характер распределения спиновой плотности в анион-радикалах. При микросомальном восстановлении ксанторицина был получен десятикомпонентный спектр, обусловленный также расщеплением сигнала неспаренного электрона за счет взаимодействия с тремя эквивалентными атомами азота и тремя атомами водорода метильной группы триазинового фрагмента. Повидимому, спиновая плотность в анион-радикалах пиримидотриазинов локализована преимущественно в триазиновом цикле. Таким образом, в биологических системах может восстанавливаться как реумицин, так и его анион в зависимости от pH среды [35].

Рис. 14. Зависимость $E_{1/2}$ для реумицина (1) и фервенулина (2) от pH

зования преимущественно в триазиновом цикле. Таким образом, в биологических системах может восстанавливаться как реумицин, так и его анион в зависимости от pH среды [35].

В общем случае уравнение окислительно-восстановительных реакций в протонных средах можно записать в виде:



В случае обратимых процессов потенциал этой системы, согласно уравнению Нернста, будет описываться уравнением:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[A][H^+]^m}{[AH_m^{(n-m)-}]}$$

При потенциале полуволны восстановления $E_{1/2}$, когда на поверхности электрода концентрации окисленной и восстановленной форм равны между собой, это уравнение можно записать в виде:

$$E_{1/2} \approx E^0 + \frac{RT}{nF} \ln [H^+]^m \approx E^0 - \frac{2,3mRT}{nF} \text{ pH}$$

или

$$\Delta E_{1/2}/\Delta \text{pH} = -2,3 \frac{mRT}{nF}$$

Общая зависимость $E_{1/2}$ от pH представляется несколькими отрезками прямых, имеющими неодинаковые наклоны, причем значения pH в точках излома соответствуют значениям констант ионизации (pK_a) окисленной или восстановленной форм. Если за точкой излома абсолютная величина $\Delta E_{1/2}/\Delta \text{pH}$, т. е. тангенса угла наклона прямолинейного участка, с возрастанием pH убывает, то собственно излом обусловлен диссоциацией восстановленной формы, и соответствующее значение pK_a относится к последней [57].

Так, при сравнительном изучении закономерностей изменения потенциала полуволны ($E_{1/2}$) в зависимости от pH среды для двух пиримидотриазиновых антибиотиков показано (рис. 14), что в интервале значений pH 4—10 для фервенулина, не способного к ионизации, зависимость $E_{1/2}$

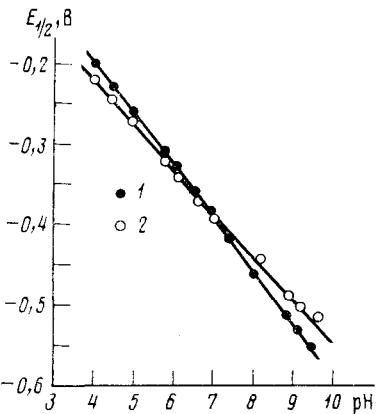


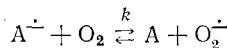
Рис. 14. Зависимость $E_{1/2}$ для реумицина (1) и фервенулина (2) от pH

от pH представляет собой прямую линию с тангенсом угла наклона -0.06 . Для реумицина, являющегося кислотой ($pK_a 6,5$), эта зависимость имеет более сложный вид с характерным изломом в области $pH \sim pK_a$. Вследствие этого реумицин в щелочных сферах восстанавливается хуже, а в кислых — лучше, чем фервенулин.

Общая тенденция к увеличению электроноакцепторных свойств противоопухолевых антибиотиков при понижении pH может быть одной из причин их избирательного действия на опухолевые клетки, имеющих по сравнению с нормой меньшее значение pH.

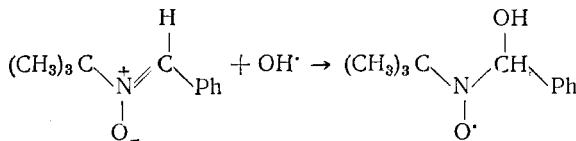
III. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СЕМИХИНОНОВЫХ РАДИКАЛОВ АНТИБИОТИКОВ С ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМ КИСЛОРОДОМ

Семихиноновые радикалы антибиотиков, образующиеся в ходе ферментативного восстановления, в аэробных условиях гибнут при взаимодействии с кислородом с образованием супероксидного радикала



Константа скорости генерирования супероксида при pH 7 выше, чем 10^8 M^{-1} . Эта реакция обратима, скорость обратной реакции на два порядка ниже [29, 58, 59]. По данным [60], в нормально функционирующих клетках *in vivo* парциальное давление кислорода составляет 7 мм рт. ст. (10 мкМ). Предполагая, что концентрация кислорода 10 мкМ и что $[O_2] \gg [O_2^{\cdot}]$ (т.е. реакция имеет псевдопервый порядок) получим что время жизни семихинонового радикала *in vivo* составляет $\ln 2/k[O_2] = 6$ мкс. Следовательно, семихиноновые радикалы антибиотиков в нормальных клетках нестабильны и процессы их химической трансформации (включая возможные реакции с макромолекулами) происходят очень быстро. Естественно, что при пониженном содержании кислорода (например, в клетках злокачественных опухолей) время жизни семихиноновых радикалов может существенно увеличиваться, вследствие чего возрастает вероятность свободнорадикальных реакций при биотрансформации антибиотика.

