

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Севастопольский государственный университет»

На правах рукописи

БУЧЕЛЬНИКОВ АНАТОЛИЙ СЕРГЕЕВИЧ

**РАЗВИТИЕ ТЕОРИИ ИНТЕРЦЕПТОРНО-ПРОТЕКТОРНОГО
ДЕЙСТВИЯ ПРИ СОВМЕСТНОМ СВЯЗЫВАНИИ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ДНК**

03.01.02 — Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук,
профессор Евстигнеев Максим Павлович

СЕВАСТОПОЛЬ — 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
РАЗДЕЛ 1. ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ИХ КОМБИНИРОВАННОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ	11
1.1. Медико-биологические эффекты, наблюдаемые при совместном ис- пользовании ароматических соединений	11
1.1.1. Влияние производных ксантина.....	13
1.1.2. Влияние рибофлавина и флавин-моноклеотида	14
1.1.3. Влияние хлорофиллина	15
1.2. Развитие представлений об интерцепторном механизме действия.....	16
1.3. Развитие представлений о протекторном механизме действия	20
1.4. Объединение представлений об интерцепторном и протекторном ме- ханизмах действия	22
1.5. Первичный этап формирования теории интерцепторно- протекторного действия (ИПД)	24
1.5.1. Общие принципы построения количественной теории ИПД	24
1.5.2. Редуцированные теории ИПД	26
1.5.3. Олигомерная теория ИПД.....	29
РАЗДЕЛ 2. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА И АНАЛИЗА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ	35
2.1. Физические основы спектрофотометрии.....	36
2.1.1. Общие характеристики молекулярной спектроскопии	36
2.1.2. Устройство спектрофотометра.....	37
2.2. Методика проведения спектрофотометрического эксперимента	38

2.3. Методы нелинейной оптимизации	40
2.3.1. Общий алгоритм проведения вычислительного эксперимента	40
2.3.2. Метод Левенберга — Марквардта	41
2.3.3. Метод ломаных доверительных областей	42
2.4. Математические методы моделирования равновесия	43
2.4.1. Общие принципы записи статистической суммы системы	43
2.4.2. Метод трансфер-матриц	44
2.4.3. Метод производящих последовательность функций	45

РАЗДЕЛ 3. СТАТИСТИКО-ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ БАЗИС

ИНТЕРЦЕПТОРНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ	48
3.1. Агрегация ароматических БАС	48
3.1.1. Доказательство термодинамической выгоды последова- тельной агрегации БАС	49
3.1.2. Обоснование справедливости использования бесконечномер- ных моделей агрегации	57
3.2. Статистико-термодинамические подходы к описанию молекулярной гетероассоциации	68
3.3. Вывод модели многокомпонентной гетероассоциации	71
3.3.1. Вывод большой статистической суммы с использованием фор- мализма ТМ	71
3.3.2. Вывод большой статистической суммы с использованием фор- мализма SGF	75
3.3.3. Сравнение больших статистических сумм, полученных с ис- пользованием подходов ТМ и SGF	77
3.3.4. Вывод выражения для закона сохранения массы	79
3.3.5. Вывод выражения для экспериментально наблюдаемого пара- метра	82
3.4. Исследование частных случаев модели многокомпонентной гетеро- ассоциации	85

3.4.1. Сведение к частным случаям, известным в литературе	86
3.4.2. Вывод $1:m:n$ модели гетероассоциации.....	86
3.5. Верификация моделей многокомпонентной гетероассоциации	92
3.5.1. Двухкомпонентные системы	92
3.5.2. Трехкомпонентные системы.....	96

РАЗДЕЛ 4. РАЗВИТИЕ И ПРИЛОЖЕНИЕ ОБОБЩЕННОЙ ТЕОРИИ

ИНТЕРЦЕПТОРНО-ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ.....	99
4.1. Формулировка физической модели и вывод основных соотношений обобщенной теории ИПД.....	99
4.1.1. Формулировка основных положений обобщенной теории ин- терцепторно-протекторного действия	99
4.1.2. Закон сохранения массы в системе Препарат — Интерцептор1 — ... — Интерцептор($N - 1$) — ДНК	102
4.1.3. Расчет факторов R_D и A_D	105
4.2. Верификация уравнений обобщенной теории ИПД.....	107
4.2.1. Модификация уравнений теории обобщенной ИПД для анализа спектрофотометрических данных в трехкомпонентной ДНК- содержащей системе.....	108
4.2.2. Система Бромистый этидий — Кофеин — ДНК.....	110
4.2.3. Система Профлавин — Кофеин — ДНК.....	113
4.3. Частные случаи обобщенной теории ИПД.....	116
4.3.1. Редуцирование обобщенной теории ИПД к олигомерной тео- рии	116
4.3.2. Ре-параметризация уравнений обобщенной теории ИПД.....	119
4.3.3. Теория ИПД без учета протекторного механизма	122
4.3.4. Теория ИПД без учета интерцепторного механизма. Анализ мультимодального связывания бромистого этидия с ДНК.....	124
4.4. Косвенное доказательство необходимости учета протекторного ме- ханизма действия в кофеин-содержащих системах	133

4.5. Надежность количественного описания биологического эффекта в рамках обобщенной теории ИПД.....	135
4.6. Применение теории ИПД к данным биологического эксперимента.....	139
4.6.1. Точечная оценка по данным мутагенного теста.....	140
4.6.2. Точечная оценка по данным эксперимента на пролифелирующихся клеточных линиях.....	145
4.6.3. Оценка по концентрационной зависимости фактора A_D	146
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	149
ВЫВОДЫ	150
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	151
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	152

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Биологический синергизм, возникающий при введении в биосистему комбинаций биологически активных соединений (БАС), составляет основу некоторых режимов современной химиотерапии онкологических заболеваний. В связи с этим управляемость и предсказуемость отклика биосистемы на комбинации БАС является чрезвычайно важным для стимулирования дальнейшего прогресса в данной области медицинских исследований.

Одними из наиболее изученных групп БАС, демонстрирующих биологический синергизм при совместном использовании, являются ароматические соединения ДНК-направленного действия, механизм биологического действия которых связывают с процессами нековалентного комплексообразования: гетероассоциации препаратов и/или конкуренции за места посадки на ДНК. Если молекулярное комплексообразование лежит в основе наблюдаемого в эксперименте биологического синергизма, то должна существовать количественная взаимосвязь биологических и физико-химических параметров. В явном или неявном виде поиск этой взаимосвязи проводился многими исследователями, что в итоге позволило обнаружить некоторые важные корреляции биологических и физико-химических параметров в различных частных системах, и заложить основы теории интерцепторно-протекторного действия (ИПД). Накопленный к настоящему времени биологический и физико-химический материал, а также имеющиеся представления о механизмах биологического действия в комбинациях ДНК-связывающихся БАС ставят вопрос о необходимости создания единой обобщенной теории ИПД.

Связь диссертации с научными программами, планами, темами. Работа выполнялась в рамках госбюджетной научно-исследовательской тематики Министерства образования и науки Украины: “Комплекс-2” (№ государственной регистрации 0112U00635): “Структура и термодинамика суперспецифического связывания с ДНК нового класса композитных MGB лигандов”, 2013-2014 гг. — младший научный сотрудник.

Цель и задачи исследования. Целью работы является построение обобщенной теории интерцепторно-протекторного действия в многокомпонентных системах ДНК-связывающихся БАС. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Создание статистико-термодинамического базиса для описания интерцепторного механизма: разработка модели многокомпонентных взаимодействий в системах Лиганд₁ — Лиганд₂ — ... — Лиганд_N без ограничений на константы комплексообразования, концентрации и стехиометрию комплексов.
2. Формулировка физической модели биологического синергизма в системах Препарат — Интерцептор₁ — ... — Интерцептор_(N-1) — ДНК.
3. Вывод уравнений баланса массы и установление взаимосвязи физико-химических и биологических параметров на модели полимерной ДНК.
4. Редукция уравнений теории ИПД к частным случаям и их верификация.
5. Анализ в рамках обобщенной теории ИПД опубликованных данных биологических экспериментов *in vitro* по комбинированному введению ароматических БАС в биосистему.

Объект исследования: многокомпонентные системы Препарат — Интерцептор₁ — ... — Интерцептор_(N-1) — ДНК.

Предмет исследования: молекулярное комплексообразование и взаимосвязь процессов комплексообразования с биологическим эффектом *in vitro* в многокомпонентных системах.

Методы исследования: метод статистической термодинамики — для вывода основных соотношений теории ИПД, метод спектрофотометрии в УФ и видимом диапазоне длин волн — для верификации уравнений теории.

Научная новизна полученных результатов. Впервые проведено объединение различных фрагментарных представлений и подходов к количественному описанию биологического синергизма в многокомпонентных системах в единую обобщенную теорию ИПД, оперирующую полимерной моделью ДНК в качестве биорецептора. Показано, что все основные предложенные количественные модели многокомпонентных систем являются частным случаем данной теории. В об-

щем виде установлена взаимосвязь между относительным изменением биологического эффекта при комбинированном введении ароматических БАС (фактор A_D) и параметрами межмолекулярного взаимодействия. Выявлено фундаментальное проявление интерцепторного механизма действия в виде гиперболической взаимосвязи константы гетероассоциации и биологического эффекта на примере антимутагенной активности хлорофиллина по отношению к мутагенам из ряда гетероциклических аминов. Впервые дано косвенное экспериментальное подтверждение значимости протекторного механизма действия в системах Препарат — Кофеин — ДНК.

Практическое значение полученных результатов. Обобщенная теория ИПД предоставляет «инструмент» анализа биологического эффекта при комбинированном использовании ДНК-связывающихся БАС как функции физико-химических параметров межмолекулярного взаимодействия. Данная теория формирует научную основу «управления» и «предсказания» биологического отклика системы, индуцированного введением комбинаций БАС. Помимо этого разработанная модель многокомпонентной гетероассоциации может быть использована в любых физико-химических приложениях, связанных с необходимостью количественного описания сложного динамического равновесия любого числа взаимодействующих молекул.

Личный вклад соискателя. В опубликованных научных работах: [166,167] — участие в выявлении и обосновании фундаментальных предпосылок статистико-термодинамического моделирования межмолекулярной агрегации; [196-199] — разработка модели некооперативной многокомпонентной гетероассоциации; [204-206] — разработка и верификация частных случаев модели многокомпонентного равновесия ($1:n$, $1:m:n$ комплексообразование); [204-206] — постановка спектрофотометрического эксперимента титрованием; [204-206,216] — количественный анализ экспериментальных данных; [204,208,209,245] — построение обобщенной теории интерцепторно-протекторного действия и ее верификация; [239-242] — выявление влияния ошибки определения физико-химических параметров на определение фактора A_D ; [205,214,243,244] — участие в обсуждении,

анализ и интерпретация результатов; [166,167,196,197,204,205,239,243,244] — участие в написании статей.

Положения, выносимые на защиту.

1. Физическая модель комбинированного действия ДНК-связывающихся БАС в системах Препарат — Интерцептор1 — Интерцептор2 — ... — ДНК дает интерпретацию механизма биологического синергизма препаратов ДНК-направленного действия на межмолекулярном уровне.
2. Бесконечномерные модели с последовательным характером агрегации являются наиболее предпочтительным инструментом анализа механизмов интерцепторно-протекторного действия.
3. Статистико-термодинамическая модель многокомпонентной гетероассоциации Лиганд1 — Лиганд2 — ... — Лиганд N формирует математический базис анализа интерцепторно-протекторного механизмов действия комбинаций ДНК-связывающихся препаратов.
4. Обобщенная теория ИПД позволяет дать количественное описание данных биологического эксперимента *in vitro* при комбинированном действии ДНК-связывающихся препаратов.

Апробация работы. Основные результаты исследований, вошедших в диссертационную работу, были представлены и обсуждены на: международных научно-технических конференциях «Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии» (Севастополь, Украина) в 2009 и 2011 гг.; конференции молодых ученых «Современные проблемы теоретической физики» (Киев, Украина) в 2010 г.; V съезде Украинского биофизического общества (Луцк, Украина) в 2011 г.; международных научных конференциях молодых ученых «Ломоносовские чтения» (Севастополь, Украина) в 2011 и 2012 гг.; Харьковской конференции молодых ученых «Радиофизика, Электроника, Фотоника и Биофизика» (Харьков, Украина) в 2011 и 2012 гг.; международной научно-методической конференции «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, Россия) в 2013 г.; международной конференции молодых ученых «Ломоносов-2014» (Москва, Россия) в 2014 г. Те-

зисы перечисленных докладов опубликованы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 20 работ, в том числе 10 статей в научных журналах и 10 тезисов докладов на международных конференциях.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех разделов и заключения. Полный объем диссертации состоит из 166 страниц, из них список использованных литературных источников — 249 ссылок — занимает 15 страниц. Диссертация содержит 9 таблиц и 19 рисунков, в том числе один рисунок на отдельном листе.

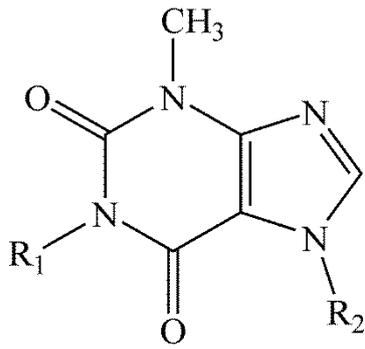
РАЗДЕЛ 1

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ИХ КОМБИНИРОВАННОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ

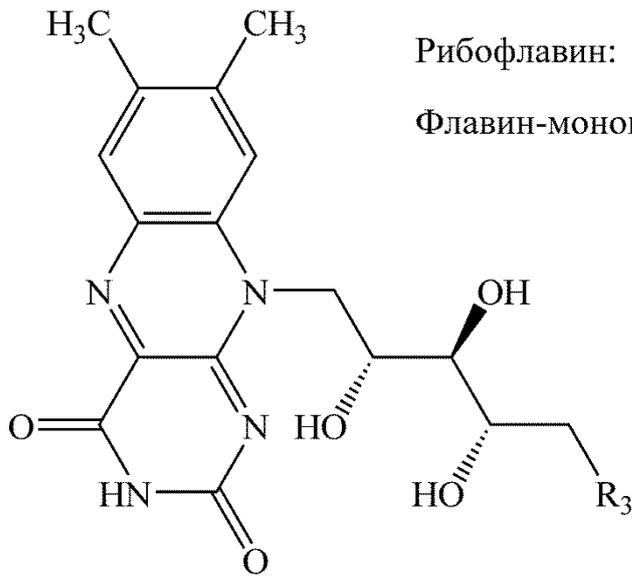
Известно, что биологически активные ароматические соединения (БАС) способны определенным образом взаимодействовать как с другими ароматическими молекулами, так и с биополимерами, в частности, с ДНК [1,2]. Такое взаимодействие наблюдается как на *in vitro*, так и на *in vivo* уровне и предположительно может модулировать медико-биологический эффект лекарственных препаратов при их комбинированном использовании, в частности, при химиотерапии раковых заболеваний [3]. Существуют основания полагать, что механизмы такого синергизма могут быть обусловлены межмолекулярным взаимодействием препаратов друг с другом. В данном разделе кратко проследим эволюцию современных представлений о молекулярных механизмах модуляции медико-биологического эффекта ДНК-связывающихся соединений и теоретические подходы к количественному описанию процессов, происходящих на уровне нуклеиновых кислот в присутствии комбинации ароматических соединений.

1.1. Медико-биологические эффекты, наблюдаемые при совместном использовании ароматических соединений

Наиболее подробно описанными в литературе ароматическими соединениями, осуществляющими регуляцию медико-биологической активности ДНК-связывающихся ароматических БАС (антибиотики, мутагены, канцерогены и т.д.), являются производные ксантина, витамин В₂ (рибофлавин) и хлорофиллин (рисунок 1.1) [1,2].



Кофеин: $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{CH}_3$
 Теобромин: $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{CH}_3$
 Теофиллин: $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$
 Пентоксифиллин: $R_1 = (\text{CH}_2)_4\text{COCH}_3$ $R_2 = \text{CH}_3$



Рибофлавин: $R_3 = \text{OH}$
 Флавин-мононуклеотид: $R_3 = \text{H}_2\text{PO}_4$

Хлорофиллин

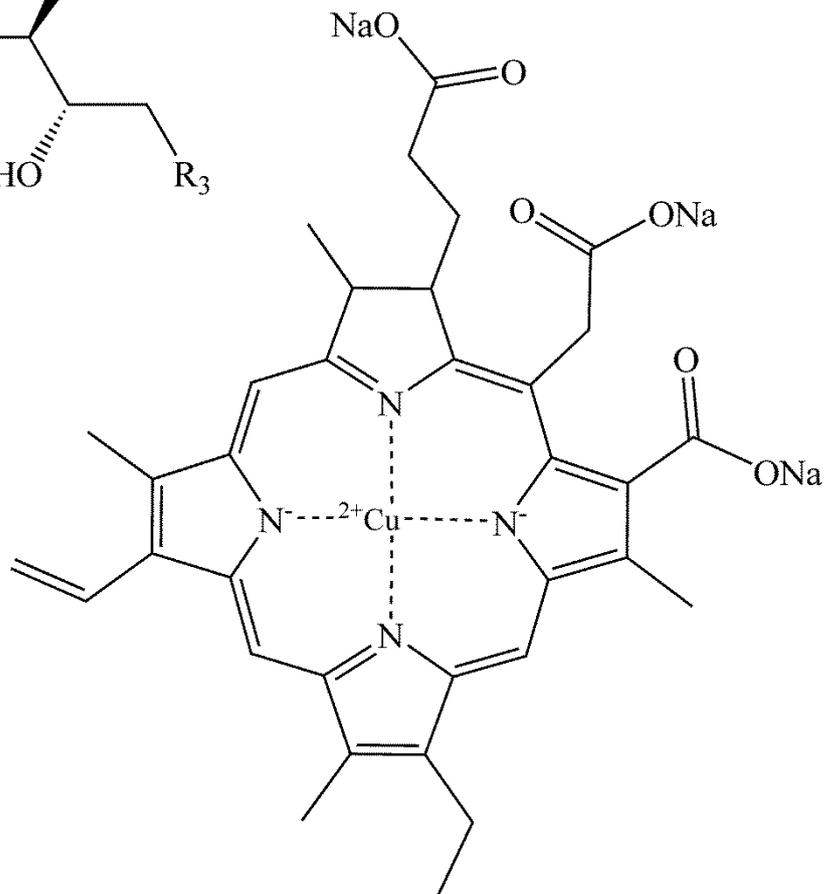


Рисунок 1.1. Химические структуры производных ксантина, рибофлавина и хлорофиллина

1.1.1. Влияние производных ксантина

Производные ксантина являются важными представителями класса биологически активных ароматических соединений, присутствующие в больших концентрациях в продуктах растительного происхождения и различающиеся по химической структуре лишь числом и положением функциональных групп у ксантинового хромофора (рисунок 1.1).

Кофеин (CAF) является одним из наиболее широко употребляемых ксантиновых производных, проявляющий свойства психомоторного стимулятора [4]. Большое ежедневное потребление и обилие кофеина в пищевых продуктах стимулировало изучение вопросов влияния его (и вообще производных ксантинов) на сердечно-сосудистую систему организма и на раковые опухоли [5,6]. Многочисленные исследования, проведенные к настоящему времени, показывают, что кофеин оказывает влияние на работу многих клеточных систем, в частности, на те из них, которые отвечают за биосинтез ДНК [7].

В рамках настоящей работы интерес представляют медико-биологические эффекты кофеина (и других производных ксантинов), вводимого в биологическую систему одновременно либо последовательно с различными ароматическими БАС.

В работах [8-10] показано увеличение противоопухолевой активности антибиотика адриамицина (доксорубицин, DOX), введенного в организм в комбинации с кофеином. В частности, обнаружено уменьшение биосинтеза ДНК и белков примерно в 2 раза и примерно двукратное понижение активности α - и β -ДНК-полимераз по сравнению с введением чистого DOX [8]. Также добавление кофеина усиливает денатурацию ДНК *in vitro*, вызванную антибиотиком флеомицином [11-12]. Кофеин и другие метилксантины проявляют синергетический эффект по отношению к антибиотикам хинолоновой серии, увеличивая продолжительность их действия и усиливая токсические эффекты [13,14]. В работе [15] показано усиление цитотоксического эффекта антибиотиков актиномицина D, эллиптицина и гикантона в присутствии кофеина.

В целом, можно сделать вывод о том, что процитированные выше исследования указывают на положительный синергетический эффект кофеина в комбинации с различными ароматическими БАС, т.е. усиление их действия в присутствии кофеина.

С другой стороны, существует ряд свидетельств того, что кофеин (метилксантины) понижает цитостатический или цитотоксический эффекты, вызываемые ароматическими БАС. Например, в работах [16,17] показано снижение цитостатического эффекта производных акридина в присутствии ксантиновых производных (кофеин, пентоксифиллин). Авторы работы [18] показали, что мутагенная активность нейротоксинов 1-метил-4-фенил-2,3-дигидропиридина и 1-метил-4-фенилпиридина эффективно подавляется кофеином. В работе [19] показано уменьшение канцерогенной активности неокарциностатина *in vitro* вследствие введения в систему кофеина. Уменьшение токсичности фенотиазиновых производных и снижение их гемолитической активности в присутствии кофеина было выявлено авторами работы [20]. Авторы работ [15,21-23] пришли к выводу о том, что цитотоксическая активность доксорубицина заметно снижается при добавлении в биологическую систему кофеина. Аналогичные эксперименты показали, что кофеин уменьшает действие и других противоопухолевых ароматических антибиотиков [22,24,25].

Данные экспериментов по модуляции медико-биологического эффекта ароматических БАС в присутствии кофеина, как видно из проведенного обзора, являются довольно разнообразными, что затрудняет их интерпретацию с единых позиций [26].

1.1.2. Влияние рибофлавина и флавин-моноклеотида

В настоящее время рибофлавин (витамин В₂, RBF, рисунок 1.1) и его водорастворимый аналог флавин-моноклеотид (FMN, рисунок 1.1) широко применяются в комбинированной химиотерапии раковых заболеваний для снижения побочного действия некоторых противоопухолевых препаратов. Так, например,

токсичность DOX снижается в присутствии рибофлавина [27], причем ослабления клинической эффективности препарата не происходит. В работе [28] на основании исследования влияния рибофлавина на гепатоканцерогенную активность афлатоксина В₁ и N-нитрозодиметиламина был сделан вывод о том, что применение рибофлавина вызывает обратимость повреждений ДНК. Уменьшение мутагенной активности гетероциклических аминов наблюдалось в работе [29] при их применении совместно с рибофлавином и его производными. В работе [30] авторы, исследовавшие способность витаминов подавлять мутагенную активность афлатоксина В₁, обнаружили, что рибофлавин обладает исключительной антиканцерогенной активностью.

В работе [31] было показано, что при добавлении рибофлавина заметно усиливается действие стандартных антималярийных препаратов. В результате исследования действия рибофлавина при его совместном потреблении с канцерогенным бензопиреном подопытными крысами было обнаружено значительное уменьшение связывания с ДНК практически во всех тканях, особенно в органах метаболической активности препарата [32].

Наконец, в работе [33] было исследовано снижение цитотоксического действия антибиотика топотекана в присутствии рибофлавина в популяции лейкемических клеток человека HL-60.

В целом анализ литературных данных по взаимодействию ароматического витамина В₂ и его производных с биологически активными соединениями показывает, что совместное применение этих препаратов приводит к изменению медико-биологического действия БАС, в частности, наблюдается уменьшение активности противоопухолевых антибиотиков.

1.1.3. Влияние хлорофиллина

Хлорофиллин (СНЛ; рисунок 1.1) является медно-натриевой водорастворимой солью пигмента растительного происхождения хлорофилла. Так же как кофеин и рибофлавин, хлорофиллин может попадать в живой организм вместе с

пищей. Известна способность хлорофиллина эффективно подавлять мутагенную активность потенциальных канцерогенов [34]. Хлорофиллин подавляет активность сильнейшего смертельно опасного гепатоканцерогена афлатоксина В₁ [35-39]. В работах [40-44] авторы исследовали подавление канцерогенной активности бензопирена и его производных при добавлении в исследуемую систему хлорофиллина. Несколько работ посвящено исследованию ингибирования мутагенной активности гетероциклических ароматических аминов (ГЦА) [45-49]. В работе [50] показано подавление мутагенной активности акридинового производного ICR191. Авторы работ [51,52] провели эксперименты на клеточной культуре V79, которые продемонстрировали подавляющее влияние хлорофиллина на мутагенную активность антибиотика митомицина.

Приведенные экспериментальные данные свидетельствуют о синергетическом действии ксантиновых производных, рибофлавина и хлорофиллина при их введении в биологическую систему совместно с ароматическими БАС *in vivo* и *in vitro*. Комбинации рибофлавина и хлорофиллина, с одной стороны, и БАС, с другой, приводят к уменьшению цитостатического или цитотоксического действия последних. Кофеин в комбинации с БАС может проявлять как аналогичные, так и противоположные эффекты. Как будет показано ниже, данные этих экспериментов указывают на то, что основными механизмами, ответственными за наблюдаемый синергизм, во многих случаях являются межмолекулярные взаимодействия, главным образом, БАС между собой и с клеточной ДНК.

1.2. Развитие представлений об интерцепторном механизме действия

В работе [26] было предложено объяснение достаточно противоречивому действию кофеина, вводимому совместно с ароматическими БАС в биологическую систему и приводящему как к усилению, так и к ослаблению их цитостатического действия. Когда структура ДНК уже нарушена (например, вследствие присутствия молекул БАС), метилксантины дополнительно подавляют репарацию

или биосинтез ДНК [53,54], косвенно способствуя увеличению цитотоксического действия основного препарата. Механизм такого действия метилксантинов на сегодняшний день до конца не выяснен и лежит за рамками исследования настоящей работы. Однако если метилксантины вводятся совместно с препаратом, то наблюдаемое снижение цитотоксической активности последнего объясняется процессами нековалентного комплексообразования (гетероассоциации) молекул кофеина и ароматических БАС [55,56]. Авторы работы [20] также указывают на то, что наибольший вклад в наблюдаемый отклик биологической системы дает процесс гетероассоциации кофеина и фенотиазиновых производных. Данный механизм получил название интерцепторного механизма действия [1,2].

С целью подтверждения способности производных ксантина к образованию гетерокомплексов с другими ароматическими БАС в работах [16-18,22,57-67] спектроскопическими методами были проведены соответствующие физико-химические эксперименты титрованием в двухкомпонентных системах Метилксантин — БАС. Методом ^1H ЯМР-спектроскопии было исследовано взаимодействие классических ароматических антибиотиков и мутагенов с кофеином [68-76], теофиллином [77,78] и диметилксантинами [79]. Результатом всех этих экспериментов явился набор равновесных констант, а также других термодинамических параметров гетероассоциации ксантинов и БАС.

Существует ряд экспериментальных доказательств наличия у рибофлавина способности к образованию комплексов с другими ароматическими молекулами. В работах [80-84] авторы исследовали взаимодействие серии структурно подобранных β -карболинов и индолов с рибофлавином и флавин-монопнуклеотидом. Было обнаружено формирование 1:1 молекулярных комплексов; выявлено образование более стабильного гетерокомплекса исследуемых молекул с FMN, по сравнению с RBF, также были рассчитаны константы комплексообразования и термодинамические параметры связывания. В работе [85] авторы, исследовавшие обусловленную присутствием рибофлавина фотодеградацию доксорубина, обнаружили, что максимальная скорость его фотолитической деградации достигается только после того как большинство молекул DOX образуют бимолекулярные

комплексы с рибофлавином, с последующим окислением доксорубицина и разложением антрахиноновой части молекулы. Авторы работы [86] исследовали ингибирование метаболизма рибофлавина при добавлении доксорубицина и предположили, что это является следствием комплексообразования витамина и антибиотика. Авторы работы [32] сделали вывод о том, что уменьшение связывания бензопирена с ДНК при увеличении концентрации рибофлавина обусловлено формированием комплексов между химически активными метаболитами бензопирена и производными рибофлавина. В работе [87] проведено исследование по взаимодействию производного бензопирена с рибофлавином и его производными. Было обнаружено образование межмолекулярных комплексов между ароматическими молекулами с дополнительной стабилизацией комплексов межмолекулярной водородной связью.

Для подтверждения описанных выше результатов был поставлен ряд физико-химических экспериментов, направленных на выявление взаимодействия ароматических БАС и витамина В₂. Так, в работе [88] методом ¹H ЯМР-спектроскопии было обнаружено образование 1:1 комплексов доксорубицина и флавин-моноклеотида. Данные, подтверждающие образование гетерокомплексов ароматических молекул, влияющих на растворимость витамина В₂, были получены авторами работы [89,90], которые исследовали межмолекулярное взаимодействие между рибофлавином и салицилатом натрия в водном растворе методом УФ/видимой спектроскопии. В работе [91] было исследовано комплексообразование рибофлавина с ароматическими гидроксисоединениями. Результаты проведенного в работе [33] физико-химического эксперимента свидетельствуют об интенсивном взаимодействии топотекана и рибофлавина. Это позволяет сделать предположение о том, что гетероассоциация рибофлавина и топотекана может служить одним из возможных механизмов протекторного эффекта рибофлавина, оказываемого на клеточную культуру *in vitro*. Были проведены соответственно ЯМР [92] и ИК [93] эксперименты по исследованию комплексообразования молекул бромистого этидия и профлавина соответственно с витамином В₂. В работах [69,94] было исследовано взаимодействие рибофлавина с антибиотиком дауноми-

цином. В целом, обобщенный анализ данных многочисленных экспериментов по взаимодействию витамина В₂ с ароматическими БАС дан в работе [95]. Таким образом, для рибофлавина считается доказанной его способность к образованию прочных гетерокомплексов с ароматическими БАС.

Хлорофиллин образует достаточно стабильные гетерокомплексы с другими ароматическими молекулами благодаря наличию в его структуре тетрапиррольного макроцикла. Большинство исследователей именно с этим процессом связывают антимуtagenное и антиканцерогенное действие хлорофиллина, вводимого совместно с ароматическим БАС [47,96,97]. Так, в работе [50] показано, что основным механизмом подавления активности акридинового мутагена ICR191 является его комплексообразование с хлорофиллином. Методами УФ/видимой спектроскопии исследовано взаимодействие хлорофиллина с другими потенциальными мутагенами и антибиотиками [98-100]. В работе [47] получен набор констант гетероассоциации ароматических ГЦА с хлорофиллином. Следует отметить, вообще говоря, что одним из механизмов ингибирования канцерогенной активности считаются в том числе и процессы комплексообразования с ароматическими соединениями [49].

Обобщая результаты перечисленных выше медико-биологических и физико-химических экспериментов, можно сделать вывод о том, что как минимум одним из возможных механизмов, ответственных за наблюдаемый синергизм при совместном введении ароматических БАС в биосистему, является интерцепторный механизм образования невалентных комплексов между этими молекулами, в основе которого лежит процесс гетероассоциации. В свою очередь, характерным свойством ароматических БАС является их способность к образованию таких межмолекулярных комплексов, главным образом, за счет π -стекинга ароматических хромофоров. Считается что, формирование в клетке гетерокомплексов молекул препарата (антибиотика, мутагена, канцерогена и т.д.) с другими ароматическими БАС (производные ксантина, рибофлавин, хлорофиллин) уменьшает эффективную концентрацию мономеров препарата, которые и являются непосредственными индукторами цитостатического или цитотоксического действия препа-

рата [1,2,16,22,24,50,59]. С точки зрения физико-химических взаимодействий в трехкомпонентной ДНК-содержащей системе гетероассоциация молекул основного ДНК-связывающегося ароматического соединения (препарата) с другой ароматической молекулой обуславливает перехват молекулы препарата, что приводит к невозможности ее взаимодействия с ДНК [16,17,26,47]. При этом ароматическая молекула, осуществляющая перехват препарата, называется перехватчиком, или интерцептором, а сам процесс называется интерцепторным действием молекулы перехватчика по отношению к молекуле препарата.

1.3. Развитие представлений о протекторном механизме действия

Некоторые исследователи полагают, что отмеченный выше синергизм при совместном введении ароматических БАС в биосистему является следствием наличия альтернативного гетероассоциации молекулярного механизма [1,2,22,24,72-74,78,94,101,102], который заключается в следующем. Молекула-интерцептор, имеющая в основе плоский хромофор, потенциально способна взаимодействовать с ДНК, интеркалируя между парами оснований либо связываясь с ее внешней поверхностью [1,2]. Занимая определенное место связывания, она тем самым не позволяет взаимодействовать с тем же местом связывания молекуле препарата. Такой механизм медико-биологического действия интерцептора называется протекторным действием по отношению к ДНК. Таким образом, принципиально важным для существования протекторного механизма является способность интерцептора образовывать комплексы с нуклеиновыми кислотами.

Во избежание путаницы заметим, что необходимо различать понятия «протекторный механизм» и «протекторный эффект»; последний заключается в снижении цитотоксического или мутагенного действия БАС и может быть следствием как интерцепторного, так и протекторного механизмов действия.

В работе [19] авторы исследовали подавление канцерогенной активности неокарциностатина в трехкомпонентной системе Неокарциностатин — Кофеин — ДНК. Был сделан вывод о том, что наблюдаемый протекторный эффект кофеина,

введенного в биологическую систему совместно с неокарциностатином, явился следствием его интеркаляции в ДНК. Важный вывод был получен авторами работы [103]: оказалось, что кофеин и его производные влияют на раскручивание ДНК аналогично тому, как это происходит в присутствии классических ДНК-интеркаляторов. Таким образом, кофеин также может рассматриваться в качестве ДНК-интеркалятора. В целом, на сегодняшний день экспериментально доказанным является факт взаимодействия ксантинов с нуклеиновыми кислотами на *in vitro* уровне: ДНК [69,104-106] и РНК [107], а также с олигомерами ДНК [71-73,78,108,109]. В процитированных работах получены константы взаимодействия ксантинов с ДНК. Взаимодействие кофеина и ДНК было также подтверждено методом молекулярной механики в работе [110].