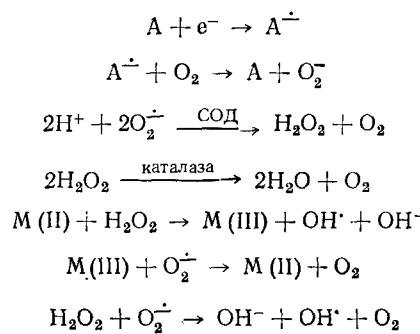
Регистрация образования радикалов O_2^{\cdot} и OH^{\cdot} затруднена из-за их высокой реакционной способности. Одним из наиболее удобных способов регистрации образования супероксидных и гидроксильных радикалов является метод спиновых ловушек. Наиболее часто применяются для этой цели *N*-*тетр*-бутил- α -фенилнитрон (ФБН) и 5,5'-диметил-1-пирролин-1-оксид (ДМПО). Если, например, водный раствор ФБН в фосфатном буфере при pH 7 добавить к раствору семихинонового радикала в ДМСО, полученного путем восстановления ПАА действием KBH_4 , то образуется радикал, представляющий собой спин-аддукт ФБН и группы OH радикала



Его спектр ЭПР представляет собой дублет ($a = 16,0 \text{ Э}$) триплетов ($a = 3,4 \text{ Э}$) с $g = 2,0061$. При смешении раствора семихиноновых радикалов антибиотиков с водным раствором ФБН, содержащим каталазу или супероксиддисмутазу (СОД), образования нитроксильных радикалов не наблюдалось [39]. В то же время денатурированные формы этих ферментов уже не ингибировали образования нитроксильных спин-аддуктов ФБН— OH . Для брунеомицина показано, что в присутствии ЭДТА спин-аддукты не образуются, что указывает на важную роль ионов тяжелых металлов в генерации радикалов OH^{\cdot} [39].

Естественно, что указанные спин-аддукты образуются только в присутствии кислорода. Так, например, при инкубации адриамицина с мик-

росомами образование аддукта ДМПО—супероксид наблюдается только, когда в микросомах есть кислород [27]. После полного расходования растворенного в инкубационной среде кислорода сигналы ЭПР спин-аддуктов OH^{\cdot} и O_2^{\cdot} исчезают и появляется сигнал ЭПР семихинонового радикала адриамицина. По крайней мере, два фактора влияют на это явление: во-первых, аддукт ДМПО — супероксид имеет время жизни 45 с при pH 7,4 [27, 61], а поскольку молекулярный кислород расходуется, образование нитроксильных радикалов может прекратиться; во-вторых, спин-аддукт энзиматически восстанавливается, как и другие нитроксильные радикалы [27, 62]. На основании сказанного была предложена [33] следующая последовательность реакций:



Другим способом регистрации радикалов O_2^{\cdot} в растворе может быть измерение образования адренохрома из адреналина [15]. Скорость образования супероксидных радикалов оценивается по скорости окисления адреналина и образованию адренохрома, которую определяют спектрофотометрически, по поглощению при длине волны 480 нм. Добавление супероксиддисмутазы (10 мкг/мл) ингибирует образование адренохрома.

Изучено генерирование супероксидных радикалов пиримидотиазиновыми антибиотиками в микросомах печени крыс [35]. В отсутствие НАДФН скорость образования O_2^{\cdot} в микросомах очень мала ($\omega = 0,3$ нмоль/мг белка в мин) и не увеличивается при добавлении реумицина, который в этих условиях не восстанавливается до анион-радикала. В присутствии НАДФН в микросомах наблюдается перенос электронов с НАДФН на кислород с образованием супероксидных радикалов ($\omega = 1,8$ нмоль/мг белка в мин). Добавление реумицина в систему резко увеличивает скорость ($\omega = 6,5$ нмоль/мг белка в мин) образования супероксидных радикалов (образование адренохрома) за счет переноса электрона с анион-радикалов антибиотика на кислород. В этих условиях спектры ЭПР анион-радикалов реумицина регистрировались только после полного расходования кислорода. Ксантотрицин, обладающий наименьшим потенциалом восстановления [55], способен восстанавливаться в микросомах без добавления НАДФН. Образующиеся при этом анион-радикалы генерируют супероксидные радикалы с наибольшей скоростью ($\omega = 11,1$ нмоль/мг белка в мин). Вероятно, этим можно объяснить высокую токсичность ксантотрицина и его низкий химиотерапевтический индекс. Это подтверждает высказанные ранее предположения о роли стабильности промежуточно образующихся активных свободно-радикальных форм противоопухолевых препаратов в избирательности их действия [63].