Обзор литературных данных показывает, что в настоящее время не существует доступной информации о взаимодействии рибофлавина с ДНК. Однако известна способность производных рибофлавина к образованию комплексов с белками [111]. Способность рибофлавина образовывать устойчивые комплексы с апоферментами, являющимися белковой частью фермента, за счет гидрофобных или π - π взаимодействий между ароматическими кольцами — ароматической частью рибофлавина и остатком ароматических аминокислот триптофана и тирозина — была показана в работе [112]. К аналогичным выводам, относительно молекулярного механизма связывания рибофлавина с апоферментом куриного яичного белка, пришли авторы работы [113]. Было показано, что хромофор рибофлавина встраивается между параллельными плоскостями ароматических колец аминокислот тирозина и триптофана. Таким образом, можно предположить, что рибофлавин в принципе способен взаимодействовать и с ДНК по типу интеркаляционного или частично интеркаляционного связывания, и, следовательно, может являться конкурентом другим ароматическим лигандам за сайт связывания с рецепторами — ДНК и РНК в клетке. Кроме того, различными исследователями был проведен ряд физико-химических экспериментов, свидетельствующих о хотя и сравнительно малом, но не нулевом значении константы комплексообразования рибофлавина и ДНК [94,114-116].

Авторы работы [100] указывают на то, что взаимодействие хлорофиллина с ДНК либо отсутствует вовсе, либо оно слишком слабое в рамках того концентрационного диапазона, который они использовали в эксперименте титрованием. Однако в работах [117-119] было исследовано комплексообразование хлорофиллина с ДНК и получены значения равновесных констант связывания. В работе [120] показано взаимодействие хлорофиллина также и с РНК. Это дает также основание предполагать наличие у хлорофиллина протекторного механизма действия в смеси с препаратом и ДНК при условии принципиальной возможности его проникновения через клеточную мембрану.

Процитированная в данном подразделе литература указывает на то, что одним из возможных молекулярных механизмов, обуславливающих протекторный эффект ароматических интерцепторов в смеси с препаратом и ДНК, является процесс комплексообразования интерцептора с биорецептором, в частности, с ДНК, называемый протекторным механизмом действия. Следует отметить, что, вообще говоря, протекторное действие интерцептора может быть отнесено и к другим биологически важным полимерам, например, белкам.

1.4. Объединение представлений об интерцепторном и протекторном механизмах действия

Существует ряд исследований, в которых гипотезы о существовании интерцепторного и протекторного механизмов действия объединены. Другими словами, представляется, что молекулы-интерцепторы вызывают протекторный эффект в отношении клеточной ДНК посредством как интерцепторного, так и протекторного механизмов действия одновременно. Анализ, проведенный в предыдущих подразделах, показывает, что доказательств существования у ароматических БАС интерцепторного механизма действия в смеси с препаратом в клетке значительно больше, чем доказательств существования протекторного механизма. Однако это не дает никаких объективных оснований для игнорирования протекторного механизма. Поясним это на примере кофеина, данном в работе [1].

Представление о преобладании интерцепторного механизма кофеина обусловлено достаточно малым сродством его к ДНК по сравнению с таковым, например, для антибиотиков типа доксорубицина или новатрона, что делает практически невозможным конкуренцию между этими веществами за места посадки на ДНК [24,61]. Однако результаты физико-химических экспериментов показывают, что константы взаимодействия кофеина с ДНК имеют тот же порядок, что и константы гетероассоциации кофеина с типичными антибиотиками, мутагенами и т.д. [71]. Следует также отметить, что типичные концентрации кофеина, используемые в *in vitro* экспериментах как минимум на три порядка выше типичных концентраций препарата (ммоль/л и мкмоль/л соответственно [22,24]). Это значит, что низкое сродство кофеина к ДНК по сравнению со сродством препарата может быть скомпенсировано значительно большей концентрацией кофеина. Следовательно, доля комплексов Кофеин — ДНК может иметь тот же порядок, что и доля комплексов Кофеин — Препарат, и соответствующие механизмы, т.е. интерцепторный и протекторный, можно считать эквивалентными с точки зрения их эффективности.

Ранее была показана способность кофеина вытеснять из ДНК молекулы красителя акридинового оранжевого [107,121] и бромистого этидия [107] за счет процессов как гетероассоциации Кофеин — Краситель, так и комплексообразования Кофеин — ДНК. В различное время разными исследователями было обнаружено, что кофеин обуславливает диссоциацию комплексов йодистого пропидия или 7-аминоактиномицина D [122], бромистого этидия [67] с ДНК. Авторы этих работ также пришли к выводу об одновременном существовании двух указанных выше механизмов действия кофеина. В работах [71-74,78,94] были объединены представления об интерцепторном и протекторном механизмах действия и даны качественные соотношения вкладов двух механизмов в общий наблюдаемый синергизм. В частности, было показано, что в смесях мутагенов бромистого этидия и йодистого пропидия [71], антибиотиков дауномицина [71,72], норфлоксацина [73] и новатрона [101] с одной стороны и кофеина и ДНК с другой, доминирующим является протекторный механизм действия кофеина. В то же время преобла-

дающим механизмом действия кофеина в смеси с ДНК и мутагеном профлавином [71] и антибиотиком топотеканом [74] является интерцепторный механизм. В смесях антибиотиков доксорубицина и ногаламицина с кофеином и ДНК соотношение механизмов примерно одинаковое [72]. Аналогичная ситуация наблюдается и для ряда веществ (дауномицин, новатрон, бромистый этидий, профлавин) в смеси с теофиллином и ДНК, за исключением системы Норфлоксацин — Теофиллин — ДНК, в которой более выраженным является протекторный механизм действия интерцептора [78].

В работе [94] было показано, что в системе Дауномицин — Рибофлавин — ДНК интерцепторный и протекторный механизмы также дают примерно одинаковый вклад в наблюдаемый синергетический медико-биологический эффект. Гипотеза об интерцепторно-протекторном механизме действия молекул-интерцепторов в системах Препарат — Рибофлавин — ДНК и Препарат — Хлорофиллин — ДНК полностью согласуется с точкой зрения на связывание с ДНК ароматических препаратов в присутствии кофеина. Это является следствием общего свойства класса ароматических БАС образовывать комплексы друг с другом в растворе и связываться с ДНК.

Таким образом, одновременный учет интерцепторного и протекторного механизмов является вполне обоснованным и, безусловно, более полно описывает наблюдаемый протекторный эффект интерцептора в смеси с препаратом и ДНК.

1.5. Первичный этап формирования теории интерцепторно-протекторного действия (ИПД)

1.5.1. Общие принципы построения количественной теории ИПД

В ряде исследований [15,19,71-74,78,94,107] было показано, что эффективность медико-биологического действия кофеина и родственных ксантинов при их совместном введении с другими ароматическими БАС в клеточную систему зависит от концентрации интерцептора. Иногда дается более общая формулировка

этого явления: концентрация интерцептора является регулятором медико-биологической активности основного препарата [26,71-74,78,94,122]. Кроме того, в работе [47] было показано наличие корреляции между равновесными константами гетероассоциации интерцептора и препарата и наблюдаемым медико-биологическим синергетическим эффектом смеси. Эти факты указывают на существование количественной взаимосвязи между параметрами межмолекулярного взаимодействия и наблюдаемого биологического эффекта *in vitro* в системах Препарат — Интерцептор — ДНК. Это утверждение является отправной точкой для создания количественной теории интерцепторно-протекторного действия (ИПД) ДНК-связывающихся ароматических БАС.

Конечной целью количественной теории ИПД является попытка предсказания медико-биологического эффекта от совместного введения в клетку ароматических БАС. Поскольку интерцепторно-протекторный механизм является молекулярным процессом, то и количественные характеристики этого процесса могут быть выражены в терминах физико-химических параметров межмолекулярного взаимодействия, т.е. равновесных констант комплексообразования и равновесных концентраций веществ. Следовательно, количественная теория ИПД должна опираться на два фундаментальных закона равновесной термодинамики: закон сохранения массы и закон действующих масс. Для характеристики медико-биологического эффекта интерцептора в смеси Препарат — ДНК используют соотношения мольных долей комплексов основного препарата и ДНК при различных условиях (присутствие/отсутствие интерцептора и т.д.) [1,72-74,78,94,102]. Очевидно, эти мольные доли могут быть найдены путем решения уравнений закона сохранения массы в исследуемой системе. Рассмотрим известные на сегодняшний день теории ИПД, отличающиеся друг от друга главным образом видом базовой системы уравнений динамического равновесия в трехкомпонентной смеси Препарат — Интерцептор — ДНК.

1.5.2. Редуцированные теории ИПД

В целом развитие теорий ИПД происходило в соответствии с эволюцией представлений о механизмах медико-биологического синергизма в системах Препарат — Интерцептор — ДНК (см. подраздел 1.4). В настоящее время некоторыми исследователями используются редуцированные теории ИПД, которые предполагают, что наблюдаемый синергизм при совместном введении ароматических БАС является следствием какого-то одного процесса, интерцепторного либо протекторного. Так в работе [123] была построена теория протекторного действия в трехкомпонентной системе двух конкурентно связывающихся лигандов и белка. Предложенная модель математическая равновесия, однако, не учитывала процесс гетероассоциации между лигандами (интерцепторный механизм). В серии работ [50,58-61,63,100], напротив, отсутствует учет протекторного механизма действия интерцептора (кофеин, хлорофиллин). При этом образование гетерокомплексов Интерцептор — Препарат, как правило, ограничено случаем, когда Препарат не образует самоассоциатов, а Интерцептор свободно самоассоциирует без каких-либо ограничений [57,61,63], а взаимодействие препарата с ДНК моделируется хорошо известным подходом МакГи — фон Хиппеля [124].

В работах [125-127] авторами была предложена модель конкурентного связывания в системе Антибиотик — Интерцептор — ДНК, особенностью которой является учет бимодального связывания антибиотика с полимерной ДНК (интеркаляция и связывание с внешней поверхностью ДНК). При записи закона сохранения массы в этих работах были реализованы подход Скэтчарда [128], являющийся самым простым для описания взаимодействия лигандов с полимерной ДНК и исторически одним из первых, и подход МакГи — фон Хиппеля. Однако в этой модели отсутствует учет само- и гетероассоциатов ароматических БАС.

Следует отметить, что в перечисленных работах не дана оценка величины изменения медико-биологической активности ароматических БАС. Качественные выводы о преобладании активности того или иного БАС делаются на основании соотношения равновесных констант комплексообразования.

Первый количественный анализ системы Препарат (X) — Кофеин (Y) — ДНК (N) с разделением вкладов интерцепторного и протекторного механизмов был сделан в работах [71-73,78,94,101,129-131]. В качестве модели ДНК использовался тетра nukлеотид d(TpGpCpA)₂. Закон сохранения массы задавался системой уравнений

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{x_1}{(1-K_X x_1)^2} \left(1 + \frac{K_h y_1}{1-K_Y y_1} + \frac{K_h^2 y_1^2}{2(1-K_Y y_1)^2} + \frac{K_h^2 x_1 y_1}{(1-K_X x_1)(1-K_Y y_1)} \right) + \\ + x_1 N_1 (K_{1X} + K_{2X} K_N N_1) = x_0 \\ \frac{y_1}{(1-K_Y y_1)^2} \left(1 + \frac{K_h x_1}{1-K_X x_1} + \frac{K_h^2 x_1^2}{2(1-K_X x_1)^2} + \frac{K_h^2 x_1 y_1}{(1-K_X x_1)(1-K_Y y_1)} \right) + \\ + y_1 N_1 (K_{1Y} + K_{2Y} K_N N_1) = y_0 \\ 2K_N N_1^2 (1 + K_{2X} x_1 + K_{2Y} y_1) + N_1 (1 + K_{1X} x_1 + K_{1Y} y_1) = N_0 \end{array} \right. \quad (1.1)$$

где x_1 , y_1 — мономерные концентрации препарата и интерцептора соответственно, N_1 — концентрация однонитчатой формы тетра nukлеотида ДНК, x_0 , y_0 , N_0 — общие концентрации препарата, интерцептора и олигомера ДНК соответственно, K_X , K_Y , K_h — равновесные константы самоассоциации препарата и интерцептора и константа их гетероассоциации соответственно, K_N — равновесная константа ассоциации двух нитей тетра nukлеотида ДНК, K_{1X} (K_{1Y}), K_{2X} (K_{2Y}) — равновесные константы связывания препарата (интерцептора) с однонитчатой формой и дуплексом ДНК соответственно. В этой системе уравнений учитывается бесконечномерная само- и гетероассоциация веществ X и Y, однако число возможных типов гетерокомплексов ограничено набором $X_i Y_j$, $X_i Y_j X_k$ и $Y_i X_j Y_k$.

Наиболее простым способом разделения вкладов интерцепторного и протекторного процессов, предложенным в процитированных работах, является подсчет доли молекул препарата в гетерокомплексах (f_h) и в комплексах с ДНК (f_{C2}), и затем их сравнение. Однако, как f_h , так и f_{C2} получаются из решения системы уравнений (1.1) относительно концентраций x_1 , y_1 и N_1 :

$$\begin{cases} f_h = \frac{x_1}{(1 - K_X x_1)^2} \left(1 + \frac{K_h y_1}{1 - K_Y y_1} + \frac{K_h^2 y_1^2}{2(1 - K_Y y_1)^2} + \frac{K_h^2 x_1 y_1}{(1 - K_X x_1)(1 - K_Y y_1)} \right) \frac{1}{x_0} \\ f_{C2} = x_1 N_1 (K_{1X} + K_{2X} K_N N_1) \frac{1}{x_0} \end{cases} \quad (1.2)$$

и, таким образом, являются зависимыми как от процесса комплексообразования Y-ДНК, так и от процесса гетероассоциации X-Y. Это означает, что величины f_h и f_{C2} являются взаимозависимыми, и действительное разделение двух процессов при таком подходе не представляется возможным и может привести к ошибочным результатам. Искомый критерий должен оперировать с f_h и f_{C2} в их «чистой» форме, не содержащей вклада от другого процесса. Вместе с тем, необходимо отметить, что важнейшим результатом этой теории ИПД стал вывод о том, что соотношение эффективности механизмов определяется величинами равновесных констант гетероассоциации и комплексообразования с ДНК.

В целом, проведенный краткий обзор ранних теорий ИПД показывает, что они обладают рядом существенных недостатков, не позволяющих полноценно применять их для исследования подавляющего большинства систем Препарат — Интерцептор — ДНК:

1) законы сохранения массы, как правило, не полностью учитывают распределение лигандов в растворе в составе само- и гетероассоциатов, в ряде случаев ограничиваются присутствием лишь мономеров ароматических молекул, участвующих в комплексообразовании, либо ограниченным числом типов гетерокомплексов;

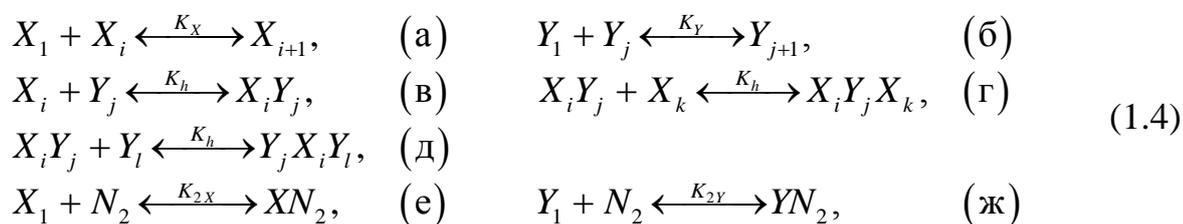
2) во всех без исключения процитированных работах отсутствует связь с биологическим экспериментом, не позволяющая количественно оценить отклик системы на добавление интерцептора;

3) в наиболее хорошо разработанной теории ИПД, учитывающей одновременный вклад обоих механизмов, использовалась физиологически неадекватная модель ДНК — тетрамер $d(\text{TpGpCpA})_2$ в одонитчатой и дуплексной формах.

1.5.3. Олигомерная теория ИПД

На сегодняшний день наиболее полной и законченной теорией ИПД для олигомерных последовательностей ДНК является теория, развитая в работах [1,74,78,102,132-134]. Моделью биорецептора здесь является смесь тетрамерных последовательностей ДНК $d(\text{TrGpCpA})_2$ (в отличие от рассмотренной выше теории ИПД, в которой сам тетрамер являлся моделью ДНК). Такой выбор обусловлен, во-первых, тем, что эта последовательность содержит центральный GC сайт, с которым связываются большинство ДНК-интеркаляторов, а во-вторых, поскольку анализ проводился на основании данных ЯМР о комплексообразовании молекул интерцептора и препарата, именно для такого дезокситетрануклеотида регистрация протонного химического сдвига производится, как правило, в условиях быстрого молекулярного обмена в масштабе времени ЯМР, что является принципиально важным для получения надежных значений равновесных параметров комплексообразования.

Количественный анализ трехкомпонентного равновесия двух ароматических лигандов X и Y и тетрамера ДНК N_2 в водном растворе в олигомерной теории ИПД учитывает все возможные виды взаимодействий, а именно, самоассоциацию X и Y (1.4;а,б), их гетероассоциацию X - Y (1.4;в,г,д) и комплексообразование с дуплексом TGCA X - N_2 и Y - N_2 (1.4;е,ж):



Представленная схема динамического равновесия в растворе описывается законом сохранения массы и законом действующих масс, причем каждая реакция в схеме (1.4) добавляет свое слагаемое в уравнение для закона сохранения массы по аналогии с моделью молекулярной гетероассоциации [71,108,135]. В результате система уравнений для каждого из взаимодействующих веществ в растворе (X , Y , N_2) принимает вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{x_1}{(1 - K_X x_1)^2} \left(1 + \frac{K_h y_1}{1 - K_Y y_1} + \frac{K_h^2 y_1^2}{2(1 - K_Y y_1)^2} \right) + K_{2X} x_1 N_2 = x_0 \\ \frac{y_1}{(1 - K_Y y_1)^2} \left(1 + \frac{K_h x_1}{1 - K_X x_1} + \frac{K_h^2 x_1 y_1}{(1 - K_X x_1)(1 - K_Y y_1)} \right) + K_{2Y} y_1 N_2 = y_0, \\ N_2 (1 + K_{2X} x_1 + K_{2Y} y_1) = N_0 \end{array} \right. \quad (1.5)$$

Каждое слагаемое в (1.5) соответствует своему типу комплекса в растворе и, следовательно, позволяет рассчитать мольную долю f данного комплекса путем деления на x_0 , y_0 или N_0 . Под концентрацией ДНК N_0 понимается суммарная концентрация свободных от белков участков ядерной ДНК в клетке, выраженная в тетрамерных единицах. Отметим также, что гетероассоциация в системе (1.5) учитывается так же, как и в редуцированных теориях, т.е. с ограничением числа типов комплексов.

Для оценки соотношения вкладов протекторного и интерцепторного эффектов лиганда-интерцептора Y по отношению к лиганду X в системе Препарат — Интерцептор — ДНК используется критерий R_D [72,73,102,108], рассчитываемый по следующей формуле:

$$R_D = \frac{f_{C2(0)}^X - f_{C2(C)}^X}{f_{C2(0)}^X - f_{C2(H)}^X}, \quad (1.6)$$

где $f_{C2(0)}^X$ — мольная доля комплексов Препарат — ДНК при «отключенной» гетероассоциации Препарат — Интерцептор и «включенном» комплексообразовании Интерцептор — ДНК ($K_h = 0$, $K_{2Y} \neq 0$); $f_{C2(H)}^X$ — мольная доля комплексов Препарат — ДНК при «включенной» гетероассоциации Препарат — Интерцептор и «отключенном» комплексообразовании Интерцептор — ДНК ($K_h \neq 0$, $K_{2Y} = 0$); $f_{C2(0)}^X$ — мольная доля комплексов Препарат — ДНК при «отключенных» гетероассоциации Препарат — Интерцептор и комплексообразовании Интерцептор — ДНК ($K_h = 0$, $K_{2Y} = 0$). Значение $R_D > 1$ соответствует преобладанию комплексообразования Интерцептора и ДНК над гетероассоциацией Интерцептора и Препарата.

рата (т.е. протекторное действие Интерцептора); значение $R_D < 1$ отвечает доминированию гетероассоциации в растворе в суммарном эффекте вытеснения молекул Препарата из ДНК (интерцепторное действие Интерцептора). Таким образом, фактор R_D представляет собой численный критерий оценки доминирующего молекулярного процесса в растворе.

Оценка доли вытесненного из ДНК молекул Препарата при добавлении Интерцептора производится с помощью фактора A_D [73,102] как

$$A_D = \frac{f_{C2(0)}^X - f_{C2}^X}{f_{C2(0)}^X}, \quad (1.7)$$

где f_{C2}^X обозначает мольную долю молекул Препарата, связанных с ДНК в присутствии молекул Интерцептора при «включенных» гетероассоциации и комплексообразовании ($K_h \neq 0, K_{2Y} \neq 0$). В связи с тем, что биологическое действие большинства противоопухолевых препаратов преимущественно связано с комплексообразованием с ядерной ДНК, считается, что фактор A_D может служить количественной мерой оценки изменения биологической активности Препарата при добавлении Интерцептора в клеточной системе.

Как указывалось выше, рядом исследователей была отмечена зависимость наблюдаемого медико-биологического эффекта при добавлении интерцептора в клеточную систему от концентрации самого интерцептора y_0 . Следовательно, интерес представляет именно анализ зависимостей факторов R_D и A_D от y_0 . Для фактора R_D была получена эмпирическая формула при $y_0 \rightarrow 0$ [102]:

$$R_D \approx \frac{K_{2Y}}{K_h}, \quad (1.8)$$

по которой можно оценить, какой механизм является преобладающим для той или иной комбинации Препарат — Интерцептор, зная лишь равновесные константы K_{2Y} и K_h . Аналогичное выражение было получено для фактора A_D :

$$A_D \equiv \frac{K_h^2}{K_{2X}}, \quad (1.9)$$

согласно которому различные ароматические Препараты можно выстроить в ряд в порядке убывания их чувствительности к добавлению Интерцептора. Соотношение (1.9) может быть использовано для предсказания относительного изменения биологического эффекта базового Препарата при добавлении ароматического соединения-интерцептора по известным значениям равновесных констант гетероассоциации K_h и комплексообразования K_{2X} . Необходимо также подчеркнуть, что уравнение (1.9) фактически указывает способ направленной регуляции биологической активности в системе Препарат — Интерцептор — ДНК посредством варьирования равновесных констант гетероассоциации и комплексообразования лигандов с ДНК для одного и того же интерцептора.

Сложность анализа трехкомпонентной смеси Препарат — Интерцептор — ДНК состоит в необходимости подбора концентраций взаимодействующих компонент в водном растворе для соответствия физиологическим условиям. Процедура такого подбора, называемая параметризацией уравнений теории ИПД, была впервые реализована в работах [1,72-74,78,94,102] в рамках олигомерной теории.

Применительно к ароматическим противоопухолевым антибиотикам антрациклиновой серии (дауномицин, доксорубицин), известно, что типичные пиковые концентрации препарата в плазме крови человека после введения стандартной дозы достигают порядка 10 мкмоль/л [136,137]. В то же время известен эффект аккумуляции клеткой антрациклинов, приводящий к 100-кратному превышению внутриклеточной концентрации антибиотика пиковой концентрации в плазме [138,139]. На основании этого было предложено, что значение $x_0 = 10$ мкмоль/л может служить оценкой физиологической внутриклеточной концентрации антибиотика. Согласно работе [22] в клеточных экспериментах при микромолярных концентрациях ароматического препарата и миллимолярных концентрациях кофеина эффект детоксификации клеток в процентном эквиваленте имеет порядок 50%, что соответствует расчетной величине фактора A_D при миллимолярной концентрации кофеина и $N_0 = 10$ мкмоль/л. Это позволило предположить, что данное значение концентрации

тетрамерных участков ядерной ДНК, по-видимому, является наиболее физиологически адекватным. Следовательно, анализ равновесия Препарат — Интерцептор — ДНК целесообразно проводить при $N_0 = 10$ мкмоль/л. Учитывая все вышесказанное, а также то, что типичный диапазон концентраций Интерцептора на несколько порядков превышает диапазон концентраций Препарата, в работах [1,74,102] были сформулированы так называемые квазифизиологические условия для системы Препарат — Интерцептор — ДНК: $x_0 = N_0 = 10$ мкмоль/л и $y_0 \gg x_0$, $y_0 \gg N_0$. Эти условия позволили впервые в рамках олигомерной теории ИПД установить взаимосвязь между параметрами межмолекулярного взаимодействия, измеряемыми в отдельных физико-химических экспериментах (K_X , K_Y , K_h , K_{2X} , K_{2Y}), и экспериментальным изменением доли клеток, подвергнувшихся апоптозу, в системах Доксорубин — Кофеин [102], Новатрон — Кофеин [72,102] и Топотекан — Кофеин [74], что явилось несомненным успехом теории ИПД.

Отметим, что все сформулированные выше допущения теории ИПД справедливы только в том случае, когда основной биологический эффект ароматических БАС проявляется через комплексообразование с ДНК, а также при условии существования равновесия в трехкомпонентной ДНК-содержащей системе. Единственной работой, описывающей теорию ИПД для четырехкомпонентной системы Препарат1 — Препарат2 — Интерцептор — ДНК, является работа [74]. Здесь исследовано формально трехкомпонентная система Топотекан — Кофеин — ДНК, но из-за специфических свойств молекулы антибиотика топотекана в водном растворе (присутствие одновременно в двух структурно различных состояниях) она фактически является четырехкомпонентной.

В настоящее время олигомерная теория ИПД является единственной теорией, позволяющей описать изменение биологического эффекта *in vitro* при совместном введении ДНК-связывающихся и ароматических интерцепторов на основании знания параметров межмолекулярного взаимодействия в смеси Препарат — Интерцептор — ДНК. Как указывалось выше, это открывает

перспективу направленной регуляции медико-биологической активности базового препарата путем подбора интерцептора нужного типа и изменения его концентрации. При этом на этапе предварительного скрининга различных комбинаций БАС исследователь имеет возможность отказаться от проведения достаточно затратных во всех отношениях биологических экспериментов *in vivo* в пользу более простых и дешевых физико-химических экспериментов.

Вместе с тем, базовым недостатком рассмотренной олигомерной теории ИПД является использование физиологически неадекватной модели ДНК в виде смеси тетрамерных последовательностей. Введение в рассмотрение полимерной ДНК производится в некоторых редуцированных теориях ИПД [57,59,61], однако, как указывалось выше, эти теории не учитывают протекторный механизм и не дают связи с наблюдаемым биологическим эффектом.

Таким образом, проведенный анализ литературных источников показывает, что существует целый класс межмолекулярных взаимодействий, модулирующих измеряемый в эксперименте биологический эффект при одновременном введении в биосистему молекулы ДНК-связывающегося препарата и интерцептора. Результаты исследований различных исследовательских групп показывают, что в основе наблюдаемых синергетических эффектов в системах Препарат — Интерцептор — ДНК лежат два молекулярных процесса — гетероассоциация Препарат — Интерцептор (интерцепторный механизм) и конкурентное комплексообразование Препарат— ДНК и Интерцептор — ДНК (протекторный механизм). Существующие в настоящее время теории интерцепторно-протекторного действия позволяют установить взаимосвязь между измеряемым *in vitro* биологическим эффектом и параметрами комплексообразования биомолекул, однако учет как интерцепторного, так и протекторного механизмов в этих теориях не является строгим и содержит элементы эмпиризма. В связи с этим основной задачей настоящей работы будет развитие теории ИПД с использованием строго статистико-термодинамического подхода к описанию систем Препарат — Интерцептор — ДНК.

РАЗДЕЛ 2

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА И АНАЛИЗА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Данный раздел посвящен краткому обзору методов проведения спектрофотометрического эксперимента титрованием и анализу регистрируемых данных с помощью статистико-термодинамических моделей равновесного комплексообразования БАС. Выбор спектрофотометрии в качестве экспериментального метода для диссертационного исследования обусловлен рядом причин. Это достаточно высокочувствительный метод, позволяющий работать с малым количеством вещества, типичные концентрации которого находятся в диапазоне от единиц до сотен мкмоль/л. Такие концентрации соответствуют физиологическому диапазону концентраций ДНК-связывающихся лигандов, которые будут исследованы в данной работе. Метод спектрофотометрии также дает возможность получения результатов, характеризующихся высокой воспроизводимостью. Немаловажным является и то, что спектрофотометрический метод является достаточно дешевым и повсеместно доступным.

Для анализа получаемых в эксперименте данных широко используется математическое моделирование динамического равновесия в исследуемой системе. Методы статистической термодинамики позволяют находить все количественные характеристики, необходимые для анализа равновесного комплексообразования в растворе. В последнем подразделе кратко рассматриваются основные принципы двух наиболее часто используемых методов статистической термодинамики, которые потребуются для построения обобщенной теории интерцепторно-протекторного действия в разделах 3 и 4.

2.1. Физические основы спектрофотометрии

2.1.1. Общие характеристики молекулярной спектроскопии

Для исследования свойств биологически активных ароматических соединений широко используются различные экспериментальные методы, в том числе абсорбционная спектроскопия в ближней ультрафиолетовой (200...350 нм) и видимой (350...800 нм) части оптического спектра, или спектрофотометрия. Применение спектрофотометрии основано на спектрально-избирательном поглощении электромагнитного излучения соединениями, содержащими хромофорные (например, $C=C$, $C=O$) и ауксохромные (например, OCN_3 , OH , NH_2 и др.) группы, являющиеся типичными для ароматических БАС.

По спектрам поглощения проводят качественный и количественный анализ веществ. Абсорбционная спектроскопия широко применяется для изучения строения вещества. Она особенно эффективна при исследовании процессов в жидких средах; по изменениям положения, интенсивности и формы полос поглощения судят об изменениях состава и строения поглощающих свет частиц без их выделения из растворов.

Основной количественной характеристикой, получаемой спектрофотометрическим методом, является зависимость интенсивности поглощения света от длины волны. Интенсивность полосы поглощения молекулы определяется вероятностью соответствующего электронного перехода. Для характеристики интенсивности полосы служит молярный коэффициент поглощения ε (коэффициент экстинкции), определяемый согласно закону Бугера — Ламберта — Бера как $\varepsilon = A/cl$, где $A = -\lg T = -\lg I/I_0$, T — пропускание, I_0 и I — интенсивности соответственно падающего и прошедшего через вещество излучения, c — молярная концентрация вещества, поглощающего излучение, l — толщина поглощающего слоя (кюветы), измеряемая в сантиметрах. Закон Бугера — Ламберта — Бера лежит в основе количественного анализа спектров поглощения.

2.1.2. Устройство спектрофотометра

Для измерения спектров используют спектральные приборы — спектрофотометры, основными частями которого являются источник излучения, диспергирующий элемент для выделения определенной длины волны, кюветное отделение с исследуемым образцом, регистрирующее устройство. В качестве источников излучения применяют дейтериевую (или водородную) лампу (в УФ области) и вольфрамовую лампу накаливания или галогенную лампу (в видимой и ближней ИК областях). Приемниками излучения служат фотоэлектронные умножители и фотоэлементы (фоторезисторы на основе сульфида свинца). Диспергирующими элементами прибора являются призмный монохроматор или монохроматор с дифракционными решетками. Графически спектр регистрируют в координатах: длина волны (нм) или волновое число (см^{-1}) — пропускание (%) или оптическая плотность.

Современные спектрофотометры производятся по двулучевым схемам, которые предусматривают два равноценных пути прохождения излучения от одного и того же источника света. Один проходит через исследуемый образец, другой — через кювету, содержащую вещество сравнения. Оба потока измеряют по отдельности с помощью двух приемников излучения либо на одном приемнике с модулятором. Чаще всего используется второй способ регистрации излучения. На рисунке 2.1 представлена блок-схема такого прибора. После монохроматора с помощью системы расщепления луч света делится пополам, а затем через модулятор попадает на образец и эталон. На фотоприемник поочередно направляются лучи, проходящие через образец и эталон. При этом чаще всего используется дифференциальный (разностный) метод регистрации поглощения или пропускания исследуемого образца относительно эталона. Изменяя длину волны света с помощью монохроматора, получают спектр поглощения исследуемого образца.

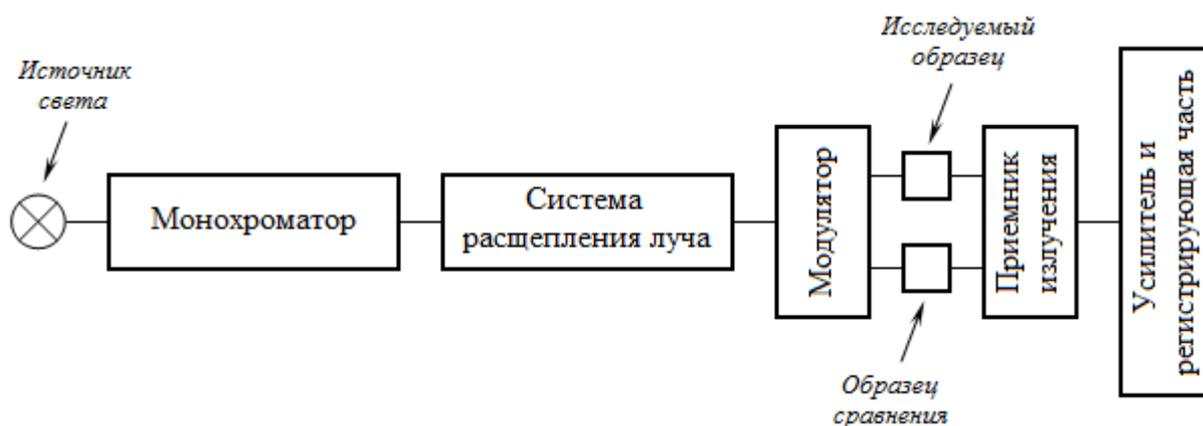


Рисунок 2.1. Блок-схема двулучевого спектрофотометра

2.2. Методика проведения спектрофотометрического эксперимента титрованием

Основным и широко используемым экспериментальным подходом к определению равновесных термодинамических параметров комплексообразования тех или иных соединений является так называемый эксперимент титрованием. Для постановки этого эксперимента необходимо знание точных концентраций веществ, поэтому сам эксперимент начинается со взвешивания навесок сухих веществ на аналитических весах. Масса вещества m с молярной массой M , необходимая для приготовления раствора с концентрацией C в объеме V , определяется по простой формуле: $m = MCV$.

Растворение навесок производится в нейтральном буферном водно-солевом растворе для приближения условий эксперимента к физиологическим. Величины ионной силы, рН раствора являются ключевыми, и особенно важен их контроль при работе с ДНК: зачастую при небольшом изменении ионной силы раствора ощутимо изменяются и электронные спектры поглощения систем Лиганд — ДНК, свидетельствуя о фундаментальной перестройке молекул БАС и их комплексов в растворе [140].