Сопоставление свойств реумицина с другими антибиотиками этого ряда позволяет объяснить более высокую избирательность его противоопухолевого действия. В опухолевых клетках, где величина pH понижена (6,5), равновесие реумицина — анион реумицина смещается в сторону неионизированной формы. Нейтральная форма реумицина из-за низкого потенциала восстановления способна окислять большее число ферментных систем с образованием высокореакционноспособных анион-радикалов и, в силу указанных выше причин, приводить к выраженному цитотоксическому действию. В нормальных клетках, pH которых составляет

ТАБЛИЦА 7

Скорость (w) микросомального окисления НАДФН, стимулированного различными противоопухолевыми препаратами [26]

Препараты	w , нмоль/мг белка в мин	
	воздух	СО
Контроль	0	0
Адриамицин	73	84
Митомицин С	84	81
Брунеомицин	249	209
Лапахол	15	11
Циклофосфан	0	0
Метотрексат	0	0
N,N'-бис-(Хлорэтил)-N-нитрозомочевина	0	0

ТАБЛИЦА 8

Скорость потребления кислорода различными субклеточными экстрактами в присутствии рубомицина [29]

Объект	w_1 , нмоль/мг белка в мин	w_2 , нмоль/мг белка в мин
Цитоплазматический экстракт печени	0,3	1,6
Митохондрии печени	2,1	4,3
Микросомы печени	25,2	93,0

Обозначения: w_1 и w_2 — скорости собственного и катализируемого рубомицином потребления кислорода.

7,5, реумицин на 90% находится в ионизированной форме, способность к восстановлению которой до ион-радикалов значительно ниже. Это и является, по-видимому, причиной избирательности действия реумицина по отношению к опухолевым клеткам.

Образование супероксидных и гидроксильных радикалов за счет переноса электрона с семихиноновых радикалов антибиотиков на кислород было установлено и в случае брунеомицина [39], актиномицина D [15], антрациклиновых антибиотиков [27], митомицина С [27].

Процесс образования радикалов из хинонсодержащих антибиотиков и их дальнейшая гибель при взаимодействии с кислородом могут быть охарактеризованы также степенью микросомального окисления НАДФН и потребления кислорода. Вещества бензоантрахинонового класса, N-гетероциклические хиноны и нафтохиноны, стимулируют окисление НАДФН, но с разной скоростью. Цитотоксические препараты (циклофосфан, метотрексат и др.) неактивны, что установлено при количественном анализе микросомального окисления НАДФН (табл. 7) [26].

Другим показателем интенсивности переноса электрона с семихинона антибиотика на кислород является увеличение скорости потребления кислорода. Обнаружено, что скорость потребления кислорода пропорциональна концентрации как хинонсодержащего антибиотика, так и ферментов. Противоопухолевые препараты, не содержащие хиноновых группировок и не увеличивающие скорости микросомального окисления НАДФН, не влияют на потребление кислорода микросомами [26, 29]. Наибольшая скорость образования супероксидных радикалов, оцениваемая по скорости расходования кислорода в присутствии рубомицина, достигалась при pH 7,8—8,4, хотя в фосфатном буфере была отмечена большая скорость, чем в тристабуферном. Потребление кислорода, стимулированное ПАА, было чувствительно также к концентрации буфера; максимальная скорость была получена при 0,2 М буфере [29].

Различные субклеточные экстракты в разной степени стимулируют потребление кислорода, что обусловлено различиями в количестве ферментов, способных катализировать перенос электрона с НАДФН на хи-

ТАБЛИЦА 9

Кинетические константы * потребления кислорода, стимулированного адриамицином [26]

Микросомы	$10^4 K_m$, моль/л	$10^7 V_{max}$, моль/мин
Печень крысы	3,6	0,92
Легкое крысы	3,1	0,39
Сердце крысы	186,0	0,89
Печень мыши	8,0	2,6
Легкое мыши	2,4	0,44
Сердце мыши	3,1	0,06
Селезенка мыши	28,0	0,14
Клетки L-1210	4,4	0,2
Клетки P-388	0,6	0,04

* K_m , V_{max} — параметры уравнения Михаэлиса.

ТАБЛИЦА 10

Кинетические константы * потребления кислорода, стимулированного ПАА в микросомах [29]

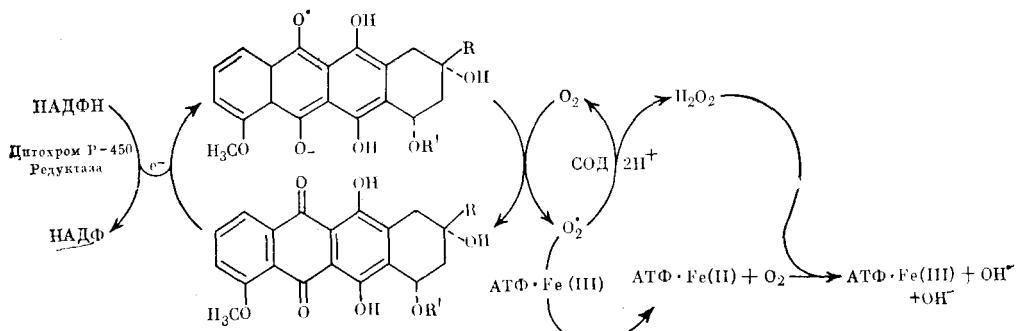
Антибиотики	K_m , мкМ	V_{max} , нмоль/мин
Рубомицин	390	35
Адриамицин	260	240
Даунорубицинол	250	230
Карминомицин	110	770
Адриамицин Fe^{3+}	250	620

* K_m , V_{max} — параметры уравнения Михаэлиса.

ненсодержащий антибиотик (табл. 8) [29]. Наиболее интенсивно этот процесс происходит в микросомах. Вместе с тем обращает на себя внимание различие активности микросом из разных органов. Исследованы микросомы разных органов (печень, легкие, сердце) мышей и крыс; определяли их способность увеличивать потребление O_2 , используя в качестве субстрата адриамицин (табл. 9). Найдено, что микросомы из опухолевых клеток L-1210 и P-388 также катализируют увеличение потребления кислорода, но значительно слабее, чем микросомы из нормальных органов, что связано с нарушением функциональной активности опухолевых клеток и клеточных органелл (табл. 9) [26].

Все антрациклические антибиотики обладают способностью переносить электрон с НАДФН на кислород. В этом ряду выделяется карминомицин, который катализирует перенос электрона на кислород с наибольшей скоростью; это свойство коррелирует с его высокой токсичностью (табл. 10) [29].

В общем случае ПАА и их структурные аналоги с N-хиноидным фрагментом при восстановлении *in vivo* образуют свободные радикалы семихинонового типа, автоокисление которых приводит к генерированию супероксидов.



Согласно приведенной выше экспериментально обоснованной схеме антибиотики этого ряда действуют как конкурентные агенты переноса электронов на кислород в цепи биологического окисления [64]. Естественно, что химическая модификация антибиотиков, связанная со снижением их способности к генерированию супероксида, должна сопровождаться уменьшением токсичности. Действительно, монооксим брунеомицина, неспособный выступать в качестве переносчика электронов на кислород, оказался менее токсичен по отношению к *E. coli* причем величина токсической дозы не зависела от уровня супероксиддисмутазной активности клеток [65].

Различные добавки в микросомы могут приводить к изменению скорости потребления кислорода. Так, коэнзим-*Q* заметно увеличивает как собственное, так и стимулированное рубомицином потребление кислорода. Напротив, α -токоферол, известный природный антиоксидант, ингибирует собственное потребление кислорода на 60%, а стимулированное антибиотиком — на 80%. В то же время глутатион и цистеин активируют потребление кислорода (табл. 11) [29].

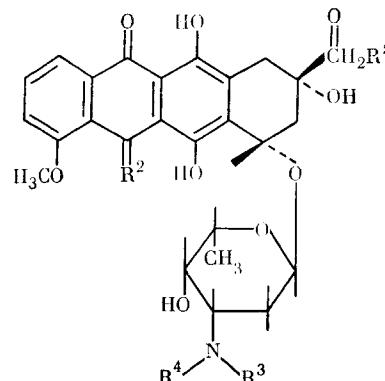
ТАБЛИЦА 11
Влияние различных добавок на скорость потребления кислорода
микросомами [29]

Добавки	w_1 , нмоль O_2 /мин	w_2 , нмоль O_2 /мин
Без добавок	35	296
Гексабарбитал	88	309
Аспирин	54	302
Коэнзим- <i>Q</i>	53	447
GSH	53	389
Цистеин	49	388
α -Токоферол	13	68
ЭДТА	18	252
Fe ³⁺	49	315

Обозначения: w_1 и w_2 — скорости собственного и катализируемого адриамицином потребления кислорода; GSH — глутатион восстановленный.

Основным побочным действием ПАА является кардиотоксичность. В работе [66] исследовано соотношение между кардиотоксичностью ряда ПАА и ингибированием ими синтеза сердечной гуанилатцилазы. Было обнаружено, что синтетические ПАА, имеющие в положении С(9) гидразоновые производные, не ингибируют, а стимулируют гуанилат-цилазную активность.

Последнее время кардиотоксичность объясняют образованием радикалов O_2^- , OH^- в сердечной мышце. Существует корреляция между способностью образовывать супероксидные радикалы и кардиотоксичностью некоторых антрациклинов [64] (рис. 15).



$R^1 = H$, $R^2 = NH$, $R^3 = H$, $R^4 = CH_2Ph$ (XVIII); $R^1 = H$, $R^2 = O$,

$R^3 = R^4 = CH_2Ph$ (XIX); $R^1 = OH$, $R^2 = O$, $R^3 = R^4 = CH_3$ (XX)

ТАБЛИЦА 12
Относительная активность каталазы (в отн. ед.)
в различных органах крысы и кролика [34]

Орган	Кролик	Крыса
Кровь	20	16,2
Печень	23	45,3
Почки	26	19,0
Легкое	2,9	1,9
Сердце	1,0	1,0

Токсическое действие радикалов на сердечную мышцу связано с пониженным содержанием в клетке супероксиддисмутазы и каталазы (табл. 12) [34]. Показано *in vivo* что введение природного антиоксиданта — α -токоферола приводит к снижению кардиотоксичности и к увеличению продолжительности жизни животных [67]. Показано, что аскорбат также может понижать общую токсичность и кардиотоксичность

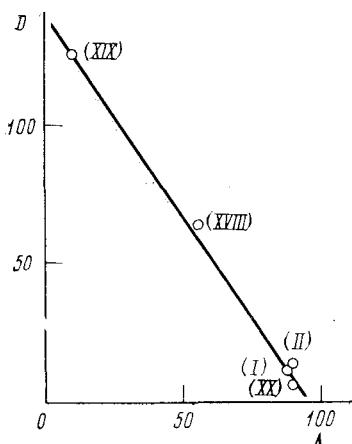


Рис. 15. Взаимосвязь между дозой антрациклинов, вызывающей одинаковый кардиотоксический эффект по Збиндену (D), и относительной скоростью генерирования супероксидных радикалов различными антрациклиными (A) (по данным [64])

препаратов, обусловленные ПАА. Электронномикроскопические и гистологические исследования демонстрируют, что аскорбат предотвращает ранние изменения в сердечной мышце при действии ПАА [68].