В эксперименте титрованием в системе с произвольным числом компонентов концентрация как минимум одного компонента меняется, в то время как концентрации остальных поддерживаются постоянными на протяжении всего экспе-

римента. Любой раствор N типов веществ ($N \geq 1$) можно рассматривать как $(N + 1)$ -компонентный раствор, в котором одним из компонентов всегда является растворитель. Для максимального нивелирования погрешности при разбавлении, а также при регистрации оптической плотности раствора, все разбавления проводят в одной кювете непосредственно в кюветном отделении спектрофотометра с помощью пневматических пипеток. Таким образом, объем раствора в кювете V_0 остается постоянным.

Очевидно, необходимо знать объемы забираемого/добавляемого растворов. Заметим, что титрование можно проводить двумя способами: от меньшей концентрации к большей либо от большей к меньшей. В первом случае для получения раствора с концентрацией C_{i+1} необходимо забрать из раствора с концентрацией C_i определенный объем V_{ex} и добавить такой же объем из раствора с концентрацией C_0 :

$$C_i(V_0 - V_{ex}) + C_0V_{ex} = C_{i+1}V_0,$$

откуда

$$V_{ex} = \frac{C_{i+1} - C_i}{C_0 - C_i} V_0. \quad (2.1)$$

При $C_0 = 0$ формула (2.1) пригодна для нахождения объемов при титровании от большей концентрации к меньшей:

$$V_{ex} = \left(1 - \frac{C_{i+1}}{C_i}\right) V_0. \quad (2.2)$$

Во всех экспериментах в рамках настоящей работы титрование N -компонентных растворов проводилось от большей концентрации к меньшей путем изъятия из кюветы объема смеси V_{ex} , рассчитываемого по формуле (2.2), и последующего добавления в кювету такого же объема $(N - 1)$ -компонентной смеси (т.е. раствора, содержащего все компоненты исходной смеси в исходных концентрациях за исключением того, концентрация которого меняется на протяжении эксперимента).

2.3. Методы нелинейной оптимизации

Одним из ключевых моментов при исследовании равновесных процессов с участием БАС является численный расчет параметров комплексообразования. Этот расчет во многих случаях заключается в решении системы нелинейных уравнений, описывающих материальный баланс системы взаимодействующих веществ. В данном подразделе рассмотрим методы нелинейной оптимизации, призванные решать такие уравнения численно.

2.3.1. Общий алгоритм проведения вычислительного эксперимента

Модели комплексообразования лигандов друг с другом и с ДНК основываются на записи двух аналитических выражений: закона сохранения массы и выражения для экспериментально наблюдаемого параметра [57,58,61,71,90,100,108]. Во всех случаях молярная концентрация мономеров взаимодействующих веществ может быть найдена из решения системы уравнений закон сохранения массы. Искомыми параметрами выступают константы связывания и некоторые внутренние параметры, которые являются аргументами функции ξ_i . Указанные параметры могут быть определены путем минимизации квадратичной функции невязки Δ :

$$\Delta = \sum_{i=1}^n \left(\xi_i^{\text{exper}} - \xi_i^{\text{theor}} \right)^2, \quad (2.3)$$

где n — число экспериментальных точек; ξ_i^{exper} и ξ_i^{theor} — экспериментальные значения наблюдаемого параметра для i -ой точки и соответствующие расчетные значения с использованием теоретической модели. Решением служит такой набор параметров, при котором значение функции (2.3) является наименьшим.

Критерием наилучшей аппроксимации экспериментальных данных в данной работе служил коэффициент детерминации R^2 , вычисляемый по следующей формуле:

$$R^2 \equiv 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\xi_i^{\text{exper}} - \xi_i^{\text{theor}})^2}{\sum_{i=1}^n (\xi_i^{\text{exper}} - \langle \xi_i^{\text{exper}} \rangle)^2} = 1 - \frac{\Delta}{\sum_{i=1}^n (\xi_i^{\text{exper}} - \langle \xi_i^{\text{exper}} \rangle)^2}, \quad (2.4)$$

где угловыми скобками показано среднее арифметическое значение экспериментально наблюдаемого параметра. Аппроксимация считается тем лучшей, чем больше значение коэффициента детерминации, который изменяется в пределах от 0 до 1. Если он становится меньше нуля, тогда это свидетельствует о неадекватности теоретической модели.

В настоящей работе для анализа экспериментальных данных и минимизации функции невязки (2.3) были использованы два метода: метод Левенберга — Марквардта и метод ломаных доверительных областей (trust-region dogleg). Оперирование двумя разными методами гарантирует нахождение глобального минимума (2.3) и повышает достоверность получаемых результатов. Рассмотрим эти два метода оптимизации подробнее.

2.3.2. Метод Левенберга — Марквардта

Алгоритм, сформулированный К. Левенбергом (Levenberg, 1944) [141] и позднее усовершенствованный Д. Марквардтом (Marquardt, 1963) [142,143], является итерационным методом для нахождения локального минимума многомерной функции, которая выражается в виде суммы квадратов нескольких нелинейных вещественных функций. Алгоритм Левенберга — Марквардта стал стандартным подходом для нелинейного метода наименьших квадратов, широко применяемым в различных областях, где требуется аппроксимация экспериментальной кривой теоретической зависимостью. Этот алгоритм можно рассматривать как комбинацию методов градиентного спуска и Гаусса — Ньютона. Таким образом, когда текущее решение находится далеко от локального минимума, алгоритм ведет себя как метод градиентного спуска: медленно, но гарантированно сходится. Однако, когда текущее решение близко к локальному минимуму, алгоритм ведет себя как

метод Гаусса — Ньютона и обладает быстрой сходимостью. «Переключение» между двумя режимами работы алгоритма осуществляется с помощью так называемого параметра Левенберга — Марквардта. Во всех вычислениях в данной работе его значение задавалось на уровне 0,01.

2.3.3. Метод ломаных доверительных областей

Методы доверительных областей были изучены в течение последних нескольких десятилетий и привели к возникновению численных алгоритмов, которые являются чрезвычайно надежными, обладают высокой сходимостью и могут быть применены даже к плохо обусловленным задачам [144]. Применение методики доверительных областей позволяет улучшить устойчивость расчетов в случаях, когда стартовая точка выбрана слишком далеко от точки решения [145].

Аналогично алгоритму Левенберга — Марквардта, метод ломаных доверительных областей (trust-region dogleg), изобретенный Пауэллом [146,147], для безусловной минимизации использует комбинацию методов Гаусса — Ньютона и наискорейшего спуска. В случае метода ломаных доверительных областей, однако, выбор того или иного алгоритма определяется размером доверительной области. Так, если текущее решение находится в пределах доверительной области, то метод работает по образу и подобию метода Гаусса — Ньютона. В противном случае метод ломаных доверительных областей ведет себя как метод наискорейшего спуска.

Алгоритм ломаных доверительных областей более эффективен, чем метод Левенберга — Марквардта, поскольку для него на каждой итерации требуется только одно обращение к линейному решателю (для расчета шага Гаусса — Ньютона). Кроме того, он может быть и более устойчивым за счет использования метода Гаусса — Ньютона для линейного поиска.

2.4. Статистико-термодинамические методы моделирования равновесного комплексообразования биомолекул

Статистико-термодинамические методы моделирования равновесия в растворах можно классифицировать по способу получения статистической суммы системы взаимодействующих элементов. При таком делении выделяют два основных метода: метод трансфер-матриц и метод производящих последовательность функций. Рассмотрим эти методы подробнее, но прежде обратим внимание на общие моменты в построении искомой статистической суммы.

2.4.1. Общие принципы составления статистической суммы системы

Статистическая сумма системы является базовым объектом в статистической термодинамике, из которой могут быть получены все необходимые исследователю термодинамические характеристики системы. Она отражает совокупность всех возможных состояний системы, каждое из которых обладает своей вероятностью (статистическим весом). В общем случае статистическая сумма может быть записана вручную путем перебора всех состояний, однако, с ростом числа таких состояний, такой прямой перебор становится весьма затруднительным. На помощь приходят различные математические методы составления статистической суммы, среди которых наиболее часто используются методы трансфер-матриц (transfer matrix, TM) и производящих последовательность функций (sequence generating function, SGF).

Оба эти метода основываются на представлении исследуемой системы (например, полимера) в виде одномерной регулярной решетки [148]. Целью обоих этих методов является вывод статистической суммы Z_N такой линейной решетки, состоящей из N ячеек. В общем случае статистическая сумма Z_N в матричном виде записывается следующим образом [149-151]:

$$Z_N = \mathbf{u} \mathbf{W}^{N-2} \mathbf{v}^T, \quad (2.5)$$

где элементы квадратной матрицы \mathbf{W} и векторов-строк \mathbf{u} и \mathbf{v} зависят от выбора конкретного метода (ТМ или SGF) [149]. Размерности этих матричных объектов определяются числом всех возможных состояний каждого отдельного взятого звена цепи (решетки), а сами состояния отражены в элементах матрицы \mathbf{W} в виде соответствующих статистических весов. Векторы \mathbf{u} и \mathbf{v} несут в себе информацию о состояниях концов решетки и, как правило, являются единичными векторами, предназначенными для «сворачивания» матричного произведения в скаляр (в этом случае показатель степени матрицы \mathbf{W} равен N). Принципиальное различие подходов ТМ и SGF состоит в способе заполнения матрицы \mathbf{W} , о чем речь пойдет ниже.

Основным свойством статистической суммы является то, что ее частные производные дают информацию о конкретных характеристиках системы. Так, например, если исследуется адсорбция лиганда на решетке либо линейная агрегация лигандов, то производная статистической суммы такой системы по натуральному логарифму мономерной концентрации дает общую концентрацию вещества в системе [57,58,152]. Аналогично определяется число пар молекул, или стыков между ними, путем дифференцирования статистической суммы по логарифму константы ассоциации этих молекул [57,58,152].

2.4.2. Метод трансфер-матриц

Метод трансфер-матриц является исторически первым методом, разработанным непосредственно для точного решения решеточных задач [153,154]. Одним из первых применений метода трансфер-матриц было описание кооперативных явлений в ферромагнетиках [155], основанное на решеточной модели Изинга, которая, в свою очередь, впоследствии нашла свое применение и в молекулярной биофизике. Позднее этот метод применялся чаще в молекулярной физике и биофизике для описания переходов «спираль — клубок» в полимерах [150,156], связывания лигандов с полимерами [124,157], при изучении плавления ДНК [158,159] и других областях.

Формализм трансфер-матриц основан на представлении исследуемой системы в качестве регулярной решетки, каждая ячейка которой характеризуется определенным статистическим весом, соответствующим определенному состоянию (например, занятый лигандом или свободный сайт ДНК [160,161]). Квадратная матрица, состоящая из таких статистических весов, и называется трансфер-матрицей. Очевидно, сумма ее элементов представляет собой статистическую сумму описываемой ею системы, т.е. ячейки решетки [162].

Ключевая идея записи трансфер-матрицы проста [161]: квадратная матрица \mathbf{M} заполняется элементами \mathbf{M}_{ij} , равными статистическим весам соответствующих ячеек решетки, находящихся в i -м состоянии, за которыми следуют ячейки, находящиеся в j -м состоянии. Физический смысл этого утверждения заключается в том, что элемент трансфер-матрицы является условной вероятностью того, что данная ячейка решетки находится в состоянии i в то время как непосредственно следующая за ней ячейка находится в состоянии j . Запрещенные состояния ячеек соответствуют статистическому весу, равному нулю.

Трансфер-матрица \mathbf{M} содержит статистические веса всех возможных состояний для одного звена решетки. Тогда возведение ее в степень N благодаря свойствам матричного произведения даст статистическую сумму одномерной решетки длиной N звеньев. Далее, следуя выражению (2.5), в котором векторы \mathbf{u} и \mathbf{v} являются единичными, получаем статистическую сумму:

$$Z_N = \mathbf{uM}^N \mathbf{v}^T. \quad (2.6)$$

2.4.3. Метод производящих последовательность функций

Метод производящих последовательность функций впервые был введен в рассмотрение Ш. Лифсоном в работе [163] применительно к регулярным полимерам. Этот метод основан на представлении полимера в качестве последовательности олигомеров, каждый из которых состоит из звеньев, находящихся в одном и том же состоянии, т.е. имеющих одинаковый статистический вес. Две подпоследовательности

довательности (олигомера), следующие друг за другом, должны быть разных типов, иначе они сливаются в одну подпоследовательность. Состояние всей цепи считается определенным, если определены длины и типы составляющих ее олигомеров.

Пусть u_i — статистический вес звена i -го типа. Тогда функция, производящая подпоследовательность i -го типа длиной N звеньев

$$S(u_i) = \sum_{k=1}^N u_i^k \quad (2.7)$$

является одновременно статистической суммой этого олигомера.

Далее фактически применяется методика построения трансфер-матрицы, в которой элементами являются уже не статистические веса отдельных звеньев решетки (как в методе ТМ), а статистические суммы целых подпоследовательностей отдельных типов. Расположим выражения (2.7) в квадратной матрице \mathbf{S} , ij -й элемент которой является статистической суммой олигомера i -го типа, за которым непременно следует олигомер типа j . Необходимо отметить, что на главной диагонали такой матрицы будут находиться нули, свидетельствующие о бессмысленности объединения двух подпоследовательностей одинакового типа (своего рода запрещенное состояние). Если теперь положить, что вектора \mathbf{u} и \mathbf{v} из выражения (2.5) состоят из единиц (статистический вес конечной фиктивной подпоследовательности, необходимый лишь для «сворачивания» матрицы в скаляр), то выражение $\mathbf{uS}^m \mathbf{v}^T$ учитывает все возможные комбинации m олигомеров. Таким образом, статистическая сумма Z_m решетки, состоящей из m последовательно соединенных блоков (подпоследовательностей звеньев одного и того же типа), записывается в виде:

$$Z_m = \mathbf{uS}^m \mathbf{v}^T. \quad (2.8)$$

Таким образом, метод SGF в каком-то смысле является эквивалентом метода ТМ, однако не является его строгим повторением.

Следует также отметить, что существуют математические подходы, являющиеся своего рода комбинацией методов ТМ и SGF (см., например, [164]).

В данном разделе рассмотрены основы спектрофотометрического метода измерений, методика проведения эксперимента титрованием, методы нелинейной оптимизации экспериментальных данных и подходы статистической термодинамики, которые в настоящем диссертационном исследовании будут являться основным инструментом исследования процессов комплексообразования в многокомпонентных растворах биологически активных веществ и ДНК.

РАЗДЕЛ 3

СТАТИСТИКО-ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ БАЗИС ИНТЕРЦЕПТОРНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ

В первом разделе настоящей работы было показано, что все без исключения существующие теории ИПД обладают существенным недостатком, который выражается в ограничении равновесного распределения молекулярных комплексов в системе. Это, в свою очередь, не позволяет в полной мере учесть вклад интерцепторного механизма в наблюдаемые изменения медико-биологического эффекта при комбинированном использовании ароматических БАС. В настоящем разделе дан исчерпывающий вывод строгой модели гетероассоциации, учитывающей образование всех возможных комплексов малых молекул друг с другом произвольного состава и длины и лежащей в основе статистико-термодинамического описания интерцепторного механизма действия. Также дано обоснование использования бесконечномерных моделей последовательной агрегации молекул-интерцепторов с позиций статистической термодинамики. Все получаемые в данном разделе результаты будут проецироваться на класс ароматических БАС, не содержащих сильно разветвленных боковых цепей, как тип молекул, наиболее часто проявляющих интерцепторный механизм действия (см. раздел 1).

3.1. Агрегация ароматических БАС

Основные физические допущения, лежащие в основе моделей само- и гетероассоциации, идентичны [165], однако не все из них имеют четкое физическое обоснование. Рассмотрим некоторые ключевые моменты построения таких моделей, аксиоматически используемых в большей части известного нам опубликованного научного материала. Изложенные в данном подразделе выводы опубликованы нами в работах [166,167].

3.1.1. Доказательство термодинамической выгоды последовательной агрегации БАС [166]

При исследовании молекулярной само- и гетероассоциации на практике наиболее часто используется подход, описанный в работе [165], который основан на последовательном добавлении мономера X_1 к олигомеру X_{i-1} , содержащему $i-1$ молекул как при описании динамического равновесия [165], так и кинетики [168] данного процесса:



Реакция (3.1) характеризуется равновесной константой самоассоциации K_i , являющейся наиболее информативной величиной при количественном описании реакций такого типа. Существуют два наиболее важных частных случая, используемых в большинстве приложений для молекул различной природы (см. [165,169,170] и ссылки в них), в которых:

- 1) равновесная константа K_i одинакова для всех стадий комплексообразования (так называемая ЕК-модель, или «изодесмическая» (англ. «isosdesmic») модель), т.е. $K_i = K_{ЕК}$;
- 2) вводится профиль равновесной константы в виде эмпирической функции числа молекул i в агрегате, $K_i = f(i)$, в соответствии с которой значение K_i возрастает либо убывает.

Если проследить использование этих частных случаев в различных приложениях, включая одно из первых случаев использования реакции (3.1) в виде реакции димеризации в работе [171], то можно сформулировать один фундаментальный вопрос, с решением которого сталкивается исследователь при изучении молекулярной ассоциации. Реакция (3.1) учитывает только последовательный рост агрегата, когда любой i -мер может быть представлен в виде определенной комбинации агрегатов меньших размерностей, и не учитывает так называемую случайную моду агрегации, т.е. когда



Реакция типа (3.2), как правило, используется для описания кинетики агрегации (например, [172]).

В общем случае обе моды (3.1) и (3.2) могут определять процесс агрегации, однако соотношение их вкладов остается неизвестным. Более того, до сих пор не было предложено ни одного физически обоснованного критерия выбора между последовательной (3.1) и случайной (3.2) модами агрегации. Если при анализе используется ЕК-модель, в предположении того, что все этапы агрегации одинаковы, то при моделировании межмолекулярного равновесия, вообще говоря, не существует явных физических предпосылок для выбора той или иной моды агрегации (см., например, работу [165]). Таким образом, возникает вопрос: какой тип реакции, последовательный (3.1) или случайный (3.2), физически наиболее адекватен при описании молекулярной самоассоциации молекул-интерцепторов? Аналогичный вопрос может быть сформулирован и по отношению к моделям гетероассоциации, которые всецело основаны на допущении последовательной агрегации.

Для того чтобы ответить на этот вопрос, необходимо выявить факторы, дающие вклад в свободную энергию агрегации и зависящие от числа молекул в агрегате. Очевидно, что ван-дер-ваальсовы и классические гидрофобные взаимодействия должны быть исключены из рассмотрения как короткодействующие факторы [173]. Сравнительно недавно была обнаружена фундаментальная антикооперативность, присущая реакциям молекулярной ассоциации [173,174]. Эта особенность является общей для всех процессов нековалентной молекулярной ассоциации и следует из потери трансляционных и вращательных (ротационных) степеней свободы агрегата при присоединении каждой новой молекулы. Потеря степеней свободы агрегата по своей природе является чисто энтропийным фактором и оказывается более чувствительным к числу молекул в агрегате, нежели, например, короткодействующие факторы.

Особое внимание следует уделить учету электростатических взаимодействий, которые обычно относят к дальнедействующим факторам, потенциально способным вносить свой вклад в равновесную константу K_i . Недавние результа-

ты исследования энергетики самоассоциации БАС [175] показали, что межмолекулярная электростатическая энергия практически уравнивается потерей электростатического взаимодействия с молекулами растворителя при агрегации. В результате суммарная электростатическая энергия реакции самоассоциации является достаточно малой по величине, причем она слабо зависит от наличия единичного заряда на взаимодействующих молекулах. Таким образом, можно предположить, что электростатический фактор не дает существенного вклада непосредственно в профиль равновесной константы, поэтому (и только в этом контексте) условно его можно отнести к силам ближнего действия.

Итак, идея ответа на сформулированный выше вопрос состоит в рассмотрении фундаментального антикооперативного вклада в профиль равновесной константы ассоциации [173], который приводит к затуханию K_i с ростом числа молекул i в агрегате. Рассмотрим подробнее влияние потери степеней свободы на вероятность протекания реакции самоассоциации.

Молярные трансляционные и ротационные энтропии агрегата, содержащего i молекул, задаются следующими выражениями [173,176]:

$$S_{\text{tr}}^i = \left(\frac{5}{2} + \frac{3}{2} \ln \frac{2\pi i m k_B T}{h^2} - \ln \frac{N_A}{V} \right) R \quad (3.3)$$

(уравнение Сакура — Тетроде) и

$$S_{\text{rot}}^i = \left(\frac{3}{2} + \frac{1}{2} \ln \pi I_x^i I_y^i I_z^i + \frac{3}{2} \ln \frac{8\pi^2 k_B T}{h^2} \right) R, \quad (3.4)$$

где N_A , h , k_B — постоянные Авогадро, Планка и Больцмана соответственно; m — масса молекулы; R — универсальная газовая постоянная; $V = 10^{-3} \text{ м}^3$; T — абсолютная температура; I_x^i , I_y^i , I_z^i — моменты инерции агрегата из i молекул по отношению к осям декартовой системы координат.

Изменение каждой из энтропий (3.3) и (3.4) в реакциях (3.1) и (3.2) может быть записано в общем виде:

$$\Delta S^i = S^i - S^j - S^k, \quad (3.5)$$

где $i = j + k$; применительно к реакции ассоциации последовательного типа (3.1) имеем: $k = 1$ и $j = i - 1$. Отметим, что случайная мода агрегации характеризуется следующими условиями:

$$i > 3 \text{ и } k \neq (1, i - 1). \quad (3.6)$$

С учетом уравнений (3.3) и (3.5) изменение трансляционной энтропии принимает вид:

$$\Delta S_{\text{tr}} = S_{\text{tr}}^i - S_{\text{tr}}^k - S_{\text{tr}}^{i-k} = - \left(\frac{5}{2} + \frac{3}{2} \ln \frac{k(i-k)}{i} \frac{2\pi m k_B T}{h^2} - \ln \frac{N_A}{V} \right) R. \quad (3.7)$$

Сравнение ΔS_{tr} для последовательной (3.1) и случайной (3.2) мод ассоциации сводится к сравнению величин под знаком логарифма, соответственно $(i-1)$ и $k(i-k)$. Для определения того, какая из величин ΔS_{tr} является большей, а какая меньшей, рассмотрим неравенство:

$$(i-1) < k(i-k). \quad (3.8)$$

Перепишем (3.8) в следующем виде:

$$(k-1)(k-i+1) < 0. \quad (3.9)$$

Отсюда следует, что неравенство (3.8) справедливо при всех $i > 3$ и $k \neq (1, i-1)$, что полностью совпадает с условиями (3.6). Этот результат свидетельствует о том, что ΔS_{tr} для случайной моды агрегации является более отрицательным по сравнению с ΔS_{tr} для последовательной моды агрегации. Следовательно, реакция (3.2) является энтропийно менее выгодной, чем реакция (3.1).

Далее рассмотрим изменение ротационной энтропии при увеличении длины агрегата. Подставляя выражение (3.4) в (3.5), получим

$$\Delta S_{\text{rot}} = S_{\text{rot}}^i - S_{\text{rot}}^k - S_{\text{rot}}^{i-k} = - \left(\frac{3}{2} + \frac{1}{2} \ln \pi \frac{I_x^k I_y^k I_z^k I_x^{i-k} I_y^{i-k} I_z^{i-k}}{I_x^i I_y^i I_z^i} + \frac{3}{2} \ln \frac{8\pi^2 k_B T}{h^2} \right) R. \quad (3.10)$$

Как и ранее, сравнение ΔS_{rot} для последовательной (3.1) и случайной (3.2) мод ассоциации сводится к сравнению величин под знаком логарифма, соответственно

$I_x^1 I_y^1 I_z^1 I_x^{i-1} I_y^{i-1} I_z^{i-1}$ and $I_x^k I_y^k I_z^k I_x^{i-k} I_y^{i-k} I_z^{i-k}$. Перепишем эти произведения в следующем виде:

$$\left(I_x^1 I_x^{i-1}\right)\left(I_y^1 I_y^{i-1}\right)\left(I_z^1 I_z^{i-1}\right) \text{ и } \left(I_x^k I_x^{i-k}\right)\left(I_y^k I_y^{i-k}\right)\left(I_z^k I_z^{i-k}\right). \quad (3.11)$$

Анализ (3.11) показывает, что достаточно выполнить сравнение только какой-то одной пары произведений, относящихся к одной и той же оси, например, $\left(I_x^1 I_x^{i-1}\right)$ и $\left(I_x^k I_x^{i-k}\right)$, а затем распространить полученные выводы для таких же произведений, но относящихся уже к другим осям. Однако непосредственное сравнение этих величин не представляется возможным, поскольку оно требует знания функциональной зависимости моментов инерции от числа молекул, которое, в свою очередь, зависит от формы агрегата. Для решения этой проблемы рассмотрим два предельных случая, охватывающих образование агрегатов всех возможных форм.

Случай 1. Допустим, что добавление молекул агрегатов приводит к незначительному изменению размеров агрегатов. В такой интерпретации сам процесс агрегации можно представить как простое добавление массы присоединяющегося мономера (в случае последовательной моды агрегации) или олигомера (в случае случайной моды агрегации) к уже имеющемуся агрегату. Тогда момент инерции пропорционален числу молекул в агрегате, и сравнение величин $\left(I_x^1 I_x^{i-1}\right)$ и $\left(I_x^k I_x^{i-k}\right)$ сводится к сравнению выражений $I_x^1 I_x^1 (i-1)$ и $I_x^1 I_x^1 k(i-k)$. Таким образом, сравниваются числа $(i-1)$ и $k(i-k)$, что уже было рассмотрено выше более подробно для изменения трансляционной энтропии агрегата (выражение (3.8)). Это означает, что в рассматриваемом случае 1 изменение ΔS_{rot} для реакции случайной моды агрегации (3.2) более отрицательно, чем ΔS_{rot} для реакции последовательной моды агрегации (3.1). Следовательно, последняя является термодинамически более выгодной.

Случай 2. Допустим, что агрегация происходит вдоль определенной оси, например, оси z . Этот случай был подробным образом рассмотрен в работе [173]. Моменты инерции в этом случае характеризуются строгой зависимостью от числа молекул i в агрегате:

$$\begin{cases} I_x^i = iI_x^1 + md^2 \frac{i(i-1)(i+1)}{24} \\ I_y^i = iI_y^1 + md^2 \frac{i(i-1)(i+1)}{24}, \\ I_z^i = iI_z^1 \end{cases} \quad (3.12)$$

где d — расстояние между любыми двумя соседними молекулами в агрегате.

Сравнение последовательной и случайной мод агрегации, $(I_x^1 I_x^{i-1}) \langle \rangle (I_x^k I_x^{i-k})$, может быть осуществлено следующим образом:

$$\begin{aligned} & \left[(i-1)I_x^1 + (i-1)\left((i-1)^2 - 1\right)\Delta I_x \right] I_x^1 \langle \rangle \\ & \left[kI_x^1 + k(k^2 - 1)\Delta I_x \right] \left[(i-k)I_x^1 + (i-k)\left((i-k)^2 - 1\right)\Delta I_x \right], \end{aligned}$$

где $\Delta I_x = md^2/24$. Раскроем скобки в последнем выражении и сравним подобные слагаемые:

$$\begin{aligned} & (i-1)(I_x^1)^2 + i(i-1)(i-2)I_x^1\Delta I_x \langle \rangle \\ & k(i-k)(I_x^1)^2 + k(i-k)\left[(i-k)^2 - 1\right]I_x^1\Delta I_x + \quad . \quad (3.13) \\ & + k(k^2 - 1)(i-k)I_x^1\Delta I_x + k(k^2 - 1)(i-k)\left[(i-k)^2 - 1\right](\Delta I_x)^2 \end{aligned}$$

Сравнение первых слагаемых $(i-1)(I_x^1)^2 \langle \rangle k(i-k)(I_x^1)^2$ приводит к неравенству (3.8), что позволяет сделать вывод о том, что ΔS_{rot} для случайной моды агрегации (3.2) более отрицательно, чем ΔS_{rot} для последовательной моды агрегации (3.1). Слагаемое с множителем $(\Delta I_x)^2$ отсутствует в левой части выражения (3.13), что также указывает на то, что ΔS_{rot} для случайной моды агрегации меньше, чем таковое для последовательной моды. Остается сравнить слагаемые, содержащие множитель $I_x^1\Delta I_x$ в обеих частях выражения (3.13):

$$\begin{aligned} & i(i-1)(i-2) \langle \rangle k(i-k)\left[(i-k)^2 - 1\right] + k(k^2 - 1)(i-k), \\ & i(i-1)(i-2) \langle \rangle k(i-k)\left[(i-k)^2 + k^2 - 2\right]. \quad (3.14) \end{aligned}$$

Рассмотрим правую часть выражения (3.14) в виде функции аргумента k ,

$$F(k) = k(i-k) \left[(i-k)^2 + k^2 - 2 \right], \quad (3.15)$$

и найдем минимумы этой функции. Первая производная функции (3.15) по k

$$\frac{d}{dk} F(k) = (i-2k) \left[(i-k)^2 + k^2 - 2 \right] - 2k(i-k)(i-2k) = (i-2k) \left[(i-2k)^2 - 2 \right]$$

имеет три нуля: $k_1 = i/2$, $k_{2,3} = \frac{i \pm \sqrt{2}}{2}$, соответствующих одному минимуму (k_1) и

двум максимумам ($k_{2,3}$) функции (3.15). Найдем теперь значения функции $F(k)$

на краях ее области определения, т.е. $F(2)$ и $F(i-2)$, и в минимуме, т.е. $F(i/2)$,

и используем полученные значения для определения знака неравенства (3.14).

При $k = i/2$ имеем:

$$i(i-1)(i-2) \lessgtr \frac{i^2}{4} \left(2\frac{i^2}{4} - 2 \right); \quad (i-1) \lessgtr \frac{i}{8}(i+2); \quad (i-2)(i-4) \lessgtr 0.$$

Очевидно, все значения $i > 4$ соответствуют неравенству $(i-2)(i-4) > 0$. Следова-

тельно, при всех $i \geq 4$ выражение (3.14) принимает вид

$$i(i-1)(i-2) \leq k(i-k) \left[(i-k)^2 + k^2 - 2 \right].$$

Это означает, что дальнейшее рассмотрение максимумов функции $F(k)$ можно опустить.

Вычислим значения функции $F(k)$ на краях области ее определения, т.е.

при $k = 2$ и $k = i - 2$. Очевидно, функция (3.15) инвариантна относительно замены

i на $i - 2$, поэтому рассмотрим только один случай $F(2)$. В этом случае выраже-

ние (3.14) принимает вид:

$$i(i-1)(i-2) \lessgtr 2(i-2) \left[(i-2)^2 + 2 \right],$$

$$(i-3)(i-4) \lessgtr 0.$$

Легко заметить, что при всех $i \geq 4$ последнее неравенство преобразуется в

$$(i-3)(i-4) \geq 0,$$

что позволяет переписать выражение (3.14) в более определенном виде:

$$i(i-1)(i-2) \leq k(i-k) \left[(i-k)^2 + k^2 - 2 \right].$$

С учетом рассмотренных выше случаев можно заключить, что общим решением (3.14), справедливым при всех $i > 3$ и $k \neq (1, i-1)$, является неравенство

$$i(i-1)(i-2) \leq k(i-k) \left[(i-k)^2 + k^2 - 2 \right].$$

Этот результат дает право переписать выражение (3.13) в окончательном виде:

$$\begin{aligned} & (i-1)(I_x^1)^2 + i(i-1)(i-2)I_x^1\Delta_x < \\ & k(i-k)(I_x^1)^2 + k(i-k) \left[(i-k)^2 - 1 \right] I_x^1\Delta_x + \\ & + k(k^2-1)(i-k)I_x^1\Delta_x + k(k^2-1)(i-k) \left[(i-k)^2 - 1 \right] (\Delta_x)^2 \end{aligned}$$

Отсюда следует, что в рассматриваемом случае 2 при одних и тех же условиях (3.6) суммарное изменение ротационной энтропии ΔS_{rot} для реакции случайной моды агрегации (3.2) более отрицательно, чем ΔS_{rot} для реакции последовательной моды агрегации (3.1). Случай 1 рассматривает медленный рост момента инерции агрегата с ростом числа молекул i как результат линейного увеличения массы, предполагая, в целом, неизменность размеров агрегата. Случай 2 рассматривает быстрый рост момента инерции в результате линейного увеличения массы и максимально быстрое увеличение размеров агрегата, пропорциональное i^3 (см. систему уравнений (3.12)). Любые другие формы агрегатов всегда будут давать зависимость момента инерции от i в выражении (3.10) как промежуточную между рассмотренными случаями 1 и 2. Таким образом, с точки зрения потери вращательных степеней свободы молекулярная самоассоциация представляется энтропийно более выгодной при последовательном добавлении мономеров к агрегату в соответствии с реакцией (3.1), нежели при случайной агрегации в соответствии с реакцией (3.2). Поскольку сколько-нибудь существенное различие между комплексообразованием однородных (самоассоциация) и сходных по размерам и массе разнородных (гетероассоциация) молекул в контексте энтропийных факторов потери степеней свободы отсутствует, данный вывод может быть также распространен и на реакции гетероассоциации.

Подводя итог всему вышесказанному, можно заключить, что в реакции типа (3.2) изменения трансляционной и ротационной энтропий в уравнениях (3.5) всегда будут более отрицательными, чем изменения этих энтропий в реакции типа (3.1), независимо от каких-либо предположений относительно формы агрегатов. Это означает, что молекулярная само- и гетероассоциация, происходящая в соответствии с реакцией агрегации случайного типа (3.2), энтропийно менее выгодна, чем агрегация, происходящая в соответствии с реакцией последовательного типа (3.1). Следует, однако, отметить, что данный вывод справедлив только в предположении того, что равновесные константы в реакциях (3.1) и (3.2) отличаются только благодаря факторам энтропийной природы (т.е. благодаря потере степеней свободы и тому, что взаимодействующие молекулы имеют близкие молекулярные массы). Другими словами, суммарный энергетический эффект от других факторов, таких как ван-дер-ваальсовы, электростатические, гидрофобные силы и т.д., полагается одинаковым в обеих реакциях. В частности, это условие выполняется для молекул, имеющих не более двух контактов с соседними молекулами, т.е. молекул, находящихся в составе линейных агрегатов, которые являются типичным способом комплексообразования ароматических БАС [165,169], подпадающих под категорию молекул-интерцепторов. Таким образом, допущение о последовательном характере само- и гетероассоциации молекул БАС и ароматических молекул-интерцепторов, лежащее в основе всех современных моделей интерцепторного механизма действия, является корректным.

3.1.2. Обоснование справедливости использования бесконечномерных моделей агрегации [167]

Немаловажным является вопрос выбора модели агрегации в молекулярных системах в контексте ограничений, вводимых на длину образующихся комплексов. В настоящее время в литературе не существует единого физически обоснованного критерия выбора той или иной модели агрегации. В результате исследователь в каждом отдельном случае при выборе модели вынужден полагаться ско-

рее на собственную интуицию и опыт, чем на объективные предпосылки (см., например, [177]). Таким образом, необходимо четко определить, какая модель с точки зрения длины образующихся комплексов является физически адекватной и следует ли вообще вводить какое-либо ограничение в этом смысле. Рассмотрим подробнее этот вопрос на примере самоассоциации молекул и затем распространим полученные выводы на гетероассоциацию, основываясь на отсутствии принципиальных отличий между однородной и разнородной ассоциацией, указанном в предыдущем пункте настоящей работы.

Так называемая ЕК-модель самоассоциации, в которой значение равновесной константы K_i одинаково для всех стадий процесса ассоциации (3.1), стала стандартным методом исследования молекулярной агрегации [165,178]. Степень агрегации в ЕК-модели может быть ограничена, т.е. $i \in 2 \dots n$ (как в n -мерной ЕК-модели, $K_i = K_n$), либо не ограничена, т.е. $i \in 2 \dots \infty$ (как в бесконечномерной ЕК-модели, $K_i = K_\infty$). Димерная модель является наиболее важным частным случаем n -мерной ЕК-модели, т.е. когда $n = 2$ и $K_i = K_2$ [165].

Широко известным фактом является то, что димерная и бесконечномерная модели являются неразличимыми при условии $2K_2 = K_\infty$ [179,180], т.е. аппроксимация экспериментальных данных с помощью этих моделей дает одинаковые невязки. Эта неразличимость иногда отмечается исследователями молекулярной самоассоциации, использующими такие методы как ЯМР, микрокалориметрия или спектрофотометрия [181], однако остается неизвестной причина этого эффекта. Некоторые авторы указывают на симметрию уравнений самоассоциации [180,181], однако это никак не проливает свет на причины описанной неразличимости.

В настоящее время традиционным критерием выбора той или иной модели для описания экспериментальной кривой титрования является диапазон рабочих концентраций. Например, если это микромолярный диапазон, то, как правило, используется димерная модель, в то время как для миллимолярного диапазона наиболее подходящей считается бесконечномерная модель [65,66,90,182-184]. Хотя

этот критерий и интуитивно кажется очевидным, такой подход допускает полный произвол в нахождении значения равновесной константы K_i , которое в этом случае становится зависимым от типа эксперимента и от конкретных предположений самого исследователя. Таким образом, необходимо установить, является ли критерий концентрационного диапазона корректным.

Согласно традиционной формулировке димерной и бесконечномерной моделей [165] закон сохранения массы для реакции типа (3.1) имеет вид:

$$x_0 = \sum_{i=1}^{\infty} ix_i = \frac{x_{1(\infty)}}{(1 - K_{\infty}x_{1(\infty)})^2} \text{ для бесконечномерной модели,} \quad (3.16)$$

$$x_0 = x_{1(D)} + 2K_2x_{1(D)}^2 \text{ для димерной модели,} \quad (3.17)$$

где $x_i = K_{\infty}^{i-1}x_{1(\infty)}^i$ — концентрация i -меров согласно закону действующих масс; $x_{1(\infty)}$, $x_{1(D)}$ — мономерные концентрации соответственно в бесконечномерной и димерной моделях. Решение уравнений (3.16) и (3.17) относительно мономерных концентраций дается следующим образом:

$$x_{1(\infty)} = \frac{2K_{\infty}x_0 + 1 - \sqrt{4K_{\infty}x_0 + 1}}{2K_{\infty}^2x_0} \text{ и } x_{1(D)} = \frac{-1 + \sqrt{8K_2x_0 + 1}}{4K_2}. \quad (3.18)$$

Далее запишем выражения для экспериментально наблюдаемого параметра ξ (например, химический сдвиг в ЯМР, коэффициент экстинкции в спектрофотометрии) для обеих моделей. В рамках ЕК-модели линейной агрегации на молекулу, находящуюся в агрегате, оказывают влияние лишь две ближайшие соседние молекулы (на краях агрегата — только одна молекула), что отражается в суммарном учете вкладов этих молекул в общий параметр ξ (модель «ближайшего соседа» [165]):

$$\begin{aligned} \xi_{\infty} &= \xi_{\infty}^{(m)} \frac{x_{1(\infty)}}{x_0} + \xi_{\infty}^{(d)} \frac{1}{x_0} \sum_{i=2}^{\infty} 2x_i + \left(2\xi_{\infty}^{(d)} - \xi_{\infty}^{(m)}\right) \frac{1}{x_0} \sum_{i=2}^{\infty} (i-2)x_i = \\ &= \xi_{\infty}^{(m)} + \left(\xi_{\infty}^{(d)} - \xi_{\infty}^{(m)}\right) \frac{2K_{\infty}x_0 + 1 - \sqrt{4K_{\infty}x_0 + 1}}{K_{\infty}x_0}, \end{aligned} \quad (3.19)$$

$$\begin{aligned}\xi_D &= \xi_D^{(m)} \frac{x_{1(D)}}{x_0} + \xi_D^{(d)} \frac{2K_2 x_{1(D)}^2}{x_0} = \\ &= \xi_D^{(m)} + \left(\xi_D^{(d)} - \xi_D^{(m)} \right) \frac{4K_2 x_0 + 1 - \sqrt{8K_2 x_0 + 1}}{4K_2 x_0},\end{aligned}\quad (3.20)$$

где $\xi^{(m)}$ и $\xi^{(d)}$ — экспериментально наблюдаемые параметры молекулы, находящейся в мономерном и димерном состоянии, соответственно.

Если сравнить выражения (3.19) и (3.20), то становится ясно, что они являются неразличимыми при условиях, что $\xi_D^{(d)} - \xi_D^{(m)} = 2(\xi_\infty^{(d)} - \xi_\infty^{(m)})$ и $2K_2 = K_\infty$, которые, в свою очередь, указывают на принципиальную неразличимость димерной и бесконечномерной моделей при аппроксимации экспериментальных данных. Следствием этого является и абсолютная идентичность значения функции невязки при аппроксимации экспериментальных данных по этим двум моделям при трех подгоночных параметрах, K_2 (или K_∞), $\xi_D^{(m)}$ (или $\xi_\infty^{(m)}$) и $\xi_D^{(d)}$ (или $\xi_\infty^{(d)}$).

Таким образом, выражения (3.19) и (3.20) не дают представления о происхождении проблемы неразличимости моделей. Для исследования этого вопроса воспользуемся формализмом статистических сумм (см. раздел 2) для ЕК-модели, агрегация в которой ограничена в общем случае числом n . Далее путем подстановок $n = \infty$ и $n = 2$ можно будет перейти соответственно к димерной и бесконечномерной моделям, как к частным случаям ЕК-модели.

Концентрационная зависимость экспериментально наблюдаемого параметра ξ в n -мерной ЕК-модели может быть представлена в виде средневзвешенной суммы наблюдаемых параметров $\xi^{(i)}$, описывающих вклад агрегатов, содержащих i молекул:

$$\xi(x_0) = \frac{1}{x_0} \sum_{i=1}^n \xi^{(i)} x_i. \quad (3.21)$$

В пределе малых концентраций, $x_0 \rightarrow 0$, значение экспериментально наблюдаемого параметра ξ становится равным значению $\xi^{(m)}$ мономера, $\xi(x_0) \rightarrow \xi^{(m)}$, т.е. не зависит от n . Это означает, что $\xi^{(m)}$ является параметром, не зависящим от выбора

модели, а потому его значение одинаково в любой модели молекулярной ассоциации.

Наличие контакта (стыка) между двумя соседними молекулами в произвольном i -мере вследствие использования модели «ближайшего соседа» отражается в добавлении слагаемого $(\xi^{(m)} - \xi_n^{(d)})$ к параметру $\xi^{(i)}$, что позволяет переписать уравнение (3.21) через общее число стыков T_n между молекулами в составе всех существующих в растворе комплексов:

$$\xi(x_0) = \xi^{(m)} - 2\left(\xi^{(m)} - \xi_n^{(d)}\right) \frac{T_n}{x_0}. \quad (3.22)$$

Уравнение (3.22) содержит два параметра: $\xi_n^{(d)}$ и K_n (заложены в величину T_n), которые зависят от выбора порядка модели n .

В пределе высоких концентраций $x_0 \rightarrow \infty$ система в основном будет содержать n -меры, экспериментально наблюдаемые параметры ξ_n которые определяются путем усреднения по всем молекулам в таких агрегатах:

$$\xi_n = \left(2\xi_n^{(d)} - \xi^{(m)}\right) \frac{n-2}{n} + \xi_n^{(d)} \frac{2}{n} = \xi^{(m)} - 2\left(\xi^{(m)} - \xi_\infty^{(d)}\right) \frac{n}{n-1}. \quad (3.23)$$

При условии $x_0 \rightarrow \infty$ эта же величина в бесконечномерной модели (т. е. когда $n = \infty$) принимает вид:

$$\xi_\infty = \xi^{(m)} - 2\left(\xi^{(m)} - \xi_\infty^{(d)}\right). \quad (3.24)$$

Поскольку экспериментальная зависимость $\xi(x_0)$ не зависит от выбора модели (в том числе в пределе $x_0 \rightarrow \infty$), то можно приравнять уравнения (3.23) и (3.24):

$$\xi^{(m)} - \xi_n^{(d)} = \frac{n}{n-1} \left(\xi^{(m)} - \xi_\infty^{(d)}\right). \quad (3.25)$$

Подстановка уравнения (3.25) в уравнение (3.22) дает выражение с одним подгоночным параметром (константа самоассоциации в n -мерной модели K_n), который уже зависит от выбора модели:

$$\xi(x_0) = \xi^{(m)} - 2\left(\xi^{(m)} - \xi_\infty^{(d)}\right) \frac{n}{n-1} \cdot \frac{T_n}{x_0}. \quad (3.26)$$

Предполагая, что агрегация в системе происходит по последовательной схеме (3.1), описываемой n -мерной ЕК-моделью, можем найти величину T_n из большой статистической суммы Z_n системы путем дифференцирования последней по натуральному логарифму равновесной константы K_n :

$$T_n = \frac{\partial Z_n}{\partial \ln K_n}, \quad Z_n = x_{1(n)} + K_n x_{1(n)}^2 + K_n^2 x_{1(n)}^3 + \dots = \frac{x_{1(n)} (1 - K_n^n x_{1(n)}^n)}{1 - K_n x_{1(n)}}. \quad (3.27)$$

Уравнение (3.27) содержит мономерную концентрацию, $x_{1(n)}$, которая может быть найдена из закона сохранения массы:

$$x_0 = \frac{\partial Z_n}{\partial \ln x_{1(n)}}. \quad (3.28)$$

Согласно стандартному алгоритму [165] нахождения параметров агрегации $\xi^{(m)}$, $\xi_n^{(d)}$, K_n аппроксимация экспериментальной кривой титрования $\xi(x_0)$ осуществляется путем подгонки этих параметров с целью минимизации функции невязки между экспериментальными и теоретическими (3.26) значениями $\xi(x_0)$. Эта процедура требует знания мономерных концентраций $x_{1(n)}$, которые могут быть найдены из решения уравнения (3.28) в каждой экспериментальной точке x_0 .

Общее условие неразличимости моделей самоассоциации может быть выведено из уравнений (3.26) — (3.28). Любые две произвольно выбранные n -мерные и m -мерные модели всегда будут неразличимы, если величины $\xi(x_0)$, рассчитанные по этим моделям, равны при любой концентрации x_0 :

$$\begin{cases} \frac{n}{n-1} T_n = \frac{m}{m-1} T_m \\ \frac{\partial Z_n}{\partial \ln x_{1(n)}} = \frac{\partial Z_m}{\partial \ln x_{1(m)}} \end{cases} \quad (3.29)$$

или в более общей форме

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{n}{n-1} \cdot \frac{\partial Z_n}{\partial \ln K_n} = \frac{m}{m-1} \cdot \frac{\partial Z_m}{\partial \ln K_m} \\ \frac{\partial Z_n}{\partial \ln x_{1(n)}} = \frac{\partial Z_m}{\partial \ln x_{1(m)}} \\ Z_s = \frac{x_{1(s)} (1 - K_s^s x_{1(s)}^s)}{1 - K_s x_{1(s)}}, \quad s \in n, m \end{array} \right. . \quad (3.30)$$

Система уравнений (3.30) дает общую формулировку эффекта неразличимости для произвольных n - и m -мерных ЕК-моделей самоассоциации, решение которой дает пару чисел n, m . Однако, система (3.30) содержат слишком много неизвестных величин ($n, m, x_{1(n)}, x_{1(m)}$) и, следовательно, не имеет общего решения. Это означает, что неразличимость, по-видимому, не является общим свойством моделей самоассоциации. Проведенная нами попытка найти пары неразличимых моделей отдельно для димерной (т.е. когда $n=2, m$ — произвольное натуральное число) или бесконечномерной ($n=\infty, m$ — произвольное натуральное число) моделей также не увенчалась успехом.

Рассмотрим частный случай неразличимости димерной и бесконечномерной моделей, т. е. когда $n=2, m=\infty$. Подстановка этих значений в уравнения (3.30) дает:

$$\begin{array}{l} Z_2 = x_{1(D)} + K_2 x_{1(D)}^2, \quad Z_\infty = \frac{x_{1(\infty)}}{1 - K_\infty x_{1(\infty)}} \\ \left\{ \begin{array}{l} 2K_2 x_{1(D)}^2 = \frac{K_\infty x_{1(\infty)}^2}{(1 - K_\infty x_{1(\infty)})^2} \\ x_{1(D)} + 2K_2 x_{1(D)}^2 = \frac{x_{1(\infty)}}{(1 - K_\infty x_{1(\infty)})^2} \end{array} \right. . \end{array} \quad (3.31)$$

Система (3.31) сводится к одному уравнению $x_{1(D)} = \frac{x_{1(\infty)}}{1 - K_\infty x_{1(\infty)}}$. Подстанов-

ка этого выражения в первое уравнение системы (3.31) дает $2K_2 = K_\infty$, что совпа-

дает с условием неразличимости димерной и бесконечномерной моделей, рассмотренным выше. Итак, можно констатировать, что причина неразличимости димерной и бесконечномерной моделей определяется частным решением общей системы уравнений (3.30), описывающих эффект неразличимости.

Анализируя проведенные выше выкладки, можно ответить на несколько ключевых вопросов, касающихся выбора модели самоассоциации БАС.

Вопрос 1. *Существует ли способ разрешить проблему неразличимости моделей самоассоциации?*

Если димерная и бесконечномерная модели самоассоциации являются неразличимыми, то можно ли задать условие, при котором порядок агрегации в растворе превышает два? Общий ответ на этот вопрос заключается в следующем: любой подход или модель, применяемые для исследования процесса самоассоциации и характеризующиеся системой уравнений, отличающейся от системы (3.30), в принципе может снять проблему неразличимости. Рассмотрим это утверждение более предметно. Система (3.30) была составлена из двух независимых друг от друга уравнений (3.26) и (3.28). Закон сохранения массы (3.28) не зависит от используемого экспериментального метода, следовательно, поиск решения проблемы неразличимости должен быть связан, прежде всего, с экспериментально наблюдаемым параметром ξ , записанным в уравнении (3.26). В свою очередь, уравнение (3.26) основывается на двух базовых допущениях, а именно: аддитивности параметра ξ (см. выражение (3.21)) и приближении модели «ближайшего соседа». Отсюда следует, что любая модель, не использующая какое-либо из этих двух предположений, в принципе может снять проблему неразличимости, и это по своей сути указывает на способ разрешения проблемы неразличимости. Однако большинство широко используемых экспериментальных методов для изучения молекулярной агрегации, таких как ЯМР-спектроскопия, спектрофотометрия, микрокалориметрия, все же приводят к уравнениям типа (3.30) и, следовательно, всегда будут давать одинаковое качество аппроксимации экспериментальных данных как с помощью димерной, так и с помощью бесконечномерной моделей.

Поэтому, в частности, использующийся экспериментальный метод не может быть критерием выбора между моделями.

Вопрос 2. *Систематическое отличие равновесной константы и экспериментально наблюдаемого параметра в ЕК-моделях.*

Множитель $\frac{n}{n-1}$, входящий в уравнения (3.25), (3.26) и (3.30), имеет смысл коэффициента, приводящего к систематическому отличию величины $\xi_n^{(d)}$ как следствие выбора той или иной модели. Если экспериментальная кривая титрования $\xi(x_0)$ измеряется в широком диапазоне концентраций, соответствующем n -мерной агрегации, то величину этого отличия можно оценить с помощью уравнения (3.25). Это означает, что сравнение результатов численного анализа самоассоциации с использованием различных n -мерных ЕК-моделей всегда будет выявлять систематические отличия не только равновесной константы K_n , но и параметра $\xi_n^{(d)}$. Данная особенность n -мерных ЕК-моделей описана нами впервые. Частным случаем такого различия является разница в два раза между величинами $(\xi_\infty^{(d)} - \xi_\infty^{(m)})$ и $(\xi_D^{(d)} - \xi_D^{(m)})$, более подробно описанная выше при сравнении димерной и бесконечномерной моделей. Этому факту уделялось мало внимания в большинстве предыдущих публикаций, касающихся количественного анализа самоассоциации с помощью различных методов и моделей. Например, энтальпия димеризации в микрокалориметрии или магнитное экранирование в димере в ЯМР-спектроскопии всегда будет в два раза выше при использовании димерной модели по сравнению с использованием бесконечномерной модели при полностью идентичном качестве аппроксимации экспериментальных данных.

Вопрос 3. *Является ли корректным критерий концентрационного диапазона при выборе модели самоассоциации?*

Уравнения (3.19), (3.20) и (3.30) не содержат в себе общую концентрацию БАС x_0 , следовательно, неразличимость n -мерных ЕК-моделей самоассоциации сохраняется при любой концентрации. Это, в свою очередь, ставит под сомнение общепринятый критерий низких или высоких концентраций для использования

соответственно димерной или бесконечномерной моделей в численном анализе экспериментальных данных. Этот вывод можно переформулировать следующим образом. Допустим, что исследователь имеет дело с концентрацией молекул 10^{-12} моль/л, равновесная константа агрегации которых невелика, например, $K = 10$ л/моль. Допустим при этом, что нет никакой дополнительной информации о способе агрегации этих молекул. Существующая парадигма выбора между димерной и бесконечномерной моделями формулируется следующим образом: «при таких низких концентрациях доля агрегатов с числом молекул, большим двух, незначительна, поэтому при анализе должна быть использована димерная модель агрегации». И наоборот, если равновесная константа достаточно велика (например, $K = 10^5$ л/моль), а концентрации вещества находятся в миллимолярном диапазоне, то существующая парадигма предполагает, что должна быть использована бесконечномерная модель, а не димерная. Оба утверждения неверны потому, что обе упомянутые модели формально эквивалентны при любой концентрации.

Вопрос 4. *Критерий выбора между димерной и бесконечномерной моделями.*

Выше было показано, что концентрационный критерий выбор между димерной и бесконечномерной моделями не является корректным. Тогда возникает вопрос о том, каков должен быть этот критерий. Ведь если димерная и бесконечномерная модели полностью взаимозаменяемы при условии $2K_2 = K_\infty$, то на практике для того чтобы сравнить результаты исследования с другими агрегирующими системами исследователь всегда может пересчитать величину K с помощью этого соотношения, допуская тем самым явный произвол в значении K . С другой стороны, важно знать, какое именно значение равновесной константы K (K_2 или K_∞) соответствует реальной энергетике ассоциации.

Важно понимать, что неразличимость димерной и бесконечномерной моделей проявляется только на уровне аппроксимации экспериментальных данных (когда идентичны значения функции невязки между теоретическими и экспериментальными значениями ξ в уравнениях (3.19), (3.20)), и никак не связана с самим процессом агрегации. Следствием выбора димерной модели является введе-

ние ограничения процесса агрегации образованием в растворе лишь димеров, что эквивалентно введению бесконечно сильной антикооперативности процесса ассоциации, проявляющейся в виде систематического отклонения параметров K_n и $\xi_{d(n)}$. Таким образом, выбор димерной модели оправдан только в том случае, если исследователь обладает априорными знаниями о способах ассоциации молекул исследуемого вещества, т.е. о том, что молекулы этого вещества присутствуют в растворе либо в мономерной форме, либо в составе димеров. Если же таких данных нет либо вероятность n -меризации молекул в растворе не может быть исключена, например, из стерических соображений, то при любой концентрации для описания экспериментальных данных должна быть использована бесконечномерная модель самоассоциации.

Типичным случаем применения этого критерия является исследование ассоциации плоских ароматических БАС [1], которые обычно не содержат сильно разветвленных боковых цепей, потенциально могущих затруднять образование агрегатов, длиной больших двух; однако в многочисленных приложениях в течение последних семидесяти лет ассоциация таких молекул описывалась как с помощью димерной, так и с помощью бесконечномерной моделей. Следовательно, можно сделать вывод, что при исследовании ассоциации ароматических БАС должна всегда использоваться бесконечномерная, а не димерная модель самоассоциации. Другим примером является образование линейных ленточных агрегатов, которые формально могут образовывать неограниченные по длине олигомеры [185], т.е. использование бесконечномерной модели в данном случае очевидно.

В целом можно заключить, что если не существует прямых экспериментальных данных, то выбор между бесконечномерной и димерной моделями в каждом конкретном случае должен в значительной степени определяться структурными особенностями молекул и отчасти опытом исследователя [186], а не концентрациями растворенного вещества или вида экспериментального метода.

Основные выводы данного подраздела можно распространить и на случай линейной гетероассоциации ароматических БАС в растворе, тем более, что про-

блема выбора между моделями ограниченной и неограниченной ассоциации также возникает и при рассмотрении нековалентных взаимодействий разнотипных молекул [187]. Модели равновесной гетероассоциации основываются на том же наборе физических предположений, что и модели самоассоциации [188], поэтому аналогичный подход к выбору модели в принципе может быть применен и по отношению к гетероассоциации, по крайней мере, для типичных ароматических молекул-интерцепторов, не содержащих разветвленных боковых цепей. Таким образом, и в случае гетероассоциации БАС — Интерцептор концентрационный критерий не должен использоваться при выборе модели, и в общем случае должна использоваться бесконечномерная модель гетероассоциации.

Данное выше обоснование энтропийной выгоды последовательной агрегации и необходимости снятия ограничения на длину образующихся комплексов молекул-интерцепторов дает физический базис для разработки общей модели гетероассоциации.

3.2. Статистико-термодинамические подходы к описанию молекулярной гетероассоциации

В общем случае все модели одномерной (линейной) агрегации, каковой является ассоциация ароматических БАС-интерцепторов, можно классифицировать по числу типов молекул, присутствующих в растворе и взаимодействующих между собой. Так, если в системе присутствует один тип молекул, то говорят о само- (или гомо-) ассоциации (см., например, [173]), если N типов молекул — то N -компонентной гетероассоциации (см., например, [134,189]).

Поиск параметров динамического равновесия (константы само- и гетероассоциации, а также концентрации компонентов молекулярной системы с учетом образования всех возможных комплексов), соответствующих некоторому наблюдаемому в произвольном эксперименте параметру, является основной задачей статистико-термодинамического моделирования молекулярной гетероассоциации [188,192]. Это обусловлено тем, что только наличие такого соответствия позволя-

ет наиболее полно описать динамическое равновесие как отклик системы на действие внутренних и внешних факторов [192].

К настоящему времени тщательно разработанными и апробированными моделями линейной нековалентной некооперативной гетероассоциации, не считая ЕК-модели самоассоциации [165], являются модели двухкомпонентных систем, когда $N = 2$ [192]. В их основе лежат три основных физических допущения: закон сохранения массы, закон действия масс и независимость константы комплексообразования от размера агрегата [165]. В работах [188,192] дана следующая классификация моделей линейной гетероассоциации по способу математического описания:

- *алгебраический подход* для описания двухкомпонентной гетероассоциации наиболее полно представлен в работах [57,58,152]. Суть подхода состоит в последовательном переборе всех комплексов в системе при бесконечномерной агрегации, сумма которых образует большую статистическую сумму, из которой далее могут быть получены все необходимые термодинамические характеристики распределения молекулярных комплексов [58,62].
- Ключевыми объектами *матричного подхода* [190] являются матрицы равновесных констант ассоциации и мономерных концентраций компонентов системы. Сумма элементов степеней этих матриц дает совокупность всех возможных типов молекулярных комплексов в системе, вклад которых в суммарное динамическое равновесие рассчитывается методами матричной алгебры. Этот подход во многом схож с формализмом ТМ и SGF (см. раздел 2) [161,163,164].
- При использовании *алгоритмического подхода* [134,189,191] все возможные молекулярные комплексы генерируются специальным компьютерным алгоритмом (*N-STOCH*), с помощью которого вычисляются концентрации комплексов каждого типа и сопоставляются затем с экспериментально наблюдаемым параметром. Алгоритмический подход, в отличие от двух предыдущих, не требует знания аналитических выражений для ключевых уравнений модели. Этот подход ранее был использован при изучении *N*-

компонентных систем взаимодействующих БАС [134,189], предсказания специфической растворимости в трехкомпонентных системах [69,70], а также при анализе кооперативных эффектов в двухкомпонентных системах [192].

Однако модели, выведенные к настоящему времени с помощью перечисленных подходов, обладают двумя существенными недостатками:

- 1) некорректный учет так называемых «отраженных» комплексов, т.е. физически идентичных зеркально симметричных относительно друг друга комплексов, образующихся при бесконечномерной агрегации (более подробное обсуждение этой проблемы см. в работах [187,188]);
- 2) приближенный учет так называемых «краевых эффектов», т.е. зависимости экспериментально измеряемого молекулярного параметра от типа соседних молекул в комплексе (см. подробное обсуждение проблемы в [187]).

Обе проблемы уже давно решены для однокомпонентной самоассоциации (т.е. ЕК-модели, в качестве обзора см. [165]) и сравнительно недавно — для двухкомпонентной гетероассоциации [188,193]. Для многокомпонентных систем наиболее подходящими способами решения этих проблем являются алгоритмический подход [134,189], формализм трансфер-матриц (ТМ) [190] и формализм производящих последовательность функций (SGF) [194,195]. Однако модели, выведенные в процитированных работах, являются неполными. Так, в работе [190] не учтены «отраженные» комплексы, что не дает возможности, в свою очередь, правильно учесть и экспериментально наблюдаемый параметр, а в работе [194] хотя и дан полный учет «отраженных» комплексов, отсутствует связь концентраций компонентов молекулярной системы с экспериментально наблюдаемым параметром.

Таким образом, необходимостью является создание обобщенной статистико-термодинамической модели взаимодействий в системе из N различных типов молекул, учитывающей образование молекулярных комплексов произвольного состава и длины в соответствии с отмеченными ранее особенностями линейной молекулярной ассоциации (термодинамическая выгодность последовательной аг-

регации и выбор бесконечномерной модели агрегации). Данная модель многокомпонентной гетероассоциации была опубликована нами в работах [196-199].

3.3. Вывод модели многокомпонентной гетероассоциации [196]

3.3.1. Вывод большой статистической суммы с использованием формализма ТМ

Рассмотрим систему, состоящую из молекул N различных типов. Введем статистический вес молекулы j -го типа $K_{ij}C_j$, которая находится в непосредственном контакте с молекулой i -го типа в пределах агрегата. Произведения подобного рода, упорядоченные в $N \times N$ матрице, дают трансфер-матрицу \mathbf{M} ,

$$\mathbf{M} = \begin{pmatrix} K_{11}C_1 & K_{12}C_2 & \cdots & K_{1N}C_N \\ K_{21}C_1 & K_{22}C_2 & \cdots & K_{2N}C_N \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ K_{N1}C_1 & K_{N2}C_2 & \cdots & K_{NN}C_N \end{pmatrix}, \quad (3.32)$$

имеющую тот же смысл, что и матрица \mathbf{W} в выражении (2.6).

Как отмечалось выше, возведение матрицы \mathbf{M} в степень $n-1$ позволяет перебрать все возможные комбинации n молекул N различных типов в n -мере. Следовательно, согласно (2.6) статистическая сумма n -мера принимает вид

$$Z_n = \mathbf{c}\mathbf{M}^{n-1}\mathbf{1}^T. \quad (3.33)$$

где векторы $\mathbf{c} = (C_1 \ C_2 \ \dots \ C_N)$ и $\mathbf{1} = (1 \ 1 \ \dots \ 1)$ соответствуют векторам \mathbf{u} и \mathbf{v} в выражении (2.6).

Далее, уравнение (3.33) может быть использовано для получения большой статистической суммы N -компонентной системы:

$$\Xi = \sum_{n=1}^{\infty} Z_n = \sum_{n=1}^{\infty} \mathbf{c}\mathbf{M}^{n-1}\mathbf{1}^T = \mathbf{c}(\mathbf{I} - \mathbf{M})^{-1}\mathbf{1}^T, \quad (3.34)$$

где \mathbf{I} — единичная матрица порядка N . Сворачивание бесконечной суммы в выражении (3.34) в обратную матрицу справедливо только в случае, когда спектральный радиус матрицы \mathbf{M} (наибольшее из ее собственных значений по модулю)

лю) меньше единицы [200]. Однако это условие всегда выполняется, поскольку мономерные концентрации в векторе \mathbf{c} определяются из закона сохранения массы, которое, в свою очередь, выступает в роли физического ограничения бесконечной геометрической прогрессии в уравнении (3.34).

Большая статистическая сумма (3.34) содержит статистические веса всех возможных комплексов, формирующихся в растворе, т.е. учитывает все возможные перестановки молекул различных типов. Весь набор этих комплексов содержит также зеркально симметричные, «отраженные», комплексы (например, $C_i K_{ij} C_j K_{ji} C_i K_{ii} C_i$ и $C_i K_{ii} C_i K_{ij} C_j K_{ji} C_i$; рисунок 3.1) [187-189].

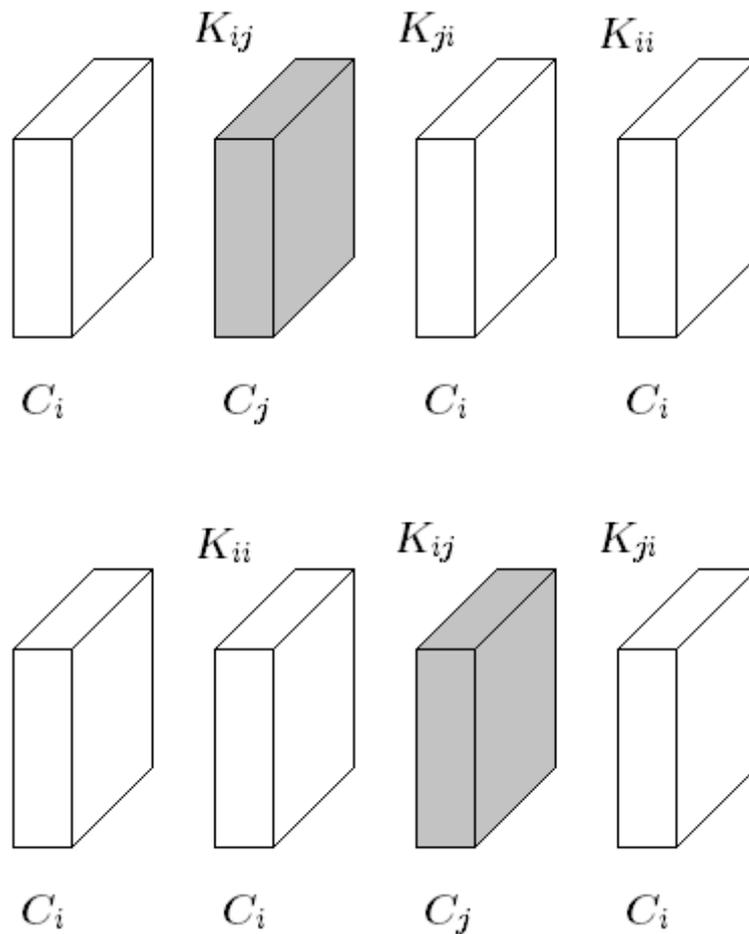


Рисунок 3.1. Схематическое изображение пары «отраженных» комплексов-тетрамеров

При условии равенства равновесных констант $K_{ij} = K_{ji}$ они становятся физически неразличимыми. Этот случай наиболее часто встречается при рассмотрении одномерной гетероассоциации в растворе (учет различимости, т.е. когда $K_{ij} \neq K_{ji}$,

используется крайне редко и был дан, например, в работе [192] для двухкомпонентных систем, при этом он зависит от характерных особенностей комплексообразования молекул типов i и j). По этой причине необходимо вывести большую статистическую сумму с учетом неразличимости «отраженных» комплексов.

Принимая во внимание, что «отраженные» комплексы являются физически эквивалентными, скорректируем большую статистическую сумму (3.34) аналогично тому, как это было сделано для двухкомпонентных систем [187,188,193]:

$$\Xi_{\text{corr}} = \frac{\Xi + \Xi_{\text{symm}}}{2}, \quad (3.35)$$

где Ξ_{symm} — статистическая сумма симметричных относительно своего геометрического центра комплексов (например, $C_j K_{ji} C_i K_{ii} C_i K_{ij} C_j$ или $C_i K_{ij} C_j K_{ji} C_i$).