Обнаружено, что ПАА стимулируют перекисное окисление липидов. Инкубация микросом печени крысы с НАДФН-генерирующей системой производят ~ 10 нмолям эквивалента малонового альдегида/мг белка в течение 60 мин. Перекисное окисление протекало в 6 раз быстрее при добавлении 100 мкМ адриамицина. Стимулированное ПАА перекисное окисление липидов влияет на активность некоторых ферментных систем микросом [69]. Обнаружено понижение содержания цитохром-Р-450-редуктазы на 85% и ингибирование аминопурин-Н-деметилазной активности на 70%. На НАДФН цитохром С-редуктазную активность перекисное окисление липидов не влияло; УДФ глюкоронилтрансферазная активность увеличивается в 5 раз, а глюкозо-6-фосфатазная активность уменьшилась при этом в 6 раз. В отсутствие перекисного окисления липидов адриамицин также влияет на эти ферменты [69], но в меньшей степени (рис. 16).

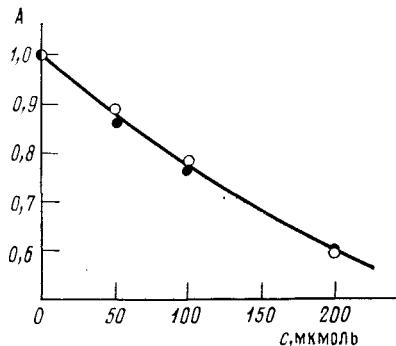
Исходя из всего сказанного выше, можно сделать следующий вывод: в организме могут окисляться как анионы, так и анион-радикалы ПАА, токсическое действие препаратов обусловлено их способностью к окислению, а для понижения их токсичности необходимо введение конкурирующих с ними специальных антиоксидантов.

С целью повышения противоопухолевого индекса и понижения кардиотоксичности были синтезированы различные аналоги природных ПАА. Введение иминогруппы в положение 5 хромофора понижает способность к восстановлению и к дальнейшему окислению. Это приводит к значи-

тельному уменьшению скорости генерирования супероксидных радикалов по сравнению с адриамицином [55].

Изменения в углеводном кольце также могут влиять на способность ПАА к ферментативному восстановлению. Так, N-метилирование сахарных групп приводит к увеличению способности ПАА к восстановлению, увеличивает степень потребления кислорода и скорость образования супероксидных радикалов. При этом кардиотоксичность этих препаратов возрастает [64]. Если же в углеводный фрагмент введены две N-бензиль-

Рис. 16. Влияние концентрации адрианамицина (c) на содержание цитохрома Р-450 и активность аминопурин-N-деметилазы в отсутствие перекисного окисления липидов (по данным [69])



ные группы, то потребление кислорода и образование супероксидных радикалов резко уменьшаются. Это может быть связано со стерическим ингибированием действия цитохрома Р-450 микросом на антибиотик.

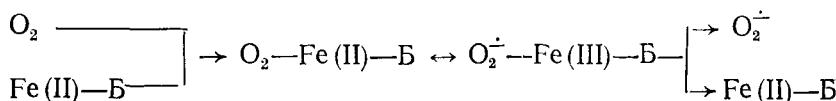
Активация лекарственных препаратов и их дальнейший метаболизм зависят от функционального состояния клеток, степени их дифференцировки. С этим, в частности, могут быть связаны различия в эффективности действия тех или иных противоопухолевых антибиотиков в зависимости от степени аэрации опухолевых клеток. По этому признаку ряд известных канцеролитиков может быть разделен на три группы, представленные в табл. 13 [70].

ТАБЛИЦА 13
Классификация противоопухолевых агентов по эффективности их действия в зависимости от степени аэрации клеток [70]

Агенты, действие которых зависит от степени аэрации		Препараторы, действие которых не зависит от степени аэрации
активны при аэробных условиях	активны в условиях гипоксии	
Блеомицин	митомицин С	5-фторурацил
Брунеомицин	адриамицин	метотрексат
Актиномицин D	мизонидазол	цис-дихлордиаминоплатина
Прокарбазин	метронидазол	N,N'-бис-(хлорэтил)-N-нитрозомочевина
Винкристин	5-тио-D-глюкоза	N-хлорэтил-N'-циклогексил-N-нитрозомочевина
Ионизирующая радиация	2-дезокси-D-глюкоза	