Для того чтобы получить Ξ_{symm} введем вспомогательные матрицы:

$$\mathbf{M}_s = \begin{pmatrix} K_{11}C_1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & K_{22}C_2 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & K_{NN}C_N \end{pmatrix}, \quad (3.36)$$

$$\mathbf{M}_d = \mathbf{M} \circ \mathbf{M} = \begin{pmatrix} K_{11}^2 C_1^2 & K_{12}^2 C_2^2 & \dots & K_{1N}^2 C_N^2 \\ K_{21}^2 C_1^2 & K_{22}^2 C_2^2 & \dots & K_{2N}^2 C_N^2 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ K_{N1}^2 C_1^2 & K_{N2}^2 C_2^2 & \dots & K_{NN}^2 C_N^2 \end{pmatrix}. \quad (3.37)$$

где знак ‘ \circ ’ означает адамарово произведение (поэлементное умножение двух матриц) [201]. Возведение матрицы \mathbf{M}_d в степень $n-1$ дает статистическую сумму двух «половин» симметричных комплексов общей длиной $2(n-1)$. Учитывая, что в центре симметрии может находиться мономер (рисунок 3.2а) или гомодимер (рисунок 3.2б), состоящий из молекул определенного типа, статистическая сумма n -мера с поправкой на «отраженные» комплексы примет вид:

$$Z_{n,\text{symm}} = \mathbf{c} \mathbf{M}_d^{n-1} \mathbf{1}^T + \mathbf{c} \mathbf{M}_s \mathbf{M}_d^{n-1} \mathbf{1}^T = \mathbf{c} (\mathbf{I} + \mathbf{M}_s) \mathbf{M}_d^{n-1} \mathbf{1}^T. \quad (3.38)$$

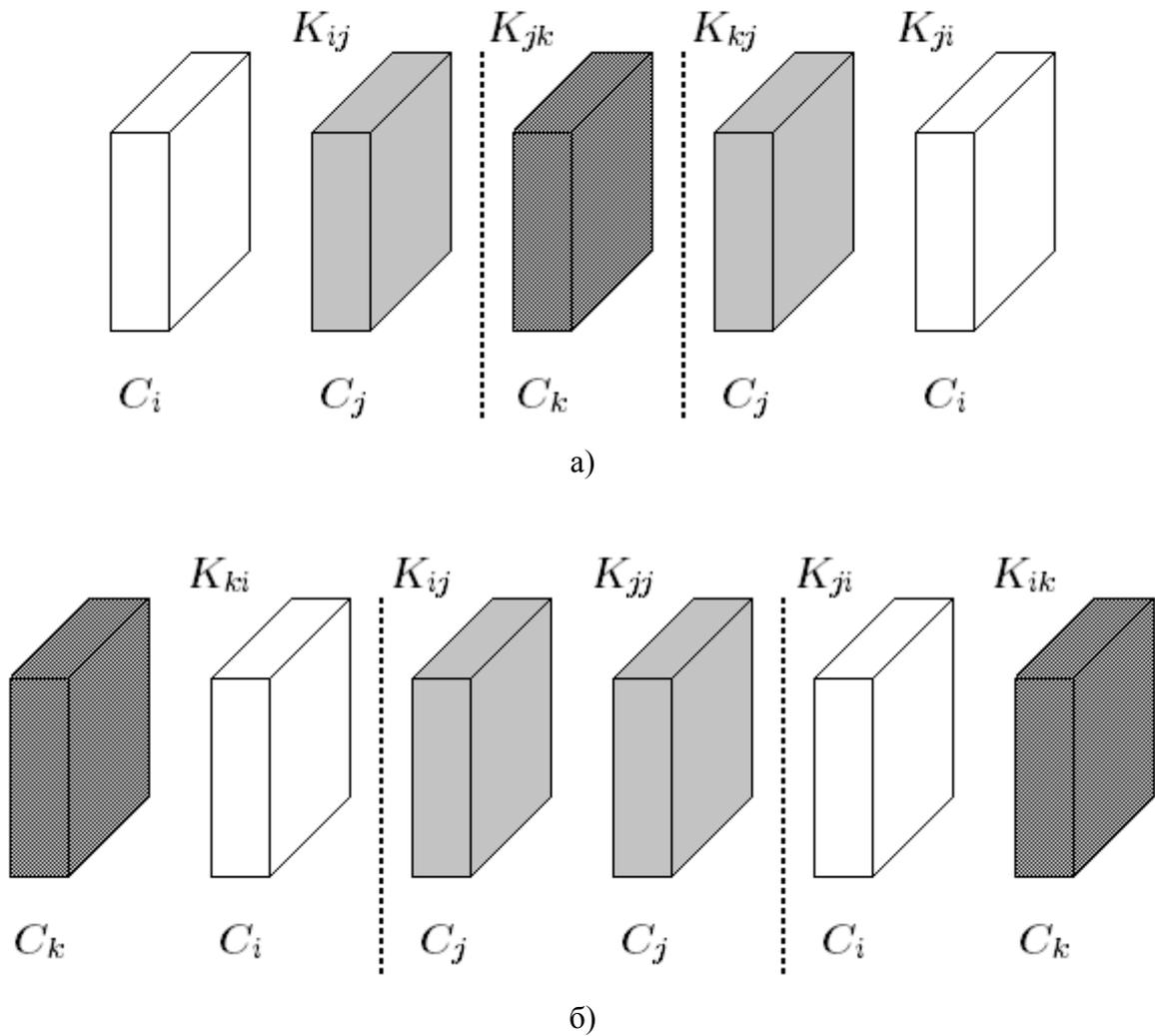


Рисунок 3.2. Схематическое изображение комплексов, симметричных относительно своего геометрического центра; пунктирными линиями выделены: центральный мономер (а) и центральный гомодимер (б) в комплексах

В выражении (3.38) вектор \mathbf{c} (или \mathbf{cM}_s) содержит статистические веса центрального мономера (или димера) симметричного агрегата. Суммирование выражения (3.38) по n дает статистическую сумму симметричных комплексов:

$$\Xi_{\text{symm}} = \sum_{n=1}^{\infty} Z_{n,\text{symm}} = \sum_{n=1}^{\infty} \mathbf{c}(\mathbf{I} + \mathbf{M}_s) \mathbf{M}_d^{n-1} \mathbf{1}^T = \mathbf{c}(\mathbf{I} + \mathbf{M}_s)(\mathbf{I} - \mathbf{M}_d)^{-1} \mathbf{1}^T. \quad (3.39)$$

Наконец, подстановка выражений (3.34) и (3.39) в выражение (3.35) позволяет получить скорректированную большую статистическую сумму N -компонентной системы:

$$\Xi_{\text{corr}} = \frac{1}{2} \mathbf{c} \left((\mathbf{I} - \mathbf{M})^{-1} + (\mathbf{I} + \mathbf{M}_s)(\mathbf{I} - \mathbf{M}_d)^{-1} \right) \mathbf{1}^T. \quad (3.40)$$

3.3.2. Вывод большой статистической суммы с использованием формализма SGF

Метод SGF, впервые предложенный Лифсоном [163] и позднее детально рассмотренный для полимерных цепей в работе [202], основан на представлении n -мера в качестве подпоследовательности элементов одинакового типа. Подпоследовательности задаются соответствующими производящими последовательность функциями. В контексте n -меров в настоящей работе эти подпоследовательности имеют смысл гомоагрегатов, состоящих из однотипных молекул, а SGF, использовавшиеся Лифсоном, — статистических сумм этих гомоагрегатов. Недавно в работе [194] был дан полный вывод большой статистической суммы N -компонентной системы Ξ_{cont} с учетом «отраженных» комплексов. С целью дальнейшего расширения этого результата повторим вкратце данный вывод с учетом обозначений, принятых в настоящей работе.

Статистический вес гомоагрегата, содержащего k молекул типа j , может быть записан в виде:

$$\zeta_j(k) = C_j (K_{jj} C_j)^{k-1}. \quad (3.41)$$

Следовательно, SGF гомоагрегатов, состоящих из молекул типа j , всех длин от единицы до бесконечности дается выражением

$$\gamma_j = \sum_{k=1}^{\infty} \zeta_j(k) = C_j \sum_{k=1}^{\infty} (K_{jj} C_j)^{k-1} = \frac{C_j}{1 - K_{jj} C_j}. \quad (3.42)$$

Величины $K_{ij} \gamma_j$, упорядоченные в $N \times N$ матрице, дают матрицу \mathbf{G} , аналогичную матрице \mathbf{W} из уравнения (2.6):

$$\mathbf{G} = \begin{pmatrix} 0 & K_{12} \gamma_2 & K_{13} \gamma_3 & \cdots & K_{1N} \gamma_N \\ K_{21} \gamma_1 & 0 & K_{23} \gamma_3 & \cdots & K_{2N} \gamma_N \\ K_{31} \gamma_1 & K_{32} \gamma_2 & 0 & \cdots & K_{3N} \gamma_N \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ K_{N1} \gamma_1 & K_{N2} \gamma_2 & K_{N3} \gamma_3 & \cdots & 0 \end{pmatrix}. \quad (3.43)$$

Нули на главной диагонали являются следствием объединения двух соседних гомоагрегатов, состоящих из молекул одинакового типа, в один гомоагрегат, со-

стоящий из элементов того же типа. Это означает, что выражение $K_{jj}\gamma_j$ не имеет смысла в рамках подхода SGF.

Введем вектор γ , содержащий SGF гомоагрегатов, расположенных на краях n -мера:

$$\gamma = (\gamma_1 \quad \gamma_2 \quad \gamma_3 \quad \cdots \quad \gamma_N). \quad (3.44)$$

Таким образом, выражение $\gamma \mathbf{G}^{p-1} \mathbf{1}^T$ представляет собой сумму статистических функций всех возможных p гомоагрегатов, расположенных последовательно. Отсюда следует, что большую статистическую сумму, учитывающую все комбинации гомоагрегатов в пределах всех возможных комплексов, можно записать в виде

$$\Xi = \sum_{p=1}^{\infty} \gamma \mathbf{G}^{p-1} \mathbf{1}^T = \gamma (\mathbf{I} - \mathbf{G})^{-1} \mathbf{1}^T. \quad (3.45)$$

Выражение (3.45) аналогично выражению, полученному в работе [195] (уравнение (3.43)) применительно к связыванию лиганда с линейной решеткой (в этом случае выражение (3.43) содержит дополнительное слагаемое в виде единицы, соответствующее свободной решетке), что является следствием схожести подходов, используемых для вывода статистических сумм в этих двух работах.

Выражение (3.45) содержит тот же недостаток, что и выражение (3.34), т.е. переучет «отраженных» комплексов. Корректировка выражения (3.45) может быть выполнена методом, который был использован выше для корректировки Ξ в формализме ТМ на основе выражения (3.35).

Статистический вес симметричных гомоагрегатов, расположенных на обоих концах n -мера имеет вид:

$$\zeta_j^{(2)}(k) = C_j^2 (K_{jj}^2 C_j^2)^{k-1}. \quad (3.46)$$

Следовательно, SGF двух «половин» симметричного комплекса можно записать в виде

$$\gamma_j^{(2)} = \sum_{k=1}^{\infty} \zeta_j^{(2)}(k) = C_j^2 \sum_{k=1}^{\infty} (K_{jj}^2 C_j^2)^{k-1} = \frac{C_j^2}{1 - K_{jj}^2 C_j^2}. \quad (3.47)$$

Любой симметричный комплекс может состоять только из нечетного числа гомоагрегатов. Отсюда следует, что один из них всегда будет находиться в центре n -мера. Используя вектор γ из выражения (3.44) для представления центрального гомоагрегата и вводя матрицу \mathbf{G}_d в виде

$$\mathbf{G}_d = \begin{pmatrix} 0 & K_{12}^2 \gamma_2^{(2)} & K_{13}^2 \gamma_3^{(2)} & \cdots & K_{1N}^2 \gamma_N^{(2)} \\ K_{21}^2 \gamma_1^{(2)} & 0 & K_{23}^2 \gamma_3^{(2)} & \cdots & K_{2N}^2 \gamma_N^{(2)} \\ K_{31}^2 \gamma_1^{(2)} & K_{32}^2 \gamma_2^{(2)} & 0 & \cdots & K_{3N}^2 \gamma_N^{(2)} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ K_{N1}^2 \gamma_1^{(2)} & K_{N2}^2 \gamma_2^{(2)} & K_{N3}^2 \gamma_3^{(2)} & \cdots & 0 \end{pmatrix} \quad (3.48)$$

можно получить скорректированную статистическую сумму симметричных комплексов:

$$\Xi_{\text{symm}} = \sum_{p=1}^{\infty} \gamma \mathbf{G}_d^{p-1} \mathbf{1}^T = \gamma (\mathbf{I} - \mathbf{G}_d)^{-1} \mathbf{1}^T. \quad (3.49)$$

Окончательная большая статистическая сумма N -компонентной системы может быть получена путем подстановки выражений (3.45) и (3.49) в выражение (3.35):

$$\Xi_{\text{corr}} = \frac{1}{2} \gamma \left[(\mathbf{I} - \mathbf{G})^{-1} + (\mathbf{I} - \mathbf{G}_d)^{-1} \right] \mathbf{1}^T \quad (3.50)$$

3.3.3. Сравнение больших статистических сумм, полученных с использованием подходов ТМ и SGF

Покажем, что большие статистические суммы Ξ_{corr} , полученные с использованием ТМ (выражение (3.40)) и SGF (выражение (3.50)) методов идентичны. Для того чтобы это осуществить, необходимо ввести вспомогательные матричные объекты, которые также будут использованы в дальнейшем для получения экспериментально наблюдаемых параметров:

$$\mathbf{K} = \begin{pmatrix} K_{11} & K_{12} & \cdots & K_{1N} \\ K_{21} & K_{22} & \cdots & K_{2N} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ K_{N1} & K_{N2} & \cdots & K_{NN} \end{pmatrix}, \quad \Delta_c = \begin{pmatrix} C_1 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & C_2 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & C_N \end{pmatrix}. \quad (3.51)$$

Матрица \mathbf{K} в выражении (3.51) может быть представлена в виде суммы двух матриц, $\mathbf{K} = \mathbf{K}_h + \mathbf{K}_s$, где

$$\mathbf{K}_h = \begin{pmatrix} 0 & K_{12} & \cdots & K_{1N} \\ K_{21} & 0 & \cdots & K_{2N} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ K_{N1} & K_{N2} & \cdots & 0 \end{pmatrix}, \quad \mathbf{K}_s = \begin{pmatrix} K_{11} & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & K_{22} & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & K_{NN} \end{pmatrix}. \quad (3.52)$$

Если ввести еще один матричный объект

$$\mathbf{K}_d = \mathbf{K}^T \circ \mathbf{K} = \mathbf{K} \circ \mathbf{K}, \quad (3.53)$$

то можно переписать матрицы, использованные при выводе большой статистической суммы Ξ_{corr} методом ТМ, следующим образом:

$$\mathbf{c} = \mathbf{1}\Delta_c, \quad \mathbf{M} = \mathbf{K}\Delta_c, \quad \mathbf{M}_d = (\mathbf{K}^T \Delta_c) \circ (\mathbf{K}\Delta_c) = \mathbf{K}_d \Delta_c^2, \quad \mathbf{M}_s = \mathbf{K}_s \Delta_c. \quad (3.54)$$

Подставляя выражения (3.54) в уравнение (3.40), получим Ξ_{corr} в виде:

$$\Xi_{\text{corr}} = \frac{1}{2} \mathbf{1} \left[(\Delta_c^{-1} - \mathbf{K})^{-1} + (\Delta_c^{-1} + \mathbf{K}_s)(\Delta_c^{-2} - \mathbf{K}_d)^{-1} \right] \mathbf{1}^T. \quad (3.55)$$

Для того чтобы выполнить преобразование большой статистической суммы Ξ_{corr} , полученной методом SGF, необходимо ввести дополнительные матрицы:

$$\Delta_\gamma = \begin{pmatrix} \gamma_1 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \gamma_2 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & \gamma_N \end{pmatrix}, \quad \Delta_\gamma^{(2)} = \begin{pmatrix} \gamma_1^{(2)} & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \gamma_2^{(2)} & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & \gamma_N^{(2)} \end{pmatrix}, \quad (3.56)$$

которые позволяют переписать формально определенные матрицы в виде $\gamma = \mathbf{1}\Delta_\gamma$,

$$\mathbf{G} = \mathbf{K}_h \Delta_\gamma, \quad \mathbf{G}_d = (\mathbf{K}_d - \mathbf{K}_s^2) \Delta_\gamma^{(2)}.$$

Следовательно, выражение (3.50) принимает вид

$$\Xi_{\text{corr}} = \frac{1}{2} \mathbf{1} \left[(\Delta_\gamma^{-1} - \mathbf{K}_h)^{-1} + (\Delta_\gamma^{-1} - (\mathbf{K}_d - \mathbf{K}_s^2) \Delta_\gamma^{(2)} \Delta_\gamma^{-1})^{-1} \right] \mathbf{1}^T. \quad (3.57)$$

Легко показать, что

$$\Delta_\gamma = \Delta_c (\mathbf{I} - \mathbf{K}_s \Delta_c)^{-1} = (\Delta_c^{-1} - \mathbf{K}_s)^{-1} \quad (3.58)$$

и

$$\Delta_{\gamma}^{(2)} = \Delta_C (\mathbf{I} + \mathbf{K}_S \Delta_C)^{-1} \Delta_C (\mathbf{I} - \mathbf{K}_S \Delta_C)^{-1} = (\Delta_C^{-1} + \mathbf{K}_S)^{-1} (\Delta_C^{-1} - \mathbf{K}_S)^{-1}. \quad (3.59)$$

Подставляя выражения (3.58) и (3.59) в (3.57) и проводя необходимые преобразования, можно получить выражение, идентичное (3.55):

$$\begin{aligned} \Xi_{\text{corr}} &= \frac{1}{2} \mathbf{1} \left[(\Delta_C^{-1} - \mathbf{K}_S - \mathbf{K}_h)^{-1} + \left(\Delta_C^{-1} - \mathbf{K}_S - (\mathbf{K}_d - \mathbf{K}_S^2) (\Delta_C^{-1} + \mathbf{K}_S)^{-1} \right)^{-1} \right] \mathbf{1}^T \\ &= \frac{1}{2} \mathbf{1} \left[(\Delta_C^{-1} - \mathbf{K})^{-1} + (\Delta_C^{-1} + \mathbf{K}_S) \left((\Delta_C^{-1} - \mathbf{K}_S) (\Delta_C^{-1} + \mathbf{K}_S) - (\mathbf{K}_d - \mathbf{K}_S^2) \right)^{-1} \right] \mathbf{1}^T. \quad (3.60) \\ &= \frac{1}{2} \mathbf{1} \left[(\Delta_C^{-1} - \mathbf{K})^{-1} + (\Delta_C^{-1} + \mathbf{K}_S) (\Delta_C^{-2} - \mathbf{K}_d)^{-1} \right] \mathbf{1}^T \end{aligned}$$

Итак, запись выражений (3.40) и (3.50) с учетом матриц (3.51) приводит к одинаковым выражениям для Ξ_{corr} , что доказывает полную эквивалентность ТМ и SGF подходов при описании молекулярной гетероассоциации в N -компонентных системах.

Знание Ξ_{corr} позволяет получить равновесные параметры взаимодействия молекул в растворе, основываясь на формализме статистических сумм, который уже не связан ни с ТМ, ни с SGF подходами. Ключевой особенностью применения формализма статистических сумм к N -компонентной системе, подробно описанной в работах других авторов, является необходимость дифференцирования скалярной функции по матрице. Далее мы выведем все необходимые выражения, позволяющие установить связь между экспериментально наблюдаемыми параметрами и молекулярным равновесием в растворе с помощью большой статистической суммы Ξ_{corr} , полученной с использованием подхода ТМ (выражение (3.40)), который в отличие от подхода SGF является более удобным с точки зрения непосредственного применения в вычислительной процедуре в матрично-ориентированном программном обеспечении.

3.3.4. Вывод выражения для закона сохранения массы

Общие концентрации молекул в растворе C_{0i} всегда известны исследователю, поэтому они могут быть использованы в качестве граничного условия при по-

лучении равновесных параметров молекулярного комплексообразования из экспериментальных кривых титрования. Общие концентрации C_{0i} могут быть найдены путем дифференцирования большой статистической суммы (3.40) по натуральному логарифму соответствующих мономерных концентраций C_i [152,188]. В матричном представлении это может быть записано в виде дифференцирования скалярной функции по матрице:

$$\Lambda_T = \frac{\partial \Xi_{\text{corr}}}{\partial \tilde{\Lambda}_C}, \quad (3.61)$$

где Λ_T и $\tilde{\Lambda}_C$ — диагональные $N \times N$ матрицы, содержащие на главных диагоналях соответственно элементы C_{0i} и $\ln C_i$.

В общем случае большая статистическая сумма (3.40) может быть представлена в виде

$$\Xi_{\text{corr}} = \frac{1}{2} \mathbf{1} \mathbf{F} \mathbf{1}^T, \quad (3.62)$$

где $\mathbf{F} = \mathbf{F}(\Lambda_C, \mathbf{K}, \mathbf{K}_s, \mathbf{K}_d)$ — матричная функция матричных переменных Λ_C , \mathbf{K} , \mathbf{K}_s , \mathbf{K}_d . В рамках настоящей работы необходимо найти аналитическую форму записи частных производных большой статистической суммы (3.62) по $N \times N$ матрицам $\tilde{\Lambda}_C$ и $\tilde{\mathbf{K}}$, содержащим натуральные логарифмы соответствующих элементов матриц Λ_C и \mathbf{K} . Например, частная производная Ξ_{corr} по $\tilde{\Lambda}_C$ может быть записана следующим образом:

$$\frac{\partial \Xi_{\text{corr}}}{\partial \tilde{\Lambda}_C} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \mathbf{1}}{\partial \tilde{\Lambda}_C} \mathbf{F} \mathbf{1}^T + \mathbf{1} \frac{\partial \mathbf{F}}{\partial \tilde{\Lambda}_C} \mathbf{1}^T + \mathbf{1} \mathbf{F} \frac{\partial \mathbf{1}^T}{\partial \tilde{\Lambda}_C} \right). \quad (3.63)$$

Производные $\frac{\partial \mathbf{1}}{\partial \tilde{\Lambda}_C}$ и $\frac{\partial \mathbf{1}^T}{\partial \tilde{\Lambda}_C}$, умноженные соответственно на вектора $\mathbf{F} \mathbf{1}^T$ и $\mathbf{1} \mathbf{F}$ да-

ют $N \times N$ нулевые матрицы. Следовательно,

$$\frac{\partial \Xi_{\text{corr}}}{\partial \tilde{\Lambda}_C} = \frac{1}{2} \mathbf{1} \frac{\partial \mathbf{F}}{\partial \tilde{\Lambda}_C} \mathbf{1}^T. \quad (3.64)$$

Перепишем выражение (3.64) в развернутом виде согласно выражениям (3.54) и (3.61):

$$\Delta_T = \frac{1}{2} \mathbf{1} \left[\begin{array}{l} (\mathbf{I} - \Delta_C \mathbf{K})^{-1} \frac{\partial \Delta_C}{\partial \tilde{\Delta}_C} (\mathbf{I} - \mathbf{K} \Delta_C)^{-1} - \Delta_C^{-1} \frac{\partial \Delta_C}{\partial \tilde{\Delta}_C} \Delta_C (\mathbf{I} - \mathbf{K}_d \Delta_C^2)^{-1} \\ + (\mathbf{I} + \mathbf{K}_s \Delta_C) (\mathbf{I} - \mathbf{K}_d \Delta_C^2)^{-1} \frac{\partial \Delta_C}{\partial \tilde{\Delta}_C} (\mathbf{I} - \mathbf{K}_d \Delta_C^2)^{-1} \\ + \Delta_C^{-1} (\mathbf{I} + \mathbf{K}_s \Delta_C) (\mathbf{I} - \Delta_C^2 \mathbf{K}_d)^{-1} \frac{\partial \Delta_C}{\partial \tilde{\Delta}_C} \Delta_C (\mathbf{I} - \mathbf{K}_d \Delta_C^2)^{-1} \end{array} \right] \mathbf{1}^T. \quad (3.65)$$

Фактически выражение (3.65) является суммой матричных произведений типа $\mathbf{a} \frac{\partial \Delta_C}{\partial \tilde{\Delta}_C} \mathbf{b}^T$, где \mathbf{a}, \mathbf{b} — определенные $1 \times N$ вектора. Рассмотрим это произведение в общем виде:

$$\mathbf{a} \frac{\partial \Delta_C}{\partial \tilde{\Delta}_C} \mathbf{b}^T = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N a_i \frac{\partial \|\Delta_C\|_{ij}}{\partial \tilde{\Delta}_C} b_j = \sum_{i=1}^N a_i \mathbf{1}_i^T \mathbf{1}_i b_i \|\Delta_C\|_{ii} = (\mathbf{a}^T \mathbf{b}) \circ \Delta_C. \quad (3.66)$$

Таким образом, выражение (3.66) позволяет переписать (3.65) в форме

$$\Delta_T = \frac{1}{2} \left[\begin{array}{l} (\mathbf{I} - \mathbf{K} \Delta_C)^{-1} \mathbf{1}^T \mathbf{1} (\mathbf{I} - \Delta_C \mathbf{K})^{-1} \\ + (\mathbf{I} - \mathbf{K}_d \Delta_C^2)^{-1} \mathbf{1}^T \mathbf{1} \Delta_C (\mathbf{I} + \mathbf{K}_s \Delta_C) (\mathbf{I} - \mathbf{K}_d \Delta_C^2)^{-1} \Delta_C^{-1} \\ + \Delta_C (\mathbf{I} - \mathbf{K}_d \Delta_C^2)^{-1} \mathbf{1}^T \mathbf{1} \Delta_C (\mathbf{K}_s \Delta_C + \mathbf{K}_d \Delta_C^2) (\mathbf{I} - \mathbf{K}_d \Delta_C^2)^{-1} \Delta_C^{-2} \end{array} \right] \circ \Delta_C. \quad (3.67)$$

Здесь мы учли инвариантность Δ_T относительно операции транспонирования. Поскольку физически значимыми элементами матрицы Δ_T являются элементы, лежащие только на главной диагонали, выражение (3.67) принимает окончательный вид:

$$\Delta_T = \frac{1}{2} \left[\begin{array}{l} (\mathbf{I} - \mathbf{M})^{-1} \mathbf{1}^T \mathbf{1} \Delta_C (\mathbf{I} - \mathbf{M})^{-1} \\ + (\mathbf{I} - \mathbf{M}_d)^{-1} \mathbf{1}^T \mathbf{1} \Delta_C (\mathbf{I} + 2\mathbf{M}_s + \mathbf{M}_d) (\mathbf{I} - \mathbf{M}_d)^{-1} \end{array} \right]. \quad (3.68)$$

Выражение (3.68) представляет собой окончательную запись закона сохранения массы в N -компонентной системе в матричной форме.

3.3.5. Вывод выражения для экспериментально наблюдаемого параметра

Большинство известных моделей, описывающих многокомпонентное комплексообразование малых молекул, представляют экспериментально наблюдаемый параметр ξ_{0i} (молярный коэффициент поглощения в спектрофотометрии, химический сдвиг в ЯМР и т.д.) молекул i -го типа в виде аддитивной величины (см., например, [69,70,165,187-190,194,203]), которая может быть получена путем усреднения собственных параметров молекул $\xi_i^{(s)}$ по всем s типам комплексов (включая мономеры) с учетом количества последних в растворе, т.е. с учетом мольной доли $f_i^{(s)}$:

$$\xi_{0i} = \sum_s \xi_i^{(s)} f_i^{(s)}. \quad (3.69)$$

Перепишем (3.69) в развернутом виде:

$$\xi_{0i} = \sum_s \xi_i^{(s)} f_i^{(s)} = \xi_i^{(m)} f_i^{(m)} + \sum_{s \neq m} \xi_i^{(s)} f_i^{(s)} = \xi_i^{(m)} - \sum_{s \neq m} \Delta \xi_i^{(s)} f_i^{(s)}, \quad (3.70)$$

где $\xi_i^{(m)}$ — наблюдаемый параметр молекулы, находящейся в мономерном состоянии; $\Delta \xi_i^{(s)} = \xi_i^{(m)} - \xi_i^{(s)}$.

Как правило, при анализе одномерной гетероассоциации используется приближение «ближайшего соседа», в рамках которого предполагается, что только ближайšie молекулы (т.е. находящиеся в непосредственном контакте с молекулой i -го типа в комплексе) влияют на ξ_{0i} этой молекулы (см., например, работы [165,187,188,190]). В рамках одномерной гетероассоциации вариантов такого влияния всего два:

- 1) только один из ближайших соседей влияет на ξ_{0i} (используется, например, в работе [190], и обычно называется как агрегация по типу «голова — хвост» или «голова — голова»);
- 2) оба ближайших соседа влияют на ξ_{0i} (используется, например, в работах [165,187,188] и обычно называется как агрегация по типу «сэндвича»).

Для того чтобы различить эти случаи введем параметр $t \in 1, 2$, значение которого равно числу соседей данной молекулы. Пусть ξ_{ij} — экспериментально наблюдаемый параметр молекулы i -го типа, взаимодействующей с молекулой j -го типа (следуя определениям, данным в работе [188], при $i = j$ — это гомостык, при $i \neq j$ — гетеростык). Согласно приближению «ближайшего соседа» $\xi_i^{(s)}$ в выражении (3.70) представляется как определенная комбинация $\xi_i^{(m)}$ и ξ_{ij} [187]. Следовательно, экспериментально наблюдаемый параметр в выражении (3.70) можно записать в более определенной форме:

$$\xi_{0i} = \xi_i^{(m)} - \frac{t}{2} \left(\sum_{j=1}^N \Delta \xi_{ij} f_{ij}^{(d)} + \sum_{j=1}^N \Delta \xi_{ij} f_{ji}^{(d)} \right), \quad (3.71)$$

где $\Delta \xi_{ij} = \xi_i^{(m)} - \xi_{ij}$; величины $f_{ij}^{(d)}$ и $f_{ji}^{(d)}$ — это мольные доли соответственно i - j и j - i стыков. Они могут быть выражены через общие концентрации этих стыков, S_{ij}

и S_{ji} , как $f_{ij}^{(d)} = \frac{S_{ij}}{C_{0i}}$ и $f_{ji}^{(d)} = \frac{S_{ji}}{C_{0i}}$, которые, в свою очередь, могут быть получены

непосредственно из большой статистической суммы [152,188]:

$$S_{ij} = \frac{\partial \Xi_{\text{corr}}}{\partial \ln K_{ij}}, \quad S_{ji} = \frac{\partial \Xi_{\text{corr}}}{\partial \ln K_{ji}}. \quad (3.72)$$

Учитывая симметричность стыка относительно перестановки i и j , т. е. когда $K_{ij} = K_{ji}$, выражение (3.71) можно переписать в виде:

$$\xi_{0i} = \xi_i^{(m)} - \frac{t}{C_{0i}} \sum_{j=1}^N \Delta \xi_{ij} S_{ji}. \quad (3.73)$$

Дальнейшее обобщение выражения (3.73) в матричной форме требует введения следующих матричных объектов:

$$\xi_{\mathbf{m}} = \begin{pmatrix} \xi_1^{(m)} & \cdots & \xi_1^{(m)} \\ \vdots & & \vdots \\ \xi_N^{(m)} & \cdots & \xi_N^{(m)} \end{pmatrix}, \quad \xi = \begin{pmatrix} \xi_{11} & \cdots & \xi_{1N} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \xi_{N1} & \cdots & \xi_{NN} \end{pmatrix}, \quad \mathbf{S} = \frac{\partial \Xi_{\text{corr}}}{\partial \tilde{\mathbf{K}}}, \quad (3.74)$$

где $\tilde{\mathbf{K}}$ — матрица размером $N \times N$, содержащая натуральные логарифмы соответствующих элементов матрицы \mathbf{K} . Теперь выражение (3.73) принимает вид:

$$\xi_{0i} = \mathbf{1}_i \xi_m \mathbf{1}_i^T - t \mathbf{1}_i \Delta_T^{-1} (\xi_m^T \mathbf{1} - \xi) \mathbf{S} \mathbf{1}_i^T, \quad (3.75)$$

где $\mathbf{1}_i$ — $1 \times N$ вектор, содержащий нули за исключением единицы в i -м положении. Поскольку левая часть уравнения (3.75) равна i -му элементу на главной диагонали произвольной $N \times N$ матрицы, полный набор уравнений (3.75) может быть легко обобщен в виде матрицы:

$$\xi_0 = \xi_m - t \Delta_T^{-1} (\xi_m - \xi) \mathbf{S}, \quad (3.76)$$

где ξ_0 — $N \times N$ матрица, содержащая на главной диагонали экспериментально наблюдаемые параметры молекул всех типов.