В группу препаратов, цитотоксический эффект которых возрастает с увеличением концентрации кислорода, входят три антибиотика: блеомицин, брунеомицин и актиномицин D. Известно, что блеомицин характеризуется высокой легочной токсичностью, которая существенно возрастает с увеличением парциального давления O_2 [71]. Блеомицин вызывает разрывы молекул ДНК, причем его реакционная способность зависит от наличия ионов железа и молекулярного кислорода. За разрывы ДНК в этих условиях могут быть ответственны высокореакционно-способные радикальные формы кислорода. Показано, что реакция блеомицина с $^3\text{H-ДНК}$ в присутствии ионов железа ингибируется, если реакционную смесь продуть аргоном. В случае аэрации реакция идет через тройной комплекс $O_2 - \text{Fe(II)} - \text{блеомицин}$ ($O_2 - \text{Fe(II)} - \text{Б}$), который аналогичен по свойствам гем-содержащим оксигеназам [72]. Этот комплекс образуется при прямом окислении молекулярным кислородом

Fe(II) — блеомицина (Fe(II) — Б) с константой скорости реакции второго порядка $k = 6,1 \cdot 10^3$ моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$:



Последующая стадия генерирования супероксидного радикала и образования комплекса Fe(II) — Б характеризуется константой скорости первого порядка $k = 0,12$ с $^{-1}$. При pH 7 окисление комплекса Fe(II) — Б кислородом приводит к образованию трех различных парамагнитных форм Fe(III) — Б: одной высокоспиновой ($s = 5/2$) и двух низкоспиновых ($s = 1/2$). Низкоспиновая форма, имеющая параметры спектра $g_{xx} = 2,25$, $g_{yy} = 2,17$, $g_{zz} = 1,94$, нестабильна и быстро исчезает (за 60 с при комнатной температуре). Две другие формы — высокоспиновая ($g = 4,3$) и низкоспиновая ($g_{xx} = 2,40$, $g_{yy} = 2,18$, $g_{zz} = 1,90$) являются стабильными [73].

В аэробных условиях восстановление брунеомицина боргидридом в присутствии ДНК сопровождается уменьшением вязкости и средней молекулярной массы ДНК [44], что обусловлено появлением одиночных разрывов в молекуле ДНК [74]. Поскольку супероксиддисмутаза ингибирует этот процесс [75], можно предполагать, что за деградацию ДНК ответственны активные радикальные формы кислорода. Эти результаты позволяют объяснить усиление токсического действия брунеомицина на *E. coli* в присутствии кислорода или при пониженном содержании СОД.

Если действие митомицина С обусловлено алкилированием и образованием сшивок биомакромолекул, то цитотоксическое действие брунеомицина обусловлено активными радикалами кислорода. Избирательное действие на опухолевые клетки препаратов, генерирующих эти радикалы, можно объяснить снижением содержания СОД в опухолевых клетках [76]. По-видимому, избирательное повышение концентрации O_2 в опухолевых клетках можно использовать для направленной химиотерапии опухолей.

Еще одним антибиотиком этого типа является актиномицин D. Механизм его действия объясняется его способностью интеркалировать между основаниями ДНК [38]. Для него при концентрации меньше 0,01 мкМ разница в цитотоксичности в аэробных условиях и при гипоксии невелика. Однако при концентрации ~ 1 мкМ богатые кислородом клетки в ~ 100 раз более чувствительны к летальному действию актиномицина D, чем в условиях гипоксии [70]. По-видимому, существует альтернативный кислород-зависимый механизм цитотоксического действия актиномицина D, когда при достаточно высоких концентрациях препарата часть его остается неинтеркалированной между основаниями ДНК. При инкубации с белками микросом актиномицин D образует свободный семихинновый радикал, который стимулирует потребление кислорода, перенося электрон на кислород. При инкубации актиномицина D и его спин-меченных аналогов с микросомами печени в присутствии НАДФН увеличиваются скорости потребления кислорода, образования супероксида и окисления адреналина (табл. 14) [15]. Видно, что спин-меченные антибиоти-

ТАБЛИЦА 14

Скорости потребления кислорода (w_1) и образования адено-хрома (w_2) из адреналина в микросомах в присутствии актиномицина D и его спин-меченных аналогов [15]

Препараторы	w_1 , нмоль/мг белка в мин	w_2 , нмоль/мг белка в мин
(V)	8,17	2,45
(VI)	18,37	4,66
(VII)	99,28	13,96
Контроль	7,23	1,29

ки сильнее стимулируют образование супероксидных радикалов по сравнению с актиномицином D.

Было также изучено влияние связывания препаратов с ДНК на генерирование O_2^- . После инкубации актиномицина D с ДНК он полностью терял способность генерировать супероксид. Инкубация с ДНК спин-меченых аналогов (VI) и (VII) приводила к снижению скорости потребления кислорода на 71 и 50% соответственно, а также к снижению скорости окисления адреналина. Эти результаты еще раз свидетельствуют о том, что интеркалированные между основаниями ДНК антибиотики являются «плохими» субстратами для ферментативного восстановления. Таким образом, образование супероксида, перекиси водорода и гидроксидных радикалов может играть важную роль в противоопухолевом действии препаратов рассматриваемого типа [15].