Вывод матрицы \mathbf{S} подобен выводу матрицы Δ_T , описанному в предыдущем пункте, поскольку она состоит из частных производных вида

$$\frac{\partial \mathcal{E}_{\text{corr}}}{\partial \tilde{\mathbf{K}}} = \frac{1}{2} \mathbf{1} \frac{\partial \mathbf{F}}{\partial \tilde{\mathbf{K}}} \mathbf{1}^T. \quad (3.77)$$

Перепишем выражение (3.77) в развернутом виде с учетом выражений (3.74) аналогично тому, как это было сделано выше:

$$\mathbf{S} = \frac{1}{2} \mathbf{1} \left[\begin{array}{l} (\Delta_c^{-1} - \mathbf{K})^{-1} \frac{\partial \mathbf{K}}{\partial \tilde{\mathbf{K}}} (\Delta_c^{-1} - \mathbf{K})^{-1} + \frac{\partial \mathbf{K}_s}{\partial \tilde{\mathbf{K}}} (\Delta_c^{-2} - \mathbf{K}_d)^{-1} \\ + (\Delta_c^{-1} + \mathbf{K}_s) (\Delta_c^{-2} - \mathbf{K}_d)^{-1} \frac{\partial \mathbf{K}_d}{\partial \tilde{\mathbf{K}}} (\Delta_c^{-2} - \mathbf{K}_d)^{-1} \end{array} \right] \mathbf{1}^T. \quad (3.78)$$

Определим частные производные, входящие в (3.78), в качестве примера беря выражение (3.66):

$$\left\{ \begin{array}{l} \mathbf{a} \frac{\partial \mathbf{K}}{\partial \tilde{\mathbf{K}}} \mathbf{b}^T = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N a_i \frac{\partial K_{ij}}{\partial \tilde{\mathbf{K}}} b_j = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N a_i \mathbf{1}_i^T \mathbf{1}_j b_j K_{ij} = (\mathbf{a}^T \mathbf{b}) \circ \mathbf{K} \\ \mathbf{a} \frac{\partial \mathbf{K}_s}{\partial \tilde{\mathbf{K}}} \mathbf{b}^T = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N a_i \frac{\partial K_{ij}}{\partial \tilde{\mathbf{K}}} b_j = \sum_{i=1}^N a_i \mathbf{1}_i^T \mathbf{1}_i b_i K_{ii} = (\mathbf{a}^T \mathbf{b}) \circ \mathbf{K}_s \\ \mathbf{a} \frac{\partial \mathbf{K}_d}{\partial \tilde{\mathbf{K}}} \mathbf{b}^T = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N a_i \frac{\partial (K_{ij} K_{ji})}{\partial \tilde{\mathbf{K}}} b_j = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N a_i (\mathbf{1}_i^T \mathbf{1}_j + \mathbf{1}_j^T \mathbf{1}_i) b_j K_{ij} K_{ji} = \\ = (\mathbf{a}^T \mathbf{b} + \mathbf{b}^T \mathbf{a}) \circ \mathbf{K}_d \end{array} \right. \quad (3.79)$$

Необходимо отметить, что дифференцирование в выражениях (3.79) было проведено без потери общности, т.е. в предположении, что все матрицы несимметричные. Это обусловлено способом введения матрицы \mathbf{S} в выражениях (3.72). В част-

ности, дифференцирование матрицы \mathbf{K}_d было проведено согласно выражению (3.53). Применение выражений (3.79) к (3.78) дает

$$\mathbf{S} = \frac{1}{2} \left[\begin{aligned} & \left((\Delta_c^{-1} - \mathbf{K})^{-1} \mathbf{1}^T \mathbf{1} (\Delta_c^{-1} - \mathbf{K})^{-1} \right) \circ \mathbf{K} + \left(\mathbf{1}^T \mathbf{1} (\Delta_c^{-2} - \mathbf{K}_d)^{-1} \right) \circ \mathbf{K}_s \\ & + \left((\Delta_c^{-2} - \mathbf{K}_d)^{-1} (\Delta_c^{-1} + \mathbf{K}_s) \mathbf{1}^T \mathbf{1} (\Delta_c^{-2} - \mathbf{K}_d)^{-1} \right) \circ \mathbf{K}_d \\ & + \left((\Delta_c^{-2} - \mathbf{K}_d)^{-1} \mathbf{1}^T \mathbf{1} (\Delta_c^{-1} + \mathbf{K}_s) (\Delta_c^{-2} - \mathbf{K}_d)^{-1} \right) \circ \mathbf{K}_d \end{aligned} \right]. \quad (3.80)$$

После некоторых упрощений получаем окончательную аналитическую форму матрицы \mathbf{S} :

$$\mathbf{S} = \frac{1}{2} \left[\begin{aligned} & \left((\mathbf{I} - \mathbf{M})^{-1} \mathbf{1}^T \mathbf{1} \Delta_c (\mathbf{I} - \mathbf{M})^{-1} \right) \circ \mathbf{M}^T + \left(\Delta_c (\mathbf{I} - \mathbf{M}_d)^{-1} \mathbf{1}^T \mathbf{1} \right) \circ \mathbf{M}_s \\ & + \left((\mathbf{I} - \mathbf{M}_d^T)^{-1} (\mathbf{I} + \mathbf{M}_s) \Delta_c \mathbf{1}^T \mathbf{1} (\mathbf{I} - \mathbf{M}_d^T)^{-1} \right) \circ \mathbf{M}_d \\ & + \left((\mathbf{I} - \mathbf{M}_d)^{-1} \mathbf{1}^T \mathbf{1} \Delta_c (\mathbf{I} + \mathbf{M}_s) (\mathbf{I} - \mathbf{M}_d)^{-1} \right) \circ \mathbf{M}_d^T \end{aligned} \right]. \quad (3.81)$$

Выражения (3.68) и (3.76) дают полное решение задачи некооперативной молекулярной гетероассоциации в N -компонентных системах, составляя основу обобщенной модели N -компонентной гетероассоциации, которая далее может быть применена для полноценного изучения интерцепторного механизма без каких-либо ограничений на динамическое равновесие. В выведенной модели учтены все недостатки предыдущих моделей гетероассоциации [95,130-134,174,193], основными из которых является некорректный учет «отраженных» комплексов и неполный учет распределения молекулярных агрегатов в растворе.

3.4. Исследование частных случаев модели многокомпонентной гетероассоциации

Выведенная в предыдущем подразделе модель многокомпонентных некооперативных взаимодействий может быть редуцирована к некоторым частным случаям гетероассоциации. Рассмотрим их в настоящем подразделе. Результаты, приведенные ниже, опубликованы нами в работах [196,204-206].

3.4.1. Сведение к частным случаям, известным в литературе [196]

N -компонентная модель, разработанная Odille F.G.J. et al. в работе [190], не учитывает наличие «отраженных» комплексов, поэтому выражения для наблюдаемого параметра также записаны некорректно. Более того, закон сохранения массы в этой работе дан не в поэлементном виде, а в виде суммы общих концентраций всех компонентов. Если в выражении (3.68) исключить второе слагаемое, отвечающее за «отраженные» комплексы, а затем взять след от матрицы Δ_T , то получится выражение $\mathbf{c}(\mathbf{I} - \mathbf{M})^{-2} \mathbf{1}^T$, которое идентично тому, что было получено авторами работы [190].

Двухкомпонентная модель, разработанная Evstigneev V.P. et al. в работе [188], может быть получена из выражений (3.68) и (3.76) путем приведения всех матриц к размерности 2×2 и дальнейшей поэлементной записью выражений для наблюдаемых параметров (т.е. в виде (3.75)) при $t = 2$.

В N -компонентной модели Kong Y. [194] имеет место полный учет «отраженных» комплексов, однако отсутствует выражение для наблюдаемого параметра, а также закона сохранения массы в аналитической форме. Как было отмечено в пункте 3.3.2, для получения большой статистической суммы Ξ_{corr} (которая будучи записанной в матричной форме идентична выражению (3.50)) Kong Y. использовал метод SGF.

Однокомпонентная самоассоциация является тривиальным случаем молекулярной ассоциации. Выражения (3.68) и (3.76) при $N = 1$ и $t = 2$ сводятся к хорошо известным выражениям для закона сохранения масс и наблюдаемого параметра в ЕК-модели [165].

3.4.2. Вывод 1: m : n моделей гетероассоциации [204,205]

В некоторых случаях, как правило, при анализе спектрофотометрических данных, имеют место особые случаи молекулярной гетероассоциации, когда один

из компонентов присутствует в растворе в таких малых концентрациях, что допускается его существование только в мономерной форме либо в виде несвязанных молекул, либо в составе гетерокомплекса с молекулами других типов, агрегирование которых, в свою очередь, происходит уже без каких-либо ограничений. Условимся обозначать модель такой агрегации как $1:n$ — для двухкомпонентной системы, $1:m:n$ — для трехкомпонентной системы и т.д. Примером исследования гетероассоциации такого типа может служить ряд работ [57,59,61,63,207], в которых, однако, предложенные модели обладают недостатками, перечисленными в подразделе 3.2. Следует также отметить, что при такой формулировке задачи не возникает противоречия с утверждением об использовании бесконечномерных моделей гетероассоциации (см. пункт 3.1.2), поскольку в целом число молекул в агрегате в любом случае не ограничено. Покажем, как в общем случае можно вывести модель многокомпонентных взаимодействий, когда предполагается, что один из компонентов не агрегирует, с использованием большой статистической суммы.

Большая статистическая сумма (3.40) является фактически суммой произведений, каждое из которых представляет собой определенную комбинацию мономерных концентраций, являющихся маркерами молекул, и равновесных констант, являющихся маркерами межмолекулярных стыков. Удаляя из большой статистической суммы (3.40) те произведения, которые содержат более чем m множителей заданного типа, т.е. мономерные концентрации молекул, например, i -го типа, C_i , можно получить статистическую сумму системы, в которой молекулы i -го типа встречается в комплексах ровно m раз. Перепишем большую статистическую сумму (3.40) в форме степенного ряда переменной C_i :

$$\Xi_{\text{corr}} = a_0 + a_1 C_i + a_2 C_i^2 + a_3 C_i^3 + \dots = \sum_{k=0}^{\infty} a_k C_i^k, \quad (3.82)$$

где a_k — коэффициент, содержащий сумму произведений всех равновесных констант и мономерных концентраций за исключением C_i . Согласно определению a_k имеем

$$a_k = \frac{1}{k!} \left. \frac{\partial^k \Xi_{\text{corr}}}{\partial C_i^k} \right|_{C_i=0}. \quad (3.83)$$

Подставляя выражение (3.83) в (3.82), получим

$$\Xi_{\text{corr}} = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{C_i^k}{k!} \left. \frac{\partial^k \Xi_{\text{corr}}}{\partial C_i^k} \right|_{C_i=0}. \quad (3.84)$$

Выражение (3.84) представляет собой разложение большой статистической суммы Ξ_{corr} в ряд Маклорена.

Искомая статистическая сумма имеет вид:

$$\Xi_{\text{corr}}^{(m)} = a_0 + a_1 C_i + \dots + a_m C_i^m = \sum_{k=0}^m \frac{C_i^k}{k!} \left. \frac{\partial^k \Xi_{\text{corr}}}{\partial C_i^k} \right|_{C_i=0}. \quad (3.85)$$

Подставляя $m=1$ в выражение (3.85), можно получить статистическую сумму $\Xi_{\text{corr}}^{(1)}$ N -компонентной системы, в которой молекулы i -го типа существуют в виде мономеров как в свободном, так и в связанном с другими молекулами состоянии:

$$\Xi_{\text{corr}}^{(1)} = \Xi_{\text{corr}} \Big|_{C_i=0} + C_i \left. \frac{\partial \Xi_{\text{corr}}}{\partial C_i} \right|_{C_i=0}. \quad (3.86)$$

Подстановка выражения (3.40) в (3.86) при $N=2$ и $N=3$ позволяет получить статистические суммы $\Xi_{\text{corr}}^{(1)}$ для $1:n$ и $1:m:n$ моделей, идентичные тем, что были ранее получены в работах [204,205] комбинаторным способом.

Перейдем от общей записи (3.86) к алгебраическому виду уравнений модели, которые будут использованы в следующем разделе. Пусть **A**, **B**, **C** — компоненты трех типов, составляющих агрегирующую систему, при этом будем считать, что компонент **A** не агрегирует.

Для $1:n$ модели в системе **A-B** статистическая сумма $\Xi_{\text{corr}}^{(1;n)}$ принимает вид [204,205]:

$$\Xi_{\text{corr}}^{(1;n)} = a_1 + B + K_{AB} a_1 B + \frac{1}{2} (K_{AB}^2 a_1 B^2 + K_{AB}^2 a_1 B_S), \quad (3.87)$$

где $B = \frac{b_1}{1 - K_{BB}b_1}$, $B_S = \frac{b_1^2}{1 - K_{BB}^2b_1^2}$; a_1, b_1 — мономерные концентрации веществ **A** и **B** соответственно; K_{AA}, K_{BB}, K_{AB} — равновесные константы самоассоциации веществ **A** и **B** и их гетероассоциации соответственно. Система уравнений закона сохранения массы в этом случае записывается в виде:

$$\begin{cases} a_0^{(1:n)} = \frac{\partial \Xi_{\text{corr}}^{(1:n)}}{\partial \ln a_1} = a_1 \left(1 + \frac{K_{AB}b_1}{1 - K_{BB}b_1} + \frac{K_{AB}^2b_1^2}{(1 - K_{BB}b_1)^2(1 + K_{BB}b_1)} \right) \\ b_0^{(1:n)} = \frac{\partial \Xi_{\text{corr}}^{(1:n)}}{\partial \ln b_1} = \frac{b_1}{(1 - K_{BB}b_1)^2} \left(1 + K_{AB}a_1 + K_{AB}^2a_1b_1 \frac{2 + K_{BB}b_1 + K_{BB}^2b_1^2}{(1 - K_{BB}b_1)(1 + K_{BB}b_1)^2} \right) \end{cases} \quad (3.88)$$

Как отмечалось выше, $1:n$ и $1:m:n$ модели чаще всего могут использоваться при анализе спектрофотометрических данных. При этом, как правило, анализируются данные эксперимента титрованием, когда в данной области оптического спектра поглощает только один компонент — краситель, концентрации которого обычно несравнимо меньше концентраций других компонентов. Поэтому будем считать, что в эксперименте регистрируется наблюдаемый параметр (молярный коэффициент поглощения) компонента **A**, пренебрегая наблюдаемыми параметрами компонентов **B** и **C**. Уравнение для экспериментально наблюдаемого параметра ε_A компонента **A** в двухкомпонентной смеси **A-B** выглядит следующим образом:

$$\varepsilon_A = \varepsilon_A^{(m)} - \left(\varepsilon_A^{(m)} - \varepsilon_{AB}^{(h)} \right) \frac{K_{AB}a_1b_1}{1 - K_{BB}b_1} \left(1 + \frac{2K_{AB}b_1}{1 - K_{BB}^2b_1^2} \right) \frac{1}{a_0^{(1:n)}}, \quad (3.89)$$

где $\varepsilon_A^{(m)}, \varepsilon_{AB}^{(h)}$ — наблюдаемые параметры (молярные коэффициенты поглощения) молекул типа **A** в мономерном состоянии и в состоянии гетерокомплекса с молекулами типа **B** соответственно.

Статистическая сумма $\Xi_{\text{corr}}^{(1:m:n)}$ для $1:m:n$ модели гетероассоциации в трехкомпонентной системе **A-B-C** имеет вид:

$$\Xi_{\text{corr}}^{(1:m:n)} = a_1 + \frac{1}{2} \left[a_1 \left(\frac{K_{AB}B(1+K_{BC}C) + K_{AC}C(1+K_{BC}B)}{1-K_{BC}^2BC} \right)^2 + \frac{B(1+2K_{AB}a_1)(1+K_{BC}C) + C(1+2K_{AC}a_1)(1+K_{BC}B)}{1-K_{BC}^2BC} + \frac{(B+K_{AB}^2a_1B_S)(1+K_{BC}^2C_S) + (C+K_{AC}^2a_1C_S)(1+K_{BC}^2B_S)}{1-K_{BC}^4B_S C_S} \right]. \quad (3.90)$$

где $C = \frac{c_1}{1-K_{CC}c_1}$, $C_S = \frac{c_1^2}{1-K_{CC}^2c_1^2}$; c_1 — мономерная концентрация вещества **C**;

K_{CC} , K_{AC} , K_{BC} — равновесные константы самоассоциации вещества **C** и его гетероассоциации с веществами **A** и **B** соответственно. Закон сохранения массы в этом случае дается в виде системы уравнений (3.91a) — (3.91в):

$$a_0^{(1:m:n)} = \frac{\partial \Xi_{\text{corr}}^{(1:m:n)}}{\partial \ln a_1} = \frac{a_1}{2} \left[\left(\frac{K_{AB}B(1+K_{BC}C) + K_{AC}C(1+K_{BC}B)}{1-K_{BC}^2BC} + 1 \right)^2 + \frac{K_{AB}^2B_S(1+K_{BC}^2C_S) + K_{AC}^2C_S(1+K_{BC}^2B_S)}{1-K_{BC}^4B_S C_S} + 1 \right]. \quad (3.91a)$$

$$b_0^{(1:m:n)} = \frac{\partial \Xi_{\text{corr}}^{(1:m:n)}}{\partial \ln b_1} = \left[\frac{2a_1}{(1-K_{BC}^2BC)^3} (K_{AB}B(1+K_{BC}C) + K_{AC}C(1+K_{BC}B)) \times \right. \\ \left. \times (K_{AB} + K_{AC}K_{BC}C)(1+K_{BC}C) + \frac{1+K_{BC}^2C_S}{1-K_{BC}^4B_S C_S} + \frac{(1+K_{BC}C + 2a_1(K_{AB} + K_{AC}K_{BC}C))(1+K_{BC}C)}{(1-K_{BC}^2BC)^2} \right] + \\ + \frac{B_S^2}{b_1^2} \frac{(a_1(K_{AB}^2 + K_{AC}^2K_{BC}^2C_S) + K_{BC}^2(C + K_{BC}^2BC_S))(1+K_{BC}^2C_S)}{(1-K_{BC}^4B_S C_S)^2} \quad (3.91б)$$

$$\begin{aligned}
c_0^{(1:m:n)} &= \frac{\partial \Xi_{\text{corr}}^{(1:m:n)}}{\partial \ln c_1} = \\
&= \frac{C^2}{2c_1} \left[\frac{2a_1}{(1 - K_{BC}^2 BC)^3} (K_{AB} B(1 + K_{BC} C) + K_{AC} C(1 + K_{BC} B)) \times \right. \\
&\quad \times (K_{AC} + K_{AB} K_{BC} B)(1 + K_{BC} B) + \frac{1 + K_{BC}^2 B_S}{1 - K_{BC}^4 B_S C_S} \\
&\quad \left. + \frac{(1 + 2K_{AC} a_1 + K_{BC} B(1 + 2K_{AB} a_1))(1 + K_{BC} B)}{(1 - K_{BC}^2 BC)^2} \right] + \\
&\quad + \frac{C_S^2}{c_1^2} \frac{(a_1 (K_{AC}^2 + K_{AB}^2 K_{BC}^2 B_S) + K_{BC}^2 (B + K_{BC}^2 B_S C))(1 + K_{BC}^2 B_S)}{(1 - K_{BC}^4 B_S C_S)^2}
\end{aligned} \tag{3.91B}$$

Выражение для наблюдаемого молярного коэффициента поглощения $\varepsilon_A^{(1:m:n)}$ молекул типа **A** в рамках 1:m:n модели записывается в следующем виде:

$$\varepsilon_A^{(1:m:n)} = \varepsilon_A^{(m)} - (\varepsilon_A^{(m)} - \varepsilon_{AB}^{(h)}) \frac{\partial \Xi_{\text{corr}}^{(1:m:n)}}{\partial \ln K_{AB}} \frac{1}{a_0^{(1:m:n)}} - (\varepsilon_A^{(m)} - \varepsilon_{AC}^{(h)}) \frac{\partial \Xi_{\text{corr}}^{(1:m:n)}}{\partial \ln K_{AC}} \frac{1}{a_0^{(1:m:n)}}, \tag{3.92}$$

где частные производные статистической суммы $\Xi_{\text{corr}}^{(1:m:n)}$ по логарифмам равновесных констант даются выражениями:

$$\frac{\partial \Xi_{\text{corr}}^{(1:m:n)}}{\partial \ln K_{AB}} = K_{AB} a_1 \left[\left(\frac{K_{AB} B(1 + K_{BC} C) + K_{AC} C(1 + K_{BC} B)}{1 - K_{BC}^2 BC} + 1 \right) \times \right. \\
\left. \times \frac{B(1 + K_{BC} C)}{1 - K_{BC}^2 BC} + \frac{K_{AB} B_S (1 + K_{BC}^2 C_S)}{1 - K_{BC}^4 B_S C_S} \right], \tag{3.93a}$$

$$\frac{\partial \Xi_{\text{corr}}^{(1:m:n)}}{\partial \ln K_{AC}} = K_{AC} a_1 \left[\left(\frac{K_{AB} B(1 + K_{BC} C) + K_{AC} C(1 + K_{BC} B)}{1 - K_{BC}^2 BC} + 1 \right) \times \right. \\
\left. \times \frac{C(1 + K_{BC} B)}{1 - K_{BC}^2 BC} + \frac{K_{AC} C_S (1 + K_{BC}^2 B_S)}{1 - K_{BC}^4 B_S C_S} \right]. \tag{3.93b}$$

Таким образом, в данном подразделе показано сведение разработанной выше обобщенной модели многокомпонентных некооперативных взаимодействий к некоторым известным в литературе частным случаям, что косвенно указывает на

корректность проведенных математических выкладок. Также произведено редуцирование обобщенной модели к случаям $1:n$ и $1:m:n$ гетероассоциации.

Завершающим этапом разработки модели является ее верификация с использованием экспериментальных данных, чем посвящен следующий подраздел.

3.5. Верификация моделей гетероассоциации

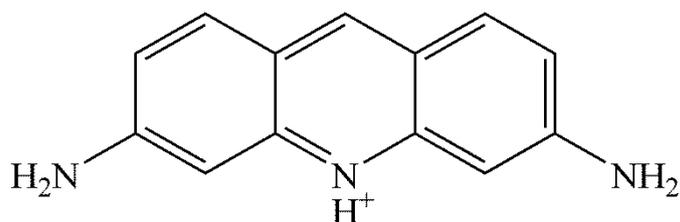
В данном подразделе приведены результаты верификации $1:n$ и $1:m:n$ моделей гетероассоциации с использованием данных спектрофотометрического титрования. Верификация проводилась в два этапа: расчет равновесных параметров гетероассоциации в двухкомпонентных системах и затем подстановка полученных значений в расчет трехкомпонентных систем. Совпадение в этом случае экспериментальных и расчетных кривых титрования должно указать на справедливость использованной модели.

3.5.1. Двухкомпонентные системы

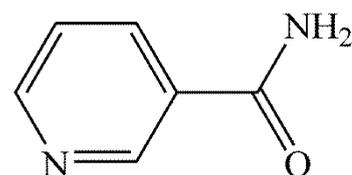
В рамках настоящей работы были проведены эксперименты в нескольких двухкомпонентных системах, в которых одним из компонентов являлся «краситель», другим — вещество, не поглощающее свет в видимой области (кофеин (CAF), никотинамид (NMD)). В качестве красителей использовались бромистый этидий (EB), профлавин (PF). Структурные формулы всех этих соединений приведены на рисунке 3.3. В качестве примера приведем лишь данные по системе PF-CAF-NMD, данные по системам с бромистым этидием будут приведены в следующем разделе.

Такой подбор компонентов системы обусловлен тем, что пики поглощения красителей находятся в видимой области оптического спектра, в то время как пики кофеина и никотинамида находятся в ультрафиолетовой области. Таким образом, в видимой области отсутствует перекрывание спектров различных компонент, что существенно облегчает анализ и дает право однозначно идентифициро-

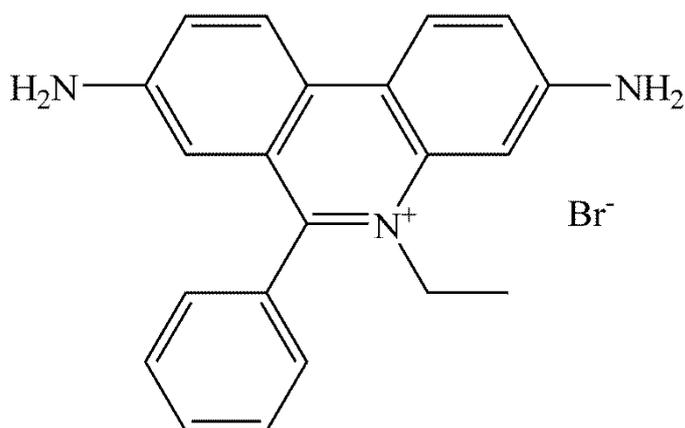
вать наличие взаимодействия между различными компонентами раствора по характерной деформации спектра чистого красителя. Непосредственно в расчетах использовались зависимости оптических плотностей растворов на длине волны, соответствующей максимуму полосы поглощения чистого красителя, от концентрации кофеина либо никотинамида.



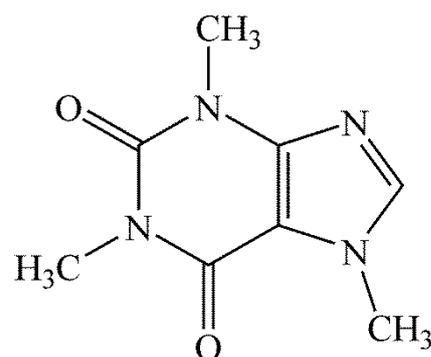
Профлавин



Никотинамид



Бромистый этидий



Кофеин

Рисунок 3.3. Структурные формулы БАС, с участием которых производилась верификация моделей

На рисунке 3.4 представлены экспериментальные спектры растворов профлавина с различным содержанием кофеина, а также зависимость оптической плотности растворов от концентрации кофеина. Как видно, титрование кофеином приводит к гипохромному эффекту и батохромному сдвигу полосы поглощения относительно максимума полосы поглощения красителя. Изменения в спектрах

красителя свидетельствуют о взаимодействии между молекулами PF и CAF и формировании в растворе гетерокомплексов PF-CAF.

Количественный анализ проводился по концентрационной зависимости согласно методике, описанной в подразделе 2.3 настоящей работы. Закон сохранения массы в системе PF-CAF в предположении образования $1:n$ комплексов задавался системой уравнений (3.88). Функцией, непосредственно описывающей экспериментальную кривую, являлось уравнение (3.89). Искомыми параметрами являлись равновесная константа гетероассоциации профлавина и кофеина K_{AB} и коэффициент экстинкции профлавина, находящегося в комплексе с кофеином, $\varepsilon_{AB}^{(h)}$. Результаты расчетов приведены в таблице 3.1. Следует отметить, что в целом рассчитанная по $1:n$ модели константа гетероассоциации PF и CAF согласуется с аналогичным результатом, полученным из данных ЯМР-спектроскопии (160 л/моль) [71].

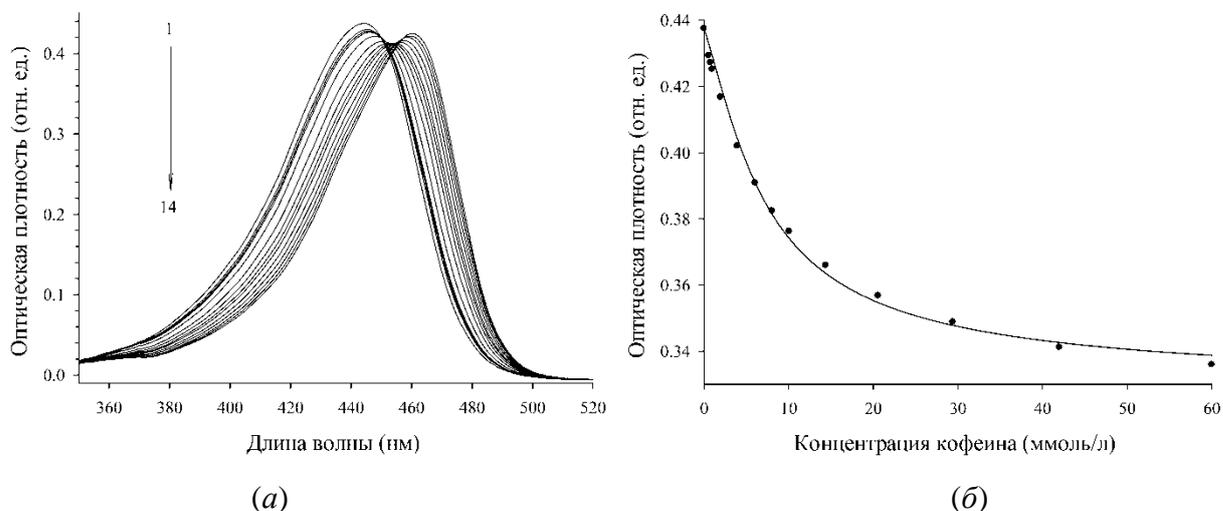


Рисунок 3.4. Электронные спектры поглощения растворов профлавина с кофеином (*а*; стрелками указаны: 1 — спектр с нулевой концентрацией кофеина, 14 — спектр с наибольшей концентрацией кофеина) и зависимость оптической плотности этих растворов от концентрации кофеина, снятая на длине волны 444,5 нм (*б*). Концентрация профлавина составляет $1.26 \cdot 10^{-5}$ моль/л; спектры сняты в буферном растворе при $\text{pH} = 6,86$ и постоянной температуре $T = 298$ К.

На рисунке 3.5 представлены экспериментальные спектры смешанных растворов профлавина и никотинамида, а также зависимость оптической плотности

растворов от концентрации NMD. Титрование никотиномидом приводит к слабо выраженному гипохромному эффекту и едва заметному батохромному сдвигу полосы поглощения относительно максимума полосы поглощения красителя. Такие незначительные изменения в спектрах растворов говорят о более слабом взаимодействии между PF и NMD, чем между PF и CAF, что в первую очередь должно отразиться на меньшем значении константы гетероассоциации.

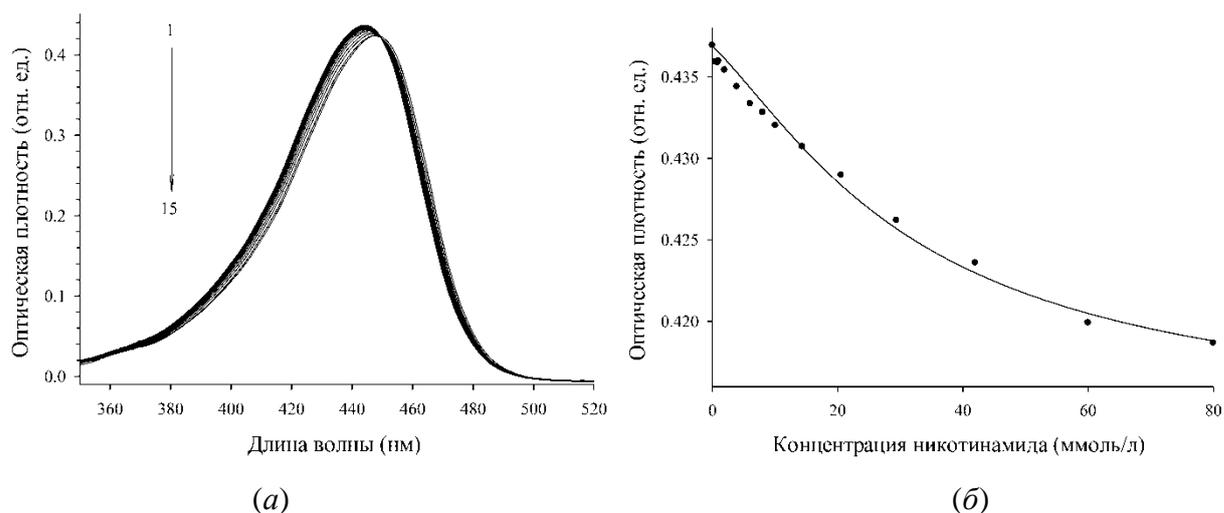


Рисунок 3.5. Электронные спектры поглощения растворов профлавина с никотиномидом (а; стрелками указаны: 1 — спектр с нулевой концентрацией никотиномидом, 15 — спектр с наибольшей концентрацией никотиномидом) и зависимость оптической плотности этих растворов от концентрации никотиномидом, снятая на длине волны 444,5 нм (б). Концентрация профлавина составляет $1,26 \cdot 10^{-5}$ моль/л; спектры сняты в буферном растворе при $\text{pH} = 6,86$ и постоянной температуре $T = 298$ К.

Анализ данных системы PF-NMD целиком аналогичен анализу PF-CAF, описанному в предыдущем подразделе. Результаты расчетов представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 — Численные значения равновесных параметров гетероассоциации в двухкомпонентных системах

Система	K_{AB} , л/моль	$\varepsilon_{AB}^{(h)}$, л/(моль·см)	R^2
PF-CAF	139,7	30246	0,9937
PF-NMD	31,5	33710	0,9878

3.5.2. Трехкомпонентные системы

Верификация модели трехкомпонентных взаимодействий заключается в подстановке в исходную вычислительную процедуру значений равновесных параметров само- и гетероассоциации, полученных, в свою очередь, из предварительных экспериментов по исследованию одно- и двухкомпонентных систем. При этом осуществляется только расчет мономерных концентраций по уравнениям закона сохранения массы (3.88), подгонка теоретической кривой титрования под экспериментальную не производится. Модель считается верифицированной, если значение коэффициента детерминации R^2 лежит в пределах 0,9...1.

Самоассоциация CAF и NMD, а также гетероассоциация CAF-NMD были исследованы ранее в работе [70]. В связи с этим мы использовали следующие значения равновесных констант [70]: $K_{CAF} = 11,8$ л/моль, $K_{NMD} = 0,73$ л/моль и $K_{CAF-NMD} = 7,12$ л/моль. Остальные смеси (PF-CAF, PF-NMD и PF-CAF-NMD) были исследованы в рамках настоящей работы. Полученные оценки параметров гетероассоциации в двухкомпонентных системах PF-CAF и PF-NMD использовались для анализа трехкомпонентной системы PF-CAF-NMD. На рисунке 3.6а представлены спектры поглощения красителя при различных концентрациях CAF и постоянной концентрации PF ($1,26 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и NMD ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л). При увеличении концентрации CAF характерны те же спектральные изменения, которые проявляются и в растворах двухкомпонентной системы PF-CAF (см. рисунок 3.4). Присутствие в растворе NMD незначительно изменило ход концентрационной зависимости оптической плотности PF (рисунок 3.6б).

Для количественного анализа использовались система уравнений (3.91) в качестве закона сохранения массы. Экспериментальная концентрационная зависимость моделировалась уравнениями (3.92) и (3.93). В отличие от двухкомпонентных систем в данном случае подгонка теоретических значений оптической плотности под экспериментальные не осуществлялась, а рассчитывались только мономерные концентрации в трехкомпонентной смеси. Фактически равновесные

параметры из таблицы 3.1, а также константы K_{CAF} , K_{NMD} , $K_{CAF-NMD}$ подставлялись в уравнения (3.92), (3.93) и рассчитывалось теоретическое значение оптической плотности. Тот факт, что теоретическая кривая достаточно неплохо описывает экспериментальную ($R^2 = 0,9991$; см. рисунок 3.6б), является окончательной верификацией модели и указывает на справедливость выведенной в настоящей работе 1:*m*:*n* модели трехкомпонентной гетероассоциации.

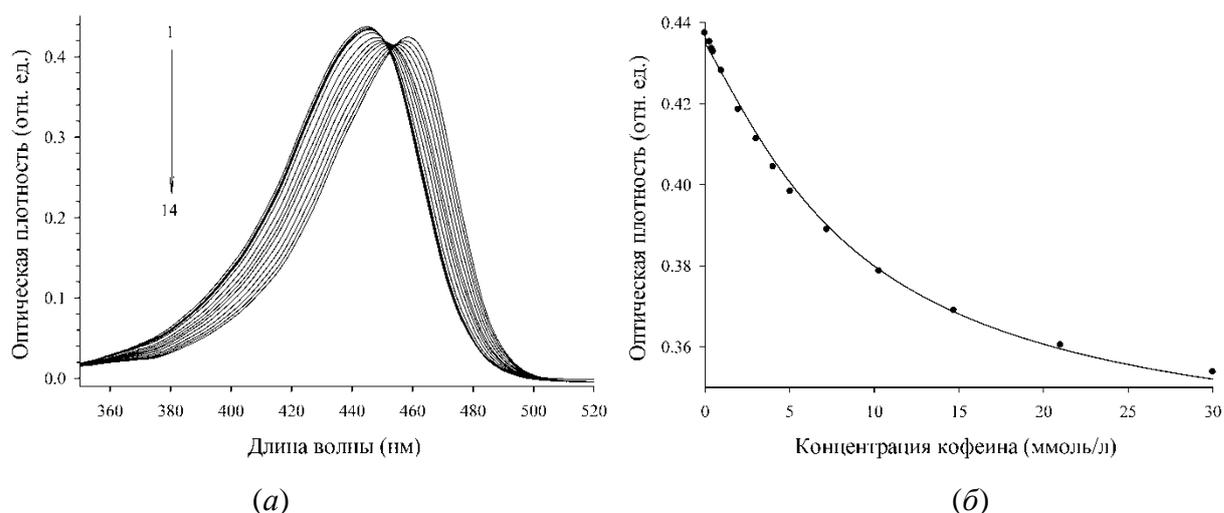


Рисунок 3.6. Электронные спектры поглощения трехкомпонентных растворов профлавина с никотинамидом и кофеином (*а*; стрелками указаны: 1 — спектр с нулевой концентрацией кофеина, 14 — спектр с наибольшей концентрацией кофеина) и зависимость оптической плотности этих растворов от концентрации кофеина, снятая на длине волны 444,5 нм (*б*). Концентрация никотинамида составляла $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Концентрация профлавина составляет $1,26 \cdot 10^{-5}$ моль/л; спектры сняты в буферном растворе при pH = 6,86 и постоянной температуре $T = 298$ К.