* * *

Совокупность полученных данных позволяет сделать ряд выводов относительно молекулярных механизмов токсического и противоопухолевого действия активных свободнорадикальных форм антибиотиков. Наиболее существенными из них следует считать доказательство образования химически активных форм восстановленного кислорода и ковалентное связывание свободнорадикальных форм антибиотиков с биомакромолекулами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Emanuel N. M. J. Pure Appl. Chem., 1979, v. 52, p. 11.
2. Булкина З. П. В кн.: Противоопухолевые препараты. Справочник. Киев: Наукова думка, 1978, с. 166.
3. Ди Марко А. В кн.: Механизм действия антибиотиков/Под ред. Г. Ф. Гаузе. М.: Мир, 1969, с. 197.
4. Eichholz-Wirth H. Brit. J. Cancer, 1980, v. 41, p. 886.
5. Yesail D. W., Thayer P. S., McNitt S., Teague K. Europ. J. Cancer, 1980, v. 16, p. 901.
6. Hall S. W., Benjamin R. S., Burgess M. A., Bodey G. P., Luna M. A., Freireich E. Cancer Treat. Repts., 1982, v. 66, p. 2033.
7. Levi-Schaffer F., Bernstein A., Meshorer A., Arnon R. Ibid., 1982, v. 60, p. 107.
8. Baurain R., Masquelier M., Campeneenre D., Trouet A. J. Med. Chem., 1980, v. 23, p. 1171.
9. May P. M., Williams G. K., Williams D. R. Europ. J. Cancer, 1980, v. 16, p. 1275.
10. Rahman A., More N., Schein P. S. Cancer Res., 1982, v. 42, p. 1817.
11. Baldwin R. W., Embleton M. J., Price M. R. Molec. Aspects Med., 1981, v. 4, p. 329.
12. Эмануэль Н. М., Коновалова Н. П., Дьячковская Р. Ф., Денисова Л. К. Антибиотики, 1982, т. 27, с. 811.
13. Поваров Л. С., Григорян Г. Л., Исаева Н. Н., Сускина В. И. Там же, 1979, т. 24, с. 488.
14. Эмануэль Н. М., Коновалова Н. П., Дьячковская Р. Ф., Шапиро А. Б., Сускина В. И., Поваров Л. С., Денисова Л. К., Волкова Л. М., Варфоломеев В. Н., Васильева Л. С. В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Матер. II Всесоюзн. совещ. Черноголовка, 1982, с. 126.
15. Sinha B. K., Cox M. G. Mol. Pharmacol., 1981, v. 178, p. 435.
16. Duverney V. H., Pachter J. A., Crooke S. T. Cancer Res., 1980, v. 40, p. 387.
17. Орлов В. С., Лужков В. Б., Богданов Г. Н. В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Матер. II Всесоюзн. совещ. Черноголовка, 1982, с. 30.
18. Pople I. A., Bevekidge D. L. Approximate MO Theory. New York: McGraw Hill, 1970.
19. Bachur N. P., Gee M. V. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1976, v. 197, p. 681.
20. Орлов В. С., Богданов Г. Н. Антибиотики, 1984, т. 29, с. 748.
21. Гольдберг Л. Е., Шепеленцева Н. Г., Ветроградова Т. П., Филиппосыянц С. Т., Степанова Э. С. В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Матер. Всесоюзн. совещ. Черноголовка, 1980, т. 1, с. 193.
22. Barthelemy-Clavey V., Maurizot J.-C., Dimicoli J. L., Sicard P. FEBS Letters, 1974, v. 46, p. 5.
23. Eksborg S. J. Pharm. Sci., 1978, v. 67, p. 785.
24. Лужков В. Б. Докл. АН СССР, 1982, т. 268, с. 126.
25. Pietronigro D. D., McGinness J. E., Koren M. J., Crippa R., Seligman M. L., Demopoulos H. S., Physiol. Chem. and Phys., 1979, v. 11, № 5, p. 53.
26. Bachur N. R., Gordon S. L., Gee M. V. Cancer Res., 1978, v. 38, p. 1745.
27. Kalyanaraman B., Perez-Reyes E., Mason R. P. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 630, p. 119.