В настоящем разделе рассмотрены некоторые аспекты молекулярной линейной гетероассоциации, до сих пор постулируемые аксиоматически и не имеющие строгого статистико-термодинамического обоснования. Так, было доказано, что в общем случае последовательная мода линейной агрегации является термодинамически более выгодной, чем случайная мода агрегации, что является следствием эффектов чисто энтропийной природы. Также было показано, что в общем случае при исследовании линейной агрегации БАС следует использовать

бесконечномерную модель агрегации, допускающую образование комплексов произвольной длины от единицы до бесконечности.

Основной задачей, решенной в настоящем подразделе, является построение статистико-термодинамической модели некооперативных нековалентных взаимодействий в многокомпонентной системе ароматических БАС. В этой модели учтены все недостатки предыдущих аналогичных моделей, при этом сняты ограничения как на длину образующихся комплексов, так и на количество компонентов агрегирующей системы. Данная модель может быть сравнительно легко редуцирована к известным в литературе частным случаям, что косвенно указывает на ее справедливость и обобщенность. Окончательным подтверждением справедливости модели явилась проведенная в рамках раздела ее верификация с использованием данных спектрофотометрического эксперимента титрованием.

В целом, совокупность выводов данного раздела представляет собой статистико-термодинамическое обоснование для полноценного использования выведенной модели многокомпонентных взаимодействий при исследовании интерцепторного механизма действия ароматических БАС.

РАЗДЕЛ 4

РАЗВИТИЕ И ПРИЛОЖЕНИЕ ОБОБЩЕННОЙ ТЕОРИИ ИНТЕРЦЕПТОРНО-ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ

На основании проведенного выше статистико-термодинамического обобщения для интерцепторного механизма действия в данном разделе разовьем теорию интерцепторно-протекторного действия (ИПД) на случай многокомпонентного конкурентного связывания биологически активных соединений с ДНК.

4.1. Формулировка физической модели и вывод основных соотношений обобщенной теории ИПД

4.1.1. Формулировка основных положений обобщенной теории интерцепторно-протекторного действия [204,208,209]

Рассмотрим $(N + 1)$ -компонентную ДНК-содержащую систему Препарат — Интерцептор₁ — ... — Интерцептор _{$(N - 1)$} — ДНК. Предположим, что из N лигандов в этой системе только один является действующим веществом (это может быть, например, антибиотик), биологический эффект которого измеряется. Будем обозначать это вещество через X (Препарат), остальные играют роль молекул-интерцепторов, их обозначим через Y_1, Y_2, \dots, Y_{N-1} . При переходе от трехкомпонентной к многокомпонентной ДНК-содержащей системе базовые принципы теории ИПД (т.е. фундаментальные представления об интерцепторном и протекторном механизмах), описанные в разделе 1, сохраняются, изменяется фактически только вид уравнений закона сохранения массы (см. ниже).

Обобщение результатов развития ранних теорий ИПД, описанных в подразделе 1.5, и опыта их применения позволяет сформулировать пять базовых допущений обобщенной теории ИПД:

- 1) биологическая активность лиганда X преимущественно обусловлена комплексобразованием с ядерной ДНК, причем измеряемый *in vitro* биологический эффект пропорционален доле комплексов f_C^X X -ДНК;
- 2) биологический синергизм комбинации препаратов X - Y_1 - Y_2 -...- Y_{N-1} проявляется при одновременном введении в биосистему, т.е. в смеси, либо любым другим способом, при котором достигается одновременное присутствие X и Y_1, Y_2, \dots, Y_{N-1} в окрестности ДНК;
- 3) собственный биологический эффект лигандов-интерцепторов Y_1, Y_2, \dots, Y_{N-1} отсутствует либо не интерферирует с эффектом лиганда X ;
- 4) гетероассоциация X - Y_1, X - Y_2, \dots, X - Y_{N-1} и комплексобразование X -ДНК, Y_1 -ДНК, Y_2 -ДНК, ..., Y_{N-1} -ДНК носит нековалентный характер, при этом интерцептор не демонстрирует выраженной специфичности к нуклеотидной последовательности ДНК;
- 5) равновесные константы гетероассоциация X - Y_1, X - Y_2, \dots, X - Y_{N-1} и комплексобразование X -ДНК, Y_1 -ДНК, Y_2 -ДНК, ..., Y_{N-1} -ДНК, измеренные в независимых физико-химических экспериментах в условиях, близких к физиологическим, могут быть перенесены на условия *in vitro* эксперимента в биосистеме; концентрации компонент $X, Y_1, Y_2, \dots, Y_{N-1}$ и сайтов связывания X на ДНК соответствуют так называемым квазифизиологическим условиям [74,102]: в рамках олигомерной теории ИПД (см. подраздел 1.5) квазифизиологическими условиями является набор следующих условий:

$$x_0 = 10 \text{ мкмоль/л}, y_0 \text{ — var}, N_0^{\text{tet}} = 10 \text{ мкмоль/л}. \quad (4.1)$$

Следствием пяти описанных допущений является представление о гетероассоциации X - Y_1, X - Y_2, \dots, X - Y_{N-1} (интерцепторный механизм) и конкуренции X и Y_1, Y_2, \dots, Y_{N-1} за места посадки на ДНК (протекторный механизм) как базовых молекулярных процессах, изменяющих долю комплексов f_C^X при введении интерцепторов, и, следовательно, модулирующих измеряемый биологический отклик.

Как было показано в разделе 1, основу количественной теории ИПД в трехкомпонентной системе Препарат — Интерцептор — ДНК составляет анализ зна-

чений так называемых факторов R_D и A_D [1,72-74,94,102], вводимых для оценки вкладов протекторного и интерцепторного механизмов в общее взаимодействие лигандов-интерцепторов с ДНК. Понятия об этих факторах, а также способы их вычисления, могут быть полностью перенесены на многокомпонентную ДНК-содержащую систему.

Фактор R_D вычисляется по формуле [102]:

$$R_D = \frac{f_{C(0)}^X - f_{C(C)}^X}{f_{C(0)}^X - f_{C(H)}^X}, \quad (4.2)$$

где $f_{C(C)}^X$ — мольная доля комплексов X-ДНК при «отключенной» гетероассоциации $X-Y_1, X-Y_2, \dots, X-Y_{N-1}$ и «включенном» комплексообразовании Y_1 -ДНК, Y_2 -ДНК, ..., Y_{N-1} -ДНК; $f_{C(H)}^X$ — мольная доля комплексов X-ДНК при «включенной» гетероассоциации $X-Y_1, X-Y_2, \dots, X-Y_{N-1}$ и «отключенном» комплексообразовании Y_1 -ДНК, Y_2 -ДНК, ..., Y_{N-1} -ДНК; $f_{C(0)}^X$ — мольная доля комплексов X-ДНК при «отключенных» гетероассоциации $X-Y_1, X-Y_2, \dots, X-Y_{N-1}$ и комплексообразовании Y_1 -ДНК, Y_2 -ДНК, ..., Y_{N-1} -ДНК.

Ключевой величиной в теории ИПД является фактор A_D , представляющий собой количественную меру изменения биологического эффекта лиганда X при добавлении интерцепторов Y_1, Y_2, \dots, Y_{N-1} , и вычисляемый как изменение доли комплексов X-ДНК в присутствии Y_1, Y_2, \dots, Y_{N-1} [102]:

$$A_D = \frac{f_{C(0)}^X - f_C^X}{f_{C(0)}^X}, \quad (4.3)$$

где f_C^X обозначает мольную долю молекул Лиганда X, связанных с ДНК в присутствии молекул Y_1, Y_2, \dots, Y_{N-1} при «включенных» гетероассоциации и комплексообразовании. В такой формулировке фактор A_D оказывается тождественным измеряемому в биологическом эксперименте изменению некоторого параметра при добавлении интерцепторов (например, доля подвергнувшихся апоптозу клеток, процент мутировавших клеток и пр.), нормированному к значению этого же параметра, но в отсутствии интерцепторов (т.е. контроль в

биологическом эксперименте). Примеры пересчета измеряемого биологического параметра в единицы A_D представлены в работах [74,102].

Перечисленные выше допущения лежат в основе обобщенной теории ИПД и по своей сути образуют физическую модель многокомпонентной ДНК-содержащей системы, которая будет использована далее для построения соответствующей математической модели.

4.1.2. Закон сохранения массы в системе

Препарат — Интерцептор1 — ... — Интерцептор($N - 1$) — ДНК [204]

Как следует из предыдущего подраздела, для расчета ключевых факторов теории ИПД (R_D и A_D) необходимо уметь определять величины мольных долей комплексов f_C^X X-ДНК. Для того чтобы количественно описать процессы межмолекулярного комплексообразования в многокомпонентных ДНК-содержащих системах и рассчитать мольные доли f_C^X необходимо записать систему уравнений закона сохранения массы. Таким образом, задача на данном этапе исследования состоит в построении статистико-термодинамической модели взаимодействий в многокомпонентной системе, адекватно отражающей как процессы равновесной само- и гетероассоциации лигандов (см. раздел 3), так и их комплексообразования с полимерной ДНК. Напомним, что до сих пор учет полимерной ДНК был выполнен в олигомерной теории ИПД (см. подраздел 1.5) с исключенным протекторным механизмом.

Закон сохранения массы для $(N + 1)$ -компонентной системы, состоящей из N типов взаимодействующих лигандов и полимерной ДНК, представляет собой систему N уравнений:

$$\left\{ \begin{array}{l} C_1^{(0)} = C_1^{(\text{het})} + \theta_1 N_0 = \frac{\partial Z_{\text{het}}}{\partial \ln C_1} + \theta_1 N_0 \\ C_2^{(0)} = C_2^{(\text{het})} + \theta_2 N_0 = \frac{\partial Z_{\text{het}}}{\partial \ln C_2} + \theta_2 N_0 \\ \dots \dots \dots \\ C_i^{(0)} = C_i^{(\text{het})} + \theta_i N_0 = \frac{\partial Z_{\text{het}}}{\partial \ln C_i} + \theta_i N_0 \\ \dots \dots \dots \\ C_N^{(0)} = C_N^{(\text{het})} + \theta_N N_0 = \frac{\partial Z_{\text{het}}}{\partial \ln C_N} + \theta_N N_0 \end{array} \right. \quad (4.4)$$

где $C_i^{(0)}$, C_i — соответственно общая и мономерная концентрации лиганда i -го типа, $C_i^{(\text{het})} = \frac{\partial Z_{\text{het}}}{\partial \ln C_i}$ — концентрация молекул лиганда этого же типа, находящихся в составе различных само- и гетероассоциатов, включая мономеры, Z_{het} — большая статистическая сумма N -компонентной системы без ДНК, θ_i — доля сайтов ДНК, занятая молекулами лиганда i -го типа, N_0 — общая концентрация ДНК, выражаемая в моль пар оснований на литр. Концентрации комплексов $C_i^{(\text{het})}$, содержащих молекулы i -го типа, определяются из уравнения (3.68) и являются фактически соответствующими элементами главной диагонали матрицы Δ_T .

В свою очередь, параметры θ_i могут быть определены различными способами, например, с использованием подходов Скэтчарда [128] или МакГи — фон Хиппеля [124,148,210], однако более корректным в общем случае является использование подхода МакГи — фон Хиппеля, строго учитывающего статистические эффекты распределения лигандов по полимерной матрице, и поэтому позволяющего принять во внимание конкуренцию между молекулами различных типов за места посадки на ДНК.

Согласно подходу МакГи — фон Хиппеля доли θ_i в системе (4.4) задаются системой N уравнений следующего вида:

$$\theta_i = K_{iN} C_i \left(1 - \sum_{k=1}^N n_k \theta_k \right) \left(\frac{1 - \sum_{k=1}^N n_k \theta_k}{1 - \sum_{k=1}^N (n_k - 1) \theta_k} \right)^{n_i - 1}, \quad (4.5)$$

где n_i — количество пар оснований в сайте ДНК, занимаемом одной молекулой i -го типа, K_{iN} — равновесная микроскопическая константа комплексообразования лиганда i -го типа с ДНК.

Неизвестными величинами в модели (4.4) являются мономерные концентрации C_i , неявно заложенные в $C_i^{(\text{het})}$, и доли θ_i . Остальные параметры (константы комплексообразования, исходные концентрации компонентов и параметры n_i) могут быть определены из соответствующих независимых физико-химических экспериментов в смесях с меньшим числом компонентов (см. раздел 3) и далее подставлены в систему (4.4). Нахождение неизвестных параметров может быть осуществлено путем решения системы нелинейных уравнений (4.4) методом наименьших квадратов. Таким образом, систему уравнений закона сохранения массы (4.4) можно считать определенной.

Следует отметить, что система уравнений (4.4) может быть модифицирована под конкретные нужды исследователя. Так, вместо большой статистической суммы Z_{het} может быть записана любая другая статистическая сумма, отражающая частные допущения, которые закладывает исследователь в модель динамического равновесия в многокомпонентном растворе (например, статистические суммы, полученные в работах [57,58,74]). Для определения параметров θ_i может быть также использована система уравнений, отличная от (4.5) (например, уравнения Скэтчарда).

Система уравнений (4.4) лежит в основе математической модели многокомпонентных взаимодействий в теории ИПД и используется для расчета факторов R_D и A_D , в самом общем случае многокомпонентной ДНК-содержащей системы.

4.1.3. Расчет факторов R_D и A_D

Мольные доли f_C^X для расчета факторов R_D и A_D по формулам (4.2), (4.3) представляют собой мольные доли молекул препарата X , связанных с ДНК. Для их нахождения в случае олигомерной теории ИПД в виде $f_C^X = \frac{K_{XN}x_1N_1}{x_0}$ решается система уравнений закона сохранения массы (1.5) относительно мономерных концентраций компонентов раствора (см. подраздел 1.5). При этом для определения значения того или иного фактора в пункте 4.1.1 было введено четыре типа этих долей:

- 1) мольная доля $f_{C(0)}^X$, не учитывающая интерцепторный и протекторный механизмы действия (что осуществляется путем обнуления соответствующих равновесных констант: $K_h = 0$, $K_{YN} = 0$), т.е. характеризует связывание Препарата с ДНК в отсутствие Интерцептора;
- 2) мольная доля $f_{C(C)}^X$, учитывающая только протекторный механизм действия ($K_h = 0$, $K_{YN} \neq 0$), т.е. когда Интерцептор осуществляет свою функцию только посредством связывания с ДНК;
- 3) мольная доля $f_{C(H)}^X$, отражающая влияние Интерцептора только через его гетероассоциацию с Препаратом, т.е. когда учитывается только интерцепторный механизм действия ($K_h \neq 0$, $K_{YN} = 0$);
- 4) мольная доля f_C^X характеризует влияние Интерцептора при наличии обоих механизмов действия при $K_h \neq 0$, $K_{YN} \neq 0$.

Для расчета факторов R_D и A_D в обобщенной теории ИПД дается аналогичное определение различных видов долей f_C^X , но для их расчета используются системы уравнений (4.4) и (4.5). Мольные доли, по-прежнему, определяются как доли связанного Препарата с ДНК, однако решением систем (4.4), (4.5) являются

уже пары чисел C_i , θ_i . Покажем, что формулы (4.2) и (4.3) являются в этом случае соотношением долей θ_X из уравнения (4.4).

Мольная доля связанных молекул типа X представляет собой отношение концентраций:

$$f_i = \frac{x_{\text{bound}}^{(i)}}{x_0}, \quad (4.6)$$

где $x_{\text{bound}}^{(i)}$ — концентрация лиганда типа X , связанного с ДНК, x_0 — общая концентрация лиганда типа X . Верхний индекс i показывает, какую систему уравнений закона сохранения массы необходимо выбрать для расчета мольных долей (в зависимости от обнуления тех или иных констант). В работе [211] показано, что в общем случае соответствующая f_i доля $\theta_X^{(i)}$ может быть представлена в виде простого отношения:

$$\theta_X^{(i)} = \frac{x_{\text{bound}}^{(i)}}{N_0}, \quad (4.7)$$

Сопоставляя (4.6) и (4.7), получим

$$f_i = \theta_X^{(i)} \frac{N_0}{x_0}. \quad (4.8)$$

Таким образом, с учетом выражения (4.8) можно несколько упростить выражения для расчета факторов (4.2) и (4.3):

$$R_D = \frac{\theta_X^{(0)} - \theta_X^{(C)}}{\theta_X^{(0)} - \theta_X^{(H)}}, \quad A_D = \frac{\theta_X^{(0)} - \theta_X}{\theta_X^{(0)}}. \quad (4.9)$$

Таким образом, для определения значений факторов R_D , A_D достаточно вычислить доли $\theta_X^{(i)}$, решая системы уравнений (4.4), (4.5) при различных комбинациях «включенных» и «отключенных» механизмов действия. Этот результат является достаточно важным, поскольку позволяет выразить факторы R_D , A_D в терминах общепринятых в молекулярной биофизике долей θ_X .

4.2. Верификация уравнений обобщенной теории ИПД [204]

Рассмотрим, в какой мере выведенные в предыдущем подразделе уравнения баланса массы (4.4) соответствуют реальному динамическому равновесию на примере простейшей трехкомпонентной системы Препарат — Интерцептор — ДНК. Процедура верификации заключается в определении степени отклонения концентрационной зависимости экспериментально наблюдаемого параметра, рассчитанной по модели, от экспериментально измеренной. Для этого в модель (4.4), (4.5) подставляются равновесные константы комплексообразования, полученные из данных независимых экспериментов в двухкомпонентных системах, рассчитывается теоретическая кривая титрования и далее оценивается значение квадратичной функции невязки Δ , рассчитываемое по формуле (2.3), т.е. отклонение теоретической кривой от экспериментальной. Непосредственным критерием адекватности подобранной модели является коэффициент детерминации R^2 (формула (2.4)), поскольку простое сравнение значений Δ для различных кривых может привести к неверному результату вследствие существенного различия величин наблюдаемых параметров для различных веществ.

Как уже отмечалось (см. раздел 2), одним из наиболее подходящих методов исследования полимерной ДНК и ее взаимодействия с малыми молекулами является УФ/видимая спектроскопия. В целях верификации уравнений обобщенной теории ИПД были проведены эксперименты титрованием в трехкомпонентных системах Бромистый этидий (EB) — Кофеин (CAF) — ДНК и Профлавин (PF) — Кофеин (CAF) — ДНК. Выбор этих веществ обусловлен тем, что их взаимодействие с полимерной ДНК достаточно хорошо изучено на сегодняшний день, в том числе и с количественной стороны. В указанных трехкомпонентных системах веществом-интерцептором выступал кофеин, как наиболее типичное соединение-интерцептор (см. раздел 1). Кроме того, оптический спектр поглощения кофеина целиком лежит в ультрафиолетовой области, что исключает проблему перекрывания спектров в численном анализе. С целью однозначного определения констант гетероассоциации бромистого этидия и профлавина с кофеином были также по-

ставлены эксперименты соответственно в двухкомпонентных системах EB-CAF и PF-CAF в идентичных экспериментальных условиях. Во всех описываемых экспериментах изменялась концентрация кофеина.

4.2.1. Модификация уравнений теории обобщенной ИПД для анализа спектрофотометрических данных в трехкомпонентной ДНК-содержащей системе [204]

Для количественного анализа экспериментальных данных титрования необходимо установить функциональную взаимосвязь регистрируемого в эксперименте параметра и концентраций различных комплексов в растворе. Для исследуемых систем Препарат (X) — Кофеин (Y) — ДНК (N) при малых спектрофотометрических концентрациях Препарата можно за основу взять модель $1:n$ гетероассоциации, выведенную в предыдущем разделе.

Итак, закон сохранения массы в двухкомпонентной системе Препарат — Кофеин задается уравнениями (3.88). Подставляя в систему (4.4) уравнения из (3.88), получим следующую систему уравнений для анализа трехкомпонентного равновесия:

$$\begin{cases} x_0 = x_1 \left(1 + \frac{K_h y_1}{1 - K_Y y_1} + \frac{K_h^2 y_1^2}{(1 - K_Y y_1)^2 (1 + K_Y y_1)} \right) + \theta_X N_0 \\ y_0 = \frac{y_1}{(1 - K_Y y_1)^2} \left(1 + K_h x_1 + K_h^2 x_1 y_1 \frac{2 + K_Y y_1 + K_Y^2 y_1^2}{(1 - K_Y y_1)(1 + K_Y y_1)^2} \right) + \theta_Y N_0 \end{cases} \quad (4.10)$$

При этом мольные доли θ_X , θ_Y рассчитываются из системы уравнений МакГи — фон Хиппеля [124,210] вида (4.5):

$$\begin{cases} \theta_X = K_{XN} x_1 (1 - n_X \theta_X - n_Y \theta_Y) \left(\frac{1 - n_X \theta_X - n_Y \theta_Y}{1 - (n_X - 1)\theta_X - (n_Y - 1)\theta_Y} \right)^{n_X - 1} \\ \theta_Y = K_{YN} y_1 (1 - n_X \theta_X - n_Y \theta_Y) \left(\frac{1 - n_X \theta_X - n_Y \theta_Y}{1 - (n_X - 1)\theta_X - (n_Y - 1)\theta_Y} \right)^{n_Y - 1} \end{cases} \quad (4.11)$$

Благодаря свойству аддитивности оптической плотности наблюдаемый параметр Препарата $A_X^{(\text{het})}$ в двухкомпонентной системе Препарат — Кофеин можем записать в следующем виде [188,204,205]:

$$\begin{aligned} A_X^{(\text{het})} &= \varepsilon_X^{(m)} x_{\text{het}} - \left(\varepsilon_X^{(m)} - \varepsilon_X^{(h)} \right) \frac{\partial Z_{\text{het}}}{\partial \ln K_h} = \\ &= \varepsilon_X^{(m)} x_{\text{het}} - \left(\varepsilon_X^{(m)} - \varepsilon_X^{(h)} \right) \frac{K_h x_1 y_1}{1 - K_Y y_1} \left(1 + \frac{2K_h y_1}{1 - K_Y^2 y_1^2} \right), \end{aligned} \quad (4.12)$$

где Z_{het} — большая статистическая сумма двухкомпонентной системы в предположении 1:n гетероассоциации (см. выражение (3.87)), $\varepsilon_X^{(m)}$ и $\varepsilon_X^{(h)}$ — коэффициенты экстинкции молекул Препарата, находящихся в мономерной форме и в составе гетеродимера соответственно.

Молекулы Препарата, образуя комплексы с ДНК, вносят дополнительный вклад в общую наблюдаемую оптическую плотность A_X трехкомпонентной системы. Как и ранее, предполагая аддитивность наблюдаемого параметра, имеем [188,204,205]:

$$A_X = \varepsilon_X^{(\text{het})} x_{\text{het}} + \varepsilon_X^{(b)} \theta_X N_0 \quad (4.13)$$

или в развернутом виде

$$A_X = \varepsilon_X^{(m)} x_0 - \left(\varepsilon_X^{(m)} - \varepsilon_X^{(h)} \right) \frac{K_h x_1 y_1}{1 - K_Y y_1} \left(1 + \frac{2K_h y_1}{1 - K_Y^2 y_1^2} \right) - \left(\varepsilon_X^{(m)} - \varepsilon_X^{(b)} \right) \theta_X N_0, \quad (4.14)$$

где $\varepsilon_X^{(\text{het})} = \frac{A_X^{(\text{het})}}{x_{\text{het}}}$, $\varepsilon_X^{(b)}$ — коэффициент экстинкции молекулы Препарата, находящейся в комплексе с ДНК.

Таким образом, уравнения (3.88), (4.12) для систем Препарат — Кофеин и (4.10), (4.11), (4.14) для систем Препарат — Кофеин — ДНК однозначно задают функциональную взаимосвязь между динамическим равновесием в этих системах и регистрируемой в них же оптической плотностью Препарата. Эти выражения позволяют проводить аппроксимацию зависимостей оптической плотности Препарата от концентрации другого компонента системы.

4.2.2. Система Бромистый этидий — Кофеин — ДНК

На рисунке 4.1 представлены спектры поглощения бромистого этидия в его смеси с кофеином (слева) и в смеси с кофеином и ДНК (справа). В обеих сериях экспериментов концентрация бромистого этидия поддерживалась постоянной и составляла $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Концентрация пар оснований ДНК определялась спектрофотометрически по их поглощению на длине волны 260 нм и составила $2.89 \cdot 10^{-5}$ моль/л (здесь и далее для определения концентрации ДНК под обозначением моль/л будем понимать размерность моль пар оснований на литр).

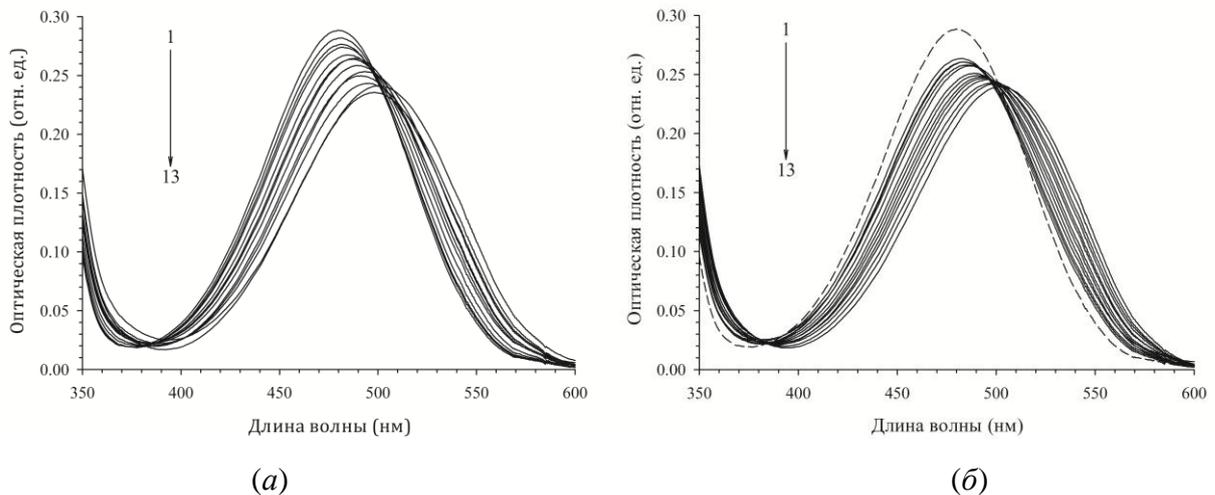


Рисунок 4.1. Электронные спектры поглощения растворов бромистого этидия ($x_0 = 50$ мкмоль/л) с кофеином (а) и с кофеином и ДНК ($N_0 = 28.9$ мкмоль/л) (б) в буферном растворе при рН = 6,86 и постоянной температуре $T = 298$ К. Стрелками указаны: 1 — спектр с нулевой концентрацией кофеина, 13 — спектр с наибольшей концентрацией кофеина. На рисунке (б) пунктирной линией изображен спектр чистого красителя.

Из сравнения двух наборов спектров четко видно достаточно сильное взаимодействие как между бромистым этидием и кофеином, так и между бромистым этидием и ДНК. Четко прослеживается гипохромный эффект при взаимодействии ЕВ с САФ и ДНК при одновременном батохромном сдвиге полосы поглощения бромистого этидия, что свидетельствует об образовании комплексов, стабилизированных вертикальными π - π взаимодействиями.

Аппроксимации подвергался не весь набор спектров, а лишь значения оптической плотности растворов различной концентрации, снятой на максимуме поглощения свободного бромистого этидия (480 нм). Соответствующие экспериментальные кривые для систем EB-CAF и EB-CAF-ДНК представлены точками на рисунке 4.2.

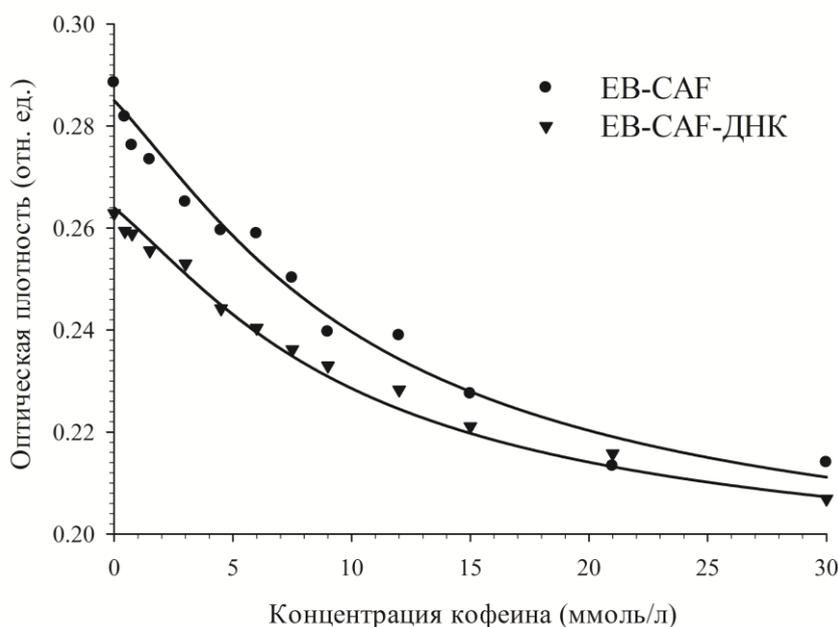


Рисунок 4.2. Зависимости оптической плотности растворов с бромистым этидием от концентрации кофеина на длине волны 480 нм. Точками указаны экспериментальные данные, сплошными линиями — аппроксимация.

Аппроксимация данных заключалась в минимизации квадратичной функции невязки вида (2.3). Для двухкомпонентной системы EB-CAF аппроксимация состояла в подборе методом Левенберга — Марквардта значений константы гетероассоциации K_h и коэффициента экстинкции ϵ_h , удовлетворяющих одновременно всем точкам зависимости EB-CAF на рисунке 4.2. Аппроксимирующей моделью являлось выражение (4.12). Значение равновесной константы самоассоциации кофеина в расчетах здесь и далее было взято из работы [66]: $K_Y = 12.2$ л/моль. В итоге были получены следующие значения: $K_h = 96.5$ л/моль (это значение достаточно неплохо согласуется с результатами в работах [63,66,67], где оно составило 85, 71 и 56 л/моль соответственно); $\epsilon_h = 4665$ л/(моль·см); коэффициент детерми-

нации, определяемый по формуле (2.4), составил 0.978. Несколько отличное значение константы гетероассоциации K_h может быть объяснено тем, что в работах [63,66,67] и в настоящем исследовании расчеты проводились по различным моделям (например, в работах [66,67] использовалась димерная модель гетероассоциации).

Полученные значения K_h и ε_h подставлялись в процедуру расчета кривой титрования в тройной системе EB-CAF-ДНК по выражению (4.14). Равновесные параметры комплексообразования кофеина и бромистого этидия с ДНК соответственно были взяты из работы [66]: $K_{XN} = 232000$ л/моль, $n_x = 3.6$, $K_{YN} = 127$ л/моль, $n_y = 1.7$, $\varepsilon_m - \varepsilon_b = 3200$ л/(моль·см). Значение ε_m было принято равным 5700 л/(моль·см). Экспериментальные точки по системе EB-CAF-ДНК и соответствующая аппроксимирующая кривая также приведены на рисунке 4.2. В таблице 4.1 приведены численные результаты аппроксимации.

Аппроксимация экспериментальных данных по системе EB-CAF-ДНК проводилась по двум стратегиям: 1) расчет функции невязки (2.3) при фиксированных (fix) значениях параметров K_h , K_{XN} , ε_h , ε_b ; и 2) расчет той же функции невязки, но уже при варьируемых (var) тех же параметрах. Стратегия 2 необходима для оценки того, насколько фиксированные значения параметров, использованные в стратегии 1, близки к глобальному минимуму квадратичной функции невязки.

Таблица 4.1 — Результаты аппроксимации зависимости оптической плотности смеси EB-CAF-ДНК от концентрации CAF

Параметр	McGhee — von Hippel		Scatchard	
	fix	var	fix	var
K_h , л/моль	96.5	95.0	96.5	91.5
K_{XN} , л/моль	232000	102001	232000	202000
ε_h , л/(моль·см)	4665	4626	4665	4663
ε_b , л/(моль·см)	2500	2023	2500	2448
R^2	0.990	0.995	0.985	0.991

В первом столбце таблицы 4.1 (McGhee — von Hippel fix) приведены исходные значения параметров и значения коэффициента детерминации R^2 при фиксированном значении $N_0 = 28.9$ мкмоль/л. Во втором столбце (McGhee — von Hippel var) приведены оптимизированные значения параметров K_h , K_{xN} , ε_h , ε_b также при фиксированной концентрации ДНК N_0 . Обращает на себя внимание доходящее до более чем двукратного различие в константах комплексообразования ЕВ-ДНК, однако оно не является принципиальным, поскольку изменение константы в 2 раза вносит изменение в энергетику комплексообразования всего лишь около 0.4 ккал/моль.

В целом, результаты аппроксимации являются удовлетворительными, о чем свидетельствуют значения коэффициентов детерминации R^2 . Несущественные отличия в значениях подгоночных параметров, представленных в таблице 4.1, позволяют констатировать, что верификация модели (4.10), (4.11), (4.14) проведена успешно.

4.2.3. Система Профлавин — Кофеин — ДНК

Спектры поглощения для двух- и трехкомпонентных систем с профлавином приведены на рисунке 4.3. В обеих сериях экспериментов концентрация профлавина поддерживалась постоянной и составляла $1.3 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Концентрация ДНК, как и ранее, определялась спектрофотометрически и составила $1.95 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Изменения в спектрах при изменении концентрации кофеина в целом подобны тем изменениям, что наблюдались в аналогичных спектрах растворов с бромистым этидием (см. рисунок 4.1). Это позволяет однозначно судить о наличии взаимодействия между всеми компонентами смеси.