28. Sato S., Jwaizumi M., Handa K., Tamuka Y. GANN, 1977, v. 68, p. 603.
29. Bachur N. R., Gordon S. L., Gee M. V. Molec. Pharmacol., 1977, v. 13, p. 901.
30. Pan S.-S., Pedersen L., Bachur N. R. Ibid., 1982, v. 19, p. 184.
31. Дудник Ю. В., Резникова М. И. В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Матер. Всесоюзн. совещ. Черноголовка, 1980, т. 1, с. 192.
32. Magin R. L., Cysyk R. L., Litterst C. L. Cancer Trat. Repts., 1980, v. 64, p. 203.
33. Powis G., Appel P. L., Biochem. Pharmacol., 1980, v. 29, p. 2567.
34. Thayer W. S. Chem. Biol. Interact., 1977, v. 19, p. 265.
35. Орлов В. С., Богданов Г. Н., Эмануэль Н. М., Есинов С. Е., Навашин С. М. Био-орган. химия, 1983, т. 9, с. 556.
36. Gray P. J., Phillips D. R. Photochem. and Photobiol., 1980, v. 32, p. 621.
37. Chezzi P., Donegli M. G., Pantarotto C., Facchinetto T., Garattini S. Biochem. Pharmacol., 1981, v. 30, p. 175.
38. Гаузе Г. Ф., Дудник Ю. В. В кн.: Химиотерапия злокачественных опухолей/Под ред. Н. Н. Блохина. М.: Медицина, 1977, с. 139.
39. Lown J. W., Sim S.-K., Chen H.-H. Canad. J. Biochemistry, 1978, v. 56, p. 1042.
40. Iyer V. N., Szybalski M. Science, 1964, v. 145, № 3627, p. 55.
41. Nagata C., Kodama M., Ioki Y., Kimura T. In: Free Radical and Cancer/Ed. by R. Floyd, New York—Basel: Marcel Dekker, 1982, p. 53.
42. Gutierrez P. L., Friedman R. D., Bachur N. R. Cancer Treat. Repts., 1982, v. 66, p. 340.
43. White H. L., White J. R. Mol. Pharmacol., 1968, v. 4, p. 594.
44. White J. R., Deakman H. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, v. 54, p. 887.
45. Sinha B. K. Chem. Biol. Interact., 1982, v. 36, p. 179.
46. Nadig H., Sequin V. Helv. Chim. Acta, 1980, v. 63, № 260, p. 2446.
47. White H. L., White J. R. Biochemistry, 1969, v. 8, p. 1030.
48. Tadashi Arai, Katsutiro Takahashi, Kimiko Ishiguro, Yuzuru Mikami. GANN, 1980, v. 71, p. 760.
49. Iwai Y., Nakagawa A., Sadakane N., Omura S., Oiwa H., Matsumoto S., Takahashi H., Ikai T., Ochiai Y. J. Antibiotics, 1980, v. 33, p. 1114.
50. Kurobane I., Vaning L. C., McInnes, Gerber N. N. Ibid., 1980, v. 33, p. 1376.
51. Ikushima H., Okamoto M., Tanaka H., Ohe O., Kohsaka H., Aoki H., Imanka H. Ibid., 1980, v. 33, p. 1107.
52. Sankawa S., Otsuka H., Kataoka Y., Iitaka Y., Hoshi A., Kuretani K. Chem. Pharm. Bull., 1981, v. 29, p. 116.
53. Гейл Э., Кандлифф Э., Рейнолдс П., Ричмонд М., Уоринг М. Молекулярные основы действия антибиотиков/Под ред. Г. Ф. Гаузе. М.: Мир, 1975, с. 275.
54. Семенов А. А. Природные противоопухолевые соединения. Новосибирск: Наука, 1979, с. 49, 102.
55. Казакова В. М., Макаров И. Г., Минина Н. Е., Есинов С. Е., Чернышев А. И. Био-орган. химия, 1981, т. 7, с. 1404.
56. Wolrab H., Degen H. Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 256, № 2, p. 216.
57. Оттоэй Дж. В. кн.: Индикаторы, т. 2/Под ред. И. Н. Марова. М.: Мир, 1978, с. 44.
58. Meisel D., Czapski G. J. Phys. Chem., 1975, v. 79, p. 1503.
59. Willson R. L. Chem. Ind., 1975, v. 5, p. 183.
60. Chance B., Oshino N., Sugano T., Mayevsky A. Adv. Exp. Med. Biol., 1973, v. 37A, p. 277.
61. Bueltner G. R., Oberley L. W. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, v. 83, p. 63.
62. Rosen G. M., Rauchmann E. J. Biochem. Pharmacol., 1977, v. 26, p. 675.
63. Богданов Г. Н., Эмануэль Н. М. В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Матер. II Всесоюзн. совещ. Черноголовка, 1982, с. 22.
64. Lown J. W., Chen H.-H., Plambeck J. A. Biochem. Pharmacol., 1982, v. 31, p. 575.
65. Gregory E. M., Fridovich I. J. Bacteriol., 1973, v. 114, p. 1193.
66. Lehotay D. C., Levey B. A., Rogerson B. J., Levey G. S. Cancer Treat. Repts., 1982, v. 66, p. 311.
67. Van Vleet J. F., Ferrans V. J. Ibid., 1980, v. 64, p. 315.
68. Fujita K., Shinpo K., Yamaga K., Sato T., Niimi H., Shamoto M., Nagatsu T., Takeuchi T., Umezawa H. Cancer Res., 1982, v. 42, p. 309.
69. Minnaugh E. G., Trush M. A., Ginsburg E., Hirokata Y., Gram T. E. Toxicol and Appl. Pharmacol., 1981, v. 61, p. 313.
70. Teicher B. A., Lazo J. S., Sorlorelli A. C. Cancer Res., 1981, v. 41, p. 73.
71. Toledo C. H., Ross W. E., Hood C. I., Rlock E. R. Cancer Treat. Repts., 1982, v. 66, p. 359.
72. Scheulen M. E., Kuppus H., Thyssen D., Schmidt C. L. Biochem. Pharmacol., 1981, v. 30, p. 3385.
73. Dabrowiak J. C. Inorg. Biochem., 1980, v. 13, p. 317.
74. White H. L., White J. R. Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 123, p. 648.
75. Gregory E. M., Fridovich I. J. Bacteriol., 1972, v. 111, p. 166.
76. Oberley L. W., Bueltner G. R. Cancer Res., 1979, v. 39, p. 1141.

Отделение Института химической
физики АН СССР, Черноголовка