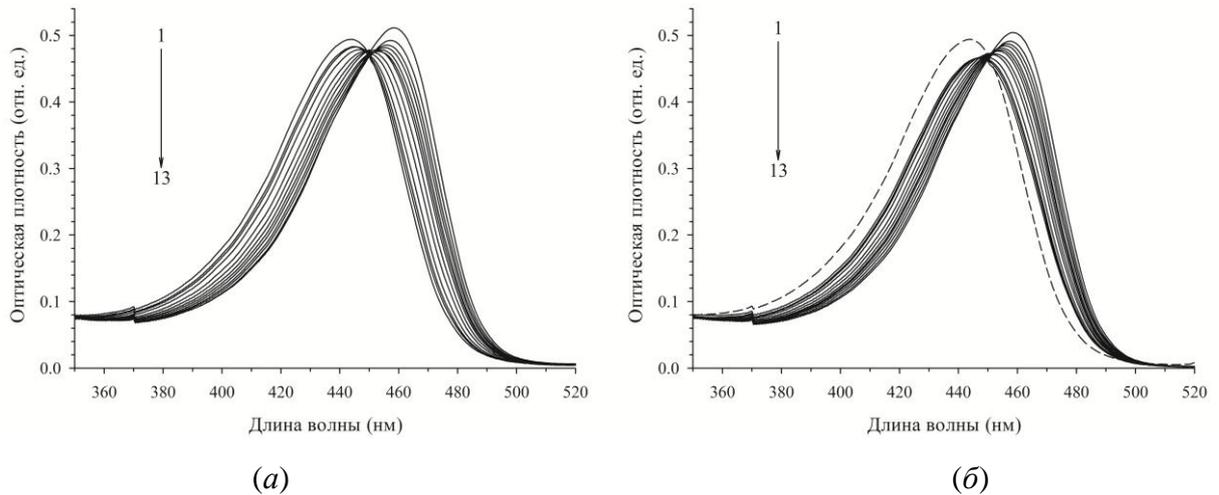


Рисунок 4.3. Электронные спектры поглощения растворов профлавина ($x_0 = 13$ мкмоль/л) с кофеином (а) и с кофеином и ДНК ($N_0 = 19.5$ мкмоль/л) (б) в буферном растворе при $\text{pH} = 6,86$ и постоянной температуре $T = 298$ К. Стрелками указаны: 1 — спектр с нулевой концентрацией кофеина, 13 — спектр с наибольшей концентрацией кофеина. На рисунке (б) пунктирной линией изображен спектр чистого красителя.

На рисунке 4.4 представлены концентрационные зависимости оптической плотности растворов смеси профлавина с кофеином и ДНК на длине волны, соответствующей максимуму поглощения чистого красителя.

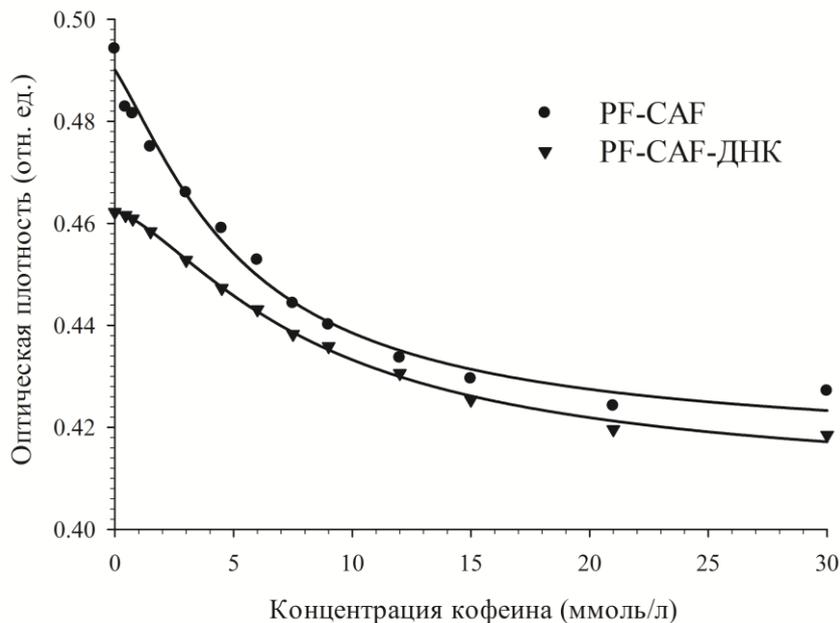


Рисунок 4.4. Зависимость оптической плотности растворов с профлавином от концентрации кофеина на длине волны 444 нм.

Аппроксимация экспериментальных зависимостей профлавина проводилась по описанной выше для бромистого этидия схеме. Сначала были получены равновесные параметры гетероассоциации в двухкомпонентной системе PF-CAF, которые составили: $K_h = 192.4$ л/моль и $\varepsilon_h = 34689$ л/(моль·см) ($R^2 = 0.987$). Заметим, что значение константы гетероассоциации согласуется со значением 160 л/моль, полученным ранее на основании анализа данных ЯМР-эксперимента в работе [71].

Равновесные параметры комплексообразования профлавина с ДНК были взяты из работы [182]: $K_{XN} = 41000$ л/моль, $n_x = 2.4$, $\varepsilon_m - \varepsilon_b = 10400$ л/(моль·см). Значение ε_m было принято равным 37700 л/(моль·см). Результаты аппроксимации кривой PF-CAF-ДНК приведены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 — Результаты аппроксимации зависимости оптической плотности смеси PF-CAF-ДНК от концентрации CAF

Параметр	McGhee — von Hippel		Scatchard	
	fix	var	fix	var
K_h , л/моль	192.4	178.2	192.4	161.8
K_{XN} , л/моль	41000	99774	41000	33138
ε_h , л/(моль·см)	34689	34370	34689	34325
ε_b , л/(моль·см)	27300	31400	27300	17172
R^2	0.938	0.998	0.817	0.998

Как и для бромистого этидия, аппроксимация экспериментальных данных по системе PF-CAF-ДНК проводилась по двум стратегиям: расчет с фиксированными значениями параметров K_h , K_{XN} , ε_h , ε_b и расчет с варьируемыми значениями тех же параметров. Из таблицы видно, что значения подгоночных параметров в целом согласуются друг с другом; двукратное изменение величины константы K_{XN} не является существенным (см. выше), что вместе с достаточно высокими значениями коэффициентов детерминации указывает на успешную верификацию модели (4.10), (4.11), (4.14) на примере данных PF-CAF-ДНК и, в целом, свидетельствует об адекватности предложенной модели (4.10), (4.11), (4.14) к описанию

Данная система линейных относительно θ_i уравнений легко может быть переписана в матричном виде:

$$(\mathbf{I} + \boldsymbol{\chi}^T \mathbf{1}) \boldsymbol{\theta}^T = \boldsymbol{\chi}^T, \quad (4.15)$$

где $\boldsymbol{\chi} = (K_{1N}C_1 \quad K_{2N}C_2 \quad \dots \quad K_{NN}C_N)$, $\boldsymbol{\theta} = (\theta_1 \quad \theta_2 \quad \dots \quad \theta_N)$, \mathbf{I} — единичная матрица, $\mathbf{1}$ — вектор-строка, состоящая из единиц. Решение матричного уравнения (4.15) относительно вектора-строки $\boldsymbol{\theta}$ дается в виде:

$$\begin{aligned} \boldsymbol{\theta} &= \boldsymbol{\chi} (\mathbf{I} + \mathbf{1}^T \boldsymbol{\chi})^{-1} = \boldsymbol{\chi} (\mathbf{I} - \mathbf{1}^T \boldsymbol{\chi} + \mathbf{1}^T \boldsymbol{\chi} \mathbf{1}^T \boldsymbol{\chi} - \mathbf{1}^T \boldsymbol{\chi} \mathbf{1}^T \boldsymbol{\chi} \mathbf{1}^T \boldsymbol{\chi} + \dots) = \\ &= (\mathbf{I} - \boldsymbol{\chi} \mathbf{1}^T + \boldsymbol{\chi} \mathbf{1}^T \boldsymbol{\chi} \mathbf{1}^T - \boldsymbol{\chi} \mathbf{1}^T \boldsymbol{\chi} \mathbf{1}^T \boldsymbol{\chi} \mathbf{1}^T + \dots) \boldsymbol{\chi} = (\mathbf{I} + \boldsymbol{\chi} \mathbf{1}^T)^{-1} \boldsymbol{\chi}. \end{aligned}$$

Далее, замечая, что $\boldsymbol{\chi} \mathbf{1}^T = \sum_{k=1}^N K_{kN} C_k$, получим в скалярном виде:

$$\theta_i = \frac{K_{iN} C_i}{1 + \sum_{k=1}^N K_{kN} C_k}. \quad (4.16)$$

В таком виде доли θ_i могут подставляться в систему уравнений баланса массы в многокомпонентной системе ДНК-связывающихся БАС (4.1).

Для более наглядного сравнения уравнений (4.16) с системой (1.5) из работы [102], где исследовалось связывание с тетрамерными последовательностями ДНК, положим в первой системе $N = 2$, тогда получим:

$$\begin{cases} \theta_X = \frac{K_{XN} x_1}{1 + K_{XN} x_1 + K_{YN} y_1} \\ \theta_Y = \frac{K_{YN} y_1}{1 + K_{XN} x_1 + K_{YN} y_1} \end{cases}. \quad (4.17)$$

Уравнения, входящие в систему (4.17) являются функциональным выражением изотерм Ленгмюра. В молекулярной биофизике эти уравнения являются частным случаем линейных уравнений Скэтчарда [128]. Далее, деление на четыре (поскольку в данном случае $l = 4$) общей концентрации ДНК N_0 даст концентрацию тетрамерных участков N_0^{tet} , т.е. $N_0^{\text{tet}} = N_0/4$. С учетом этого простого соотношения, подставляя (4.17) в (4.4), фактически исключаются уравнения (4.5), а система (4.4) приобретает вид системы (1.5).

Для верификации полученного результата приведем результаты расчета параметров K_h , K_{XN} , ε_h , ε_b по экспериментальным данным EB-CAF-ДНК и PF-CAF-ДНК (см. предыдущий подраздел) по модели (4.10), (4.14), в которую были подставлены выражения (4.17). Протокол расчета целиком аналогичен описанному выше, при этом концентрация тетрамерных участков ДНК принималась равной $N_0/4 = 7.225$ мкмоль/л для системы с бромистым этидием и $N_0/4 = 4.875$ мкмоль/л для системы с профлавином. В третьем столбце (Scatchard fix) таблиц 4.1 и 4.2 приведены еще раз исходные значения параметров, а также коэффициентов детерминации. В последнем, четвертом, столбце (Scatchard var) приведены значения оптимизированных параметров. Как видно, наблюдается хорошее соответствие между результатами расчета по модели МакГи — фон Хиппеля с концентрацией N_0 и расчета по модели Скэтчарда, где концентрация биорецептора меньше в четыре раза.

С целью дополнительной верификации значений используемых концентраций ДНК в экспериментах по EB-CAF-ДНК и PF-CAF-ДНК проводилась подгонка N_0 при фиксированных остальных четырех параметрах (K_h , K_{XN} , ε_h , ε_b) по моделям МакГи — фон Хиппеля и Скэтчарда. Результаты показаны соответственно в первом и третьем столбцах таблицы 4.3. Во втором и четвертом столбцах приведены значения N_0 при зафиксированных оптимизированных значениях параметров K_h , K_{XN} , ε_h , ε_b . Значения концентраций тетрамерных участков в третьем и четвертом столбцах практически совпадают с исходными значениями (7.225 мкмоль/л для систем с EB и 4.875 мкмоль/л для систем с PF), что указывает на справедливость сделанного выше утверждения о том, что деление на четыре общей концентрации полимерной ДНК дает концентрацию тетрамерных участков. Исключение составляет лишь случай Scatchard fix для профлавина, однако, эти данные не являются надежными, поскольку коэффициент детерминации в этом случае ниже (то же самое прослеживается и в третьем столбце таблицы 4.2).

Таблица 4.3 — Результаты подгонки концентрации ДНК при различных фиксированных параметрах комплексообразования в системах EB-CAF-ДНК и PF-CAF-ДНК

Лиганд	Параметр	McGhee — von Hippel		Scatchard	
		fix	var	fix	var
EB	N_0 , моль/л	$3.11 \cdot 10^{-5}$	$3.00 \cdot 10^{-5}$		
	$N_0/4$, моль/л			$7.22 \cdot 10^{-6}$	$7.64 \cdot 10^{-6}$
	R^2	0.994	0.996	0.985	0.993
PF	N_0 , моль/л	$1.68 \cdot 10^{-5}$	$1.95 \cdot 10^{-5}$		
	$N_0/4$, моль/л			$9.44 \cdot 10^{-6}$	$4.88 \cdot 10^{-6}$
	R^2	0.952	0.998	0.962	0.998

Заметим, что описанные выше рассуждения и вычислительные эксперименты могут быть с равным успехом применены и к нуклеотидным последовательностям произвольной длины l . Все, что необходимо, в этом случае, это разделить на l исходную концентрацию ДНК N_0 , выраженную в моль пар оснований на литр.

Таким образом, путем перехода от уравнений МакГи — фон Хиппеля вида (4.5) к уравнениям вида (4.16) для расчета долей θ_i в системе (4.4) может быть осуществлена трансформация обобщенной теории ИПД к олигомерной теории. Это означает, что последняя является частным случаем обобщенной теории ИПД.

4.3.2. Ре-параметризация уравнений обобщенной теории ИПД

Для того чтобы иметь возможность применять обобщенную теорию ИПД к исследованию конкурентного связывания в биологических системах в условиях *in vitro*, в работе [102] были подобраны подходящие концентрации компонентов x_0 , y_0 , N_0^{tet} (см. выражения (4.1)) в предположении того, что значения равновесных констант гетероассоциации молекул и их комплексообразования с ДНК, полученные из независимых физико-химических экспериментов, сохраняются при переходе к биологической системе. Набор таких концентраций ранее был определен как квазифизиологические условия [1,74,102]. Необходимо отметить, что концен-

трации (4.1) были получены с помощью олигомерной теории ИПД (см. раздел 1) [1,72,102] на основании анализа данных *in vitro* эксперимента на лейкемических клетках человека по изучению снижения токсичности антибиотиков доксорубицина (DOX) и митоксантрона (NOV) при добавлении кофеина [22] и недавно подтверждены при количественном описании концентрационно-зависимого апоптоза клеток в системах, содержащих противораковый агент топотекан [74]. Выше было показано, что олигомерная теория ИПД является частным случаем обобщенной теории, поэтому величины ошибок в количественном описании конкурентного связывания в ДНК-содержащих системах при переходе от одной теории к другой не будут статистически значимыми. Таким образом, умножая исходную концентрацию тетрамеров ДНК на четыре, т.е. $N_0 = 4N_0^{\text{tet}}$, можно получить набор квазифизиологических условий для обобщенной теории ИПД в следующем виде:

$$x_0 = 10 \text{ мкмоль/л}, y_0 \text{ — var}, N_0 = 40 \text{ мкмоль/л}. \quad (4.18)$$

Заметим, что в работах [1,74,102] вывод условий (4.1) был выполнен с учетом значений равновесных констант, полученных на основании данных ЯМР-экспериментов, однако константы связывания лигандов с олигомерами ДНК, вообще говоря, отличны от констант и их связывания с полимерной ДНК, которые, в свою очередь, должны быть использованы в обобщенной теории ИПД. Таким образом, необходимо провести проверку квазифизиологических условий (4.18) по протоколу, представленному в работах [74,94,102], но уже с использованием микроскопических констант связывания лигандов с полимерной ДНК (см. таблицы 4.2 и 4.3).

При добавлении кофеина в концентрации 5 ммоль/л в клеточную линию изменение процента подвергнувшихся апоптозу клеток, отнесенное к собственной биологической активности антибиотиков DOX и NOV составило соответственно $A_D(\text{DOX}) = 39\%$ и $A_D(\text{NOV}) = 50\%$ [102]. Значение фактора A_D , равное примерно 50%, позволяет подогнать порядок величин квазифизиологических концентраций (т.е. параметризовать модель) для их дальнейшего использования при определении относительного изменения фактора A_D для различных ДНК-содержащих

систем. Подстановка концентраций (4.18) в выражения (4.4) и затем в (4.9) дает значение фактора A_D , близкое к 50%, что подтверждает уместность использования условий (4.18) в обобщенной теории ИПД.

На рисунке 4.5 изображены зависимости факторов R_D , A_D от концентрации кофеина в трехкомпонентных системах Препарат — Кофеин — ДНК, полученные по формулам (4.9). При этом использовались микроскопические константы гетероассоциации и комплексообразования лигандов с полимерной ДНК, полученные спектрофотометрическим методом (см. таблицу 4.4), а также квазифизиологические условия (4.18).

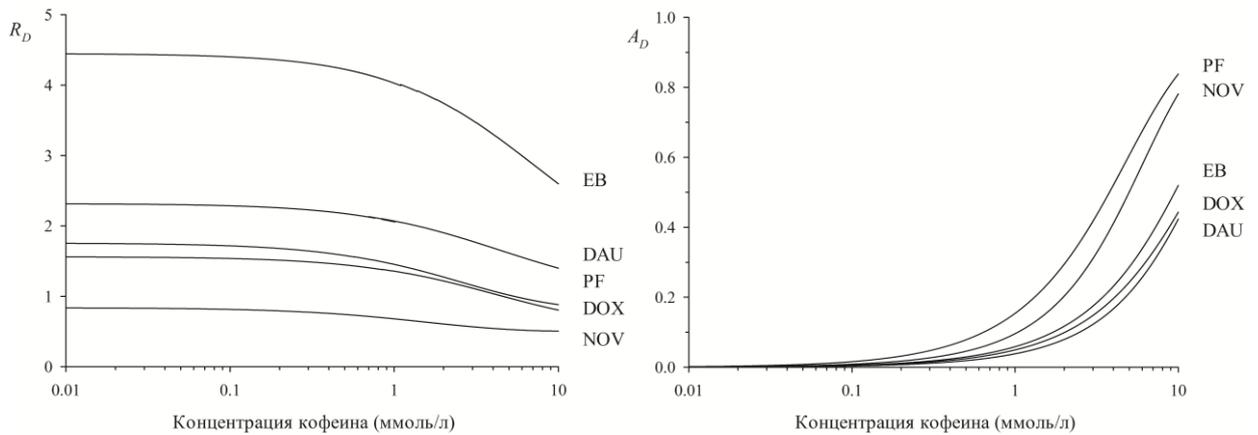


Рисунок 4.5. Факторы R_D и A_D как функции концентрации кофеина при квазифизиологических условиях $x_0 = 10$ мкмоль/л и $N_0 = 40$ мкмоль/л.

Из рисунка 4.5 видно, что расчетные зависимости факторов R_D и A_D , а также последовательность кривых A_D в виде $PF \rightarrow NOV \rightarrow EB \rightarrow DOX \rightarrow DAU$, отражающая чувствительность биологического эффекта препарата к добавлению кофеина, в целом совпадают с таковыми из работы [102]. Это дополнительно подтверждает адекватность условий (4.18) для применения их в рамках обобщенной теории ИПД.

Таблица 4.4 — Равновесные параметры комплексообразования ароматических лигандов с кофеином и ДНК

Лиганд	K_h , л/моль	$K_{XN} \times 10^5$, л/моль	n_X
PF	192.4	0.41 [182]	2.4 [182]
NOV	356.4 [59]	2.52 [212]	2.6 [212]
EB	96.5 [66]	2.32 [66]	3.6 [66]
DOX	128.3 [59]	2.90 [100]	1.8 [100]
DAU	148.5 [26]	6.70 [213]	3.3 [213]

4.3.3. Теория ИПД без учета протекторного механизма [214]

Ряд исследователей полагают, что при условии малости значения константы комплексообразования интерцептора с ДНК [50,61] либо невозможности проведения качественного независимого эксперимента в системе Интерцептор — ДНК с целью установления точного значения этой константы [22,215] вклад протекторного механизма в общее синергетическое взаимодействие в смеси препаратов является пренебрежимо малым [22,26,47,50,59-63,100,215], поэтому из рассмотрения его можно исключить вовсе. Такое упрощение выражается в исключении из уравнений закона сохранения массы (4.4) всех слагаемых, ответственных за комплексообразование интерцепторов с ДНК. Данный случай можно рассматривать как частный случай теории ИПД.

Типичным примером, относящимся к данному случаю, являются трехкомпонентные системы Препарат — Хлорофиллин — ДНК, исследованные в работах [47,50]. Авторы [47], ссылаясь на пренебрежимо малое взаимодействие Хлорофиллин — ДНК, описывают корреляцию констант гетероассоциации Препарат — Хлорофиллин с наблюдаемым биологическим откликом штамма TA98 бактерий *Salmonella typhimurium*, что является прототипом количественного описания интерцепторного действия хлорофиллина.

Учтем, что, как было показано выше, уравнения МакГи — фон Хиппеля и Скэтчарда принципиально взаимозаменяемы в приближении отсутствия учета протекторного механизма, следовательно, для упрощения выкладок можно воспользоваться уравнениями олигомерной теории ИПД (см. подраздел 1.5). Учтем

также, что в рамках квазифизиологических условий концентрации лигандов достаточно малы (мкмоль/л и нмоль/л [47,62]). Соответствующее упрощение исходных уравнений (1.5) баланса массы олигомерной теории ИПД дает следующую систему уравнений:

$$\begin{cases} x_1 + K_h x_1 y_1 + \frac{K_{XN} x_1}{1 + K_{XN} x_1} N_0 = x_0 \\ y_1 + K_h x_1 y_1 = y_0 \end{cases} \quad (4.19)$$

Система (4.19) может быть переписана в виде алгебраического уравнения третьей степени:

$$\begin{aligned} & K_h K_{XN} x_1^3 + (K_h + K_{XN} + K_h K_{XN} (y_0 + N_0 - x_0)) x_1^2 + \\ & + (1 + K_h (y_0 - x_0) + K_{XN} (N_0 - x_0)) x_1 - x_0 = 0 \end{aligned} \quad (4.20)$$

Поскольку типичные нетоксические исходные концентрации препаратов имеют порядок мкмоль/л и нмоль/л, а мономерные концентрации еще меньше исходных, в уравнении (4.20) можно пренебречь членами второго и третьего порядков. Это позволяет в явном виде выразить x_1 и записать выражения для мольных долей

$$f_c^x = \frac{K_{XN} x_1}{1 + K_{XN} x_1} \frac{N_0}{x_0}, \text{ необходимых для расчета фактора } A_D \text{ в виде (4.3) (в условиях}$$

отсутствия протекторного механизма фактор R_D теряет смысл):

$$f_c^x = \frac{K_{XN} N_0}{1 + K_h (y_0 - x_0) + K_{XN} N_0}. \quad (4.21)$$

Примем далее $K_h = 0$ и рассчитаем мольную долю f_0^x :

$$f_0^x = \frac{-1 - K_{XN} (N_0 - x_0) + \sqrt{(1 + K_{XN} (N_0 - x_0))^2 + 4K_{XN} x_0}}{1 - K_{XN} (N_0 - x_0) + \sqrt{(1 + K_{XN} (N_0 - x_0))^2 + 4K_{XN} x_0}}. \quad (4.22)$$

Применим квазифизиологические условия ($N_0 \approx x_0$, $y_0 \gg x_0$ [102]), тогда:

$$\begin{aligned} A_D &= 1 - \frac{f_c^x}{f_0^x} = 1 - \frac{K_{XN} x_0}{1 + K_h (y_0 - x_0) + K_{XN} x_0} \frac{\sqrt{1 + 4K_{XN} x_0} + 1}{\sqrt{1 + 4K_{XN} x_0} - 1} = \\ &= 1 - \frac{1}{1 + K_h (y_0 - x_0) + K_{XN} x_0} \frac{\sqrt{1 + 4K_{XN} x_0} + 2K_{XN} x_0 + 1}{2}; \end{aligned}$$

Пренебрегая в последнем выражении произведением $K_{xN}x_0$, получим:

$$A_D \approx \frac{K_h y_0}{1 + K_h y_0}. \quad (4.23)$$

Уравнение (4.23) является частным случаем теории ИПД для исследования нативных систем с отсутствием протекторного механизма действия интерцептора. Применение этого уравнения для анализа данных биологических экспериментов из работы [47] будет показано ниже.

4.3.4. Теория ИПД без учета интерцепторного механизма.

Анализ мультимодального связывания бромистого этидия с ДНК [216]

Существуют экспериментальные доказательства так называемого мультимодального связывания лигандов с ДНК [217], когда один и тот же лиганд может связываться с биополимером различными способами (например, интеркаляционно или путем укладки в малую бороздку ДНК). При этом лиганды, связывающиеся различными модами, могут конкурировать друг с другом за места посадки на ДНК, поскольку последние могут перекрываться. Этот случай формально может быть описан с помощью обобщенной теории ИПД в системе, в которой подразумевается отсутствие интерцепторного механизма действия. Покажем, что уравнения закона сохранения массы (4.4), (4.5) в предложенной обобщенной теории ИПД могут также быть сведены к этому частному случаю.

Для $(N + 1)$ -компонентной ДНК-содержащей системы в предположении того, что каждый i -й лиганд может связываться с ДНК числом мод m_i , система N уравнений закона сохранения массы (4.4) примет вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} C_1^{(0)} = \frac{\partial Z_{\text{het}}}{\partial \ln C_1} + \sum_{j=1}^{m_1} \theta_{1(j)} N_0 = C_1 + \sum_{j=1}^{m_1} \theta_{1(j)} N_0 \\ C_2^{(0)} = \frac{\partial Z_{\text{het}}}{\partial \ln C_2} + \sum_{j=1}^{m_2} \theta_{2(j)} N_0 = C_2 + \sum_{j=1}^{m_2} \theta_{2(j)} N_0 \\ \dots \\ C_i^{(0)} = \frac{\partial Z_{\text{het}}}{\partial \ln C_i} + \sum_{j=1}^{m_i} \theta_{i(j)} N_0 = C_i + \sum_{j=1}^{m_i} \theta_{i(j)} N_0 \\ \dots \\ C_N^{(0)} = \frac{\partial Z_{\text{het}}}{\partial \ln C_N} + \sum_{j=1}^{m_N} \theta_{N(j)} N_0 = C_N + \sum_{j=1}^{m_N} \theta_{N(j)} N_0 \end{array} \right. , \quad (4.24)$$

где индекс j указывает на ту или иную моду связывания, а доли $\theta_{i(j)}$ находятся, в

свою очередь, из системы $\sum_{i=1}^N m_i$ уравнений (4.5) МакГи — фон Хиппеля. При

этом, исходя из того, что лиганд проявляет свою биологическую активность при любом типе связывания, для дальнейшего расчета фактора A_D с помощью выра-

жений (4.9) вместо θ_x необходимо использовать сумму $\sum_{j=1}^{m_i} \theta_{x(j)}$. Следствием от-

сутствия учета интерцепторного механизма является редуцирование исходной большой статистической суммы к сумме мономерных концентраций, т.е.

$Z_{\text{het}} = \sum_{i=1}^N C_i$, приводящее к дальнейшему упрощению уравнений (4.24).

В настоящей работе принципиальная возможность получения термодинамических параметров мультимодального связывания ароматических лигандов с ДНК из уравнений обобщенной теории ИПД вида (4.24) была продемонстрирована на примере связывания бромистого этидия (ЕВ) с ДНК. Для решения этой задачи был проведен эксперимент титрованием в смеси бромистого этидия и ДНК при различных концентрациях биополимера и температурах раствора. Рассмотрим его более подробно.

Анализ термодинамики комплексообразования Бромистый этидий (X) — ДНК (N) проводился по концентрационным зависимостям оптической плотности

смеси на длине волны, соответствующей максимуму поглощения красителя в мономерной форме в диапазоне температур 19-55 °С (рисунок 4.6). В основу анализа данных эксперимента было положено предположение о том, что лиганд существует в растворе в мономерной и в связанной с ДНК формах. Таким образом, система уравнений закона сохранения массы (4.24), в которой $N = 1$ и $j = 1$, с учетом (4.5) сводится к виду:

$$\begin{cases} x_0 = x_1 + \theta N_0 \\ \theta = Kx_1(1 - n\theta) \left(\frac{1 - n\theta}{1 - (n-1)\theta} \right)^{n-1}, \end{cases} \quad (4.25)$$

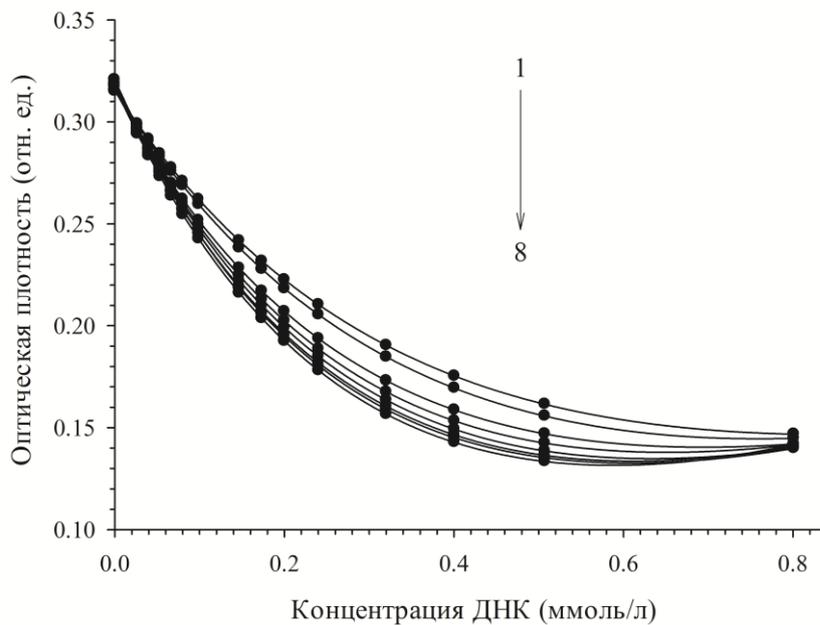


Рисунок 4.6. Зависимость оптической плотности красителя от концентрации ДНК при различных температурах смеси.

где x_0 , x_1 — соответственно общая и мономерная концентрации лиганда, θ — доля сайтов ДНК, занятых молекулами лиганда, N_0 — общая концентрация ДНК (в моль пар оснований на литр), K — равновесная микроскопическая константа комплексообразования лиганда с ДНК, n — число пар оснований в одном сайте ДНК.

Наблюдаемая оптическая плотность раствора A описывается выражением вида:

$$A = A_0 - \Delta\epsilon\theta N_0, \quad (4.26)$$

где A_0 — оптическая плотность разбавленного раствора, содержащего только молекулы лиганда в концентрации x_0 , $\Delta\varepsilon$ — разность молярных коэффициентов поглощения лиганда в свободном и связанном с ДНК состояниях.

Численный анализ представляет собой расчет константы K для каждой из кривых на рисунке 4.6, т.е. для каждой температуры. Графически изменение значения равновесной константы комплексообразования с изменением температуры изображено на рисунке 4.7 в координатах Вант-Гоффа.

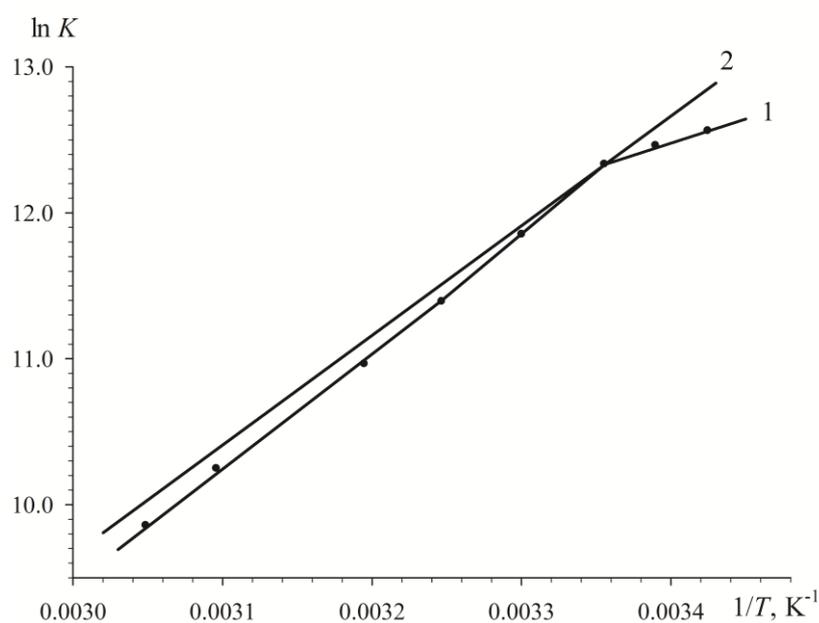


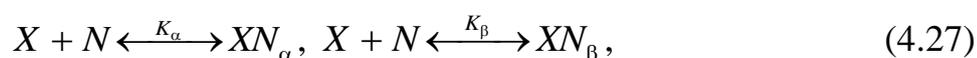
Рисунок 4.7. Зависимость $\ln K$ от $1/T$ комплексообразования EB с ДНК: 1 — экспериментальные данные; 2 — аппроксимирующая прямая, параллельно перенесенная в точку касания с графиком (1) при $T = 298 \text{ K}$.

Характерной особенностью этой зависимости является ее выраженная нелинейная форма, проявляющаяся в «загибе» кривой при понижении температуры. Одним из вариантов интерпретации нелинейности кривых Вант-Гоффа является ненулевое значение изменения теплоемкости в реакции комплексообразования, и, как следствие, температурная зависимость энтальпии и энтропии данного процесса [218,219]. Однако нелинейность кривой на рисунке 4.7 не является монотонной, и условно может быть аппроксимирована двумя прямыми линиями. Аналогичная двухфазность также может наблюдаться в координатах Скэтчарда при спектрофотометрическом титровании и, как правило, интерпретируется как результат одно-

временного сосуществования в растворе двух различных типов комплексов [220]. Учитывая это, а также то, что для красителя ЕВ множество различных методов свидетельствуют именно о двух типах связывания этого лиганда с ДНК, интеркаляции и внешнего связывания [221-227], можно считать, что эта особенность кривых Вант-Гоффа отражает именно факт бимодального связывания.

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что доминирующим типом связывания ЕВ с ДНК при условиях, близких к физиологическим, является интеркаляция, причем специфичность к определенным нуклеотидными последовательностям не является ярко выраженной [223,228]. Информация о сиквенс-специфичности внешнего типа связывания чрезвычайно скудна, однако считается, что для катионных красителей типа ЕВ в основе этого типа связывания лежит неспецифическое электростатическое взаимодействие с фосфатами ДНК [228,229].

Предполагая, что молекулы красителя X неспецифически связываются с биополимером N двумя различными способами, их равновесное комплексообразование может быть описано схемой:



где K_α , K_β — равновесные константы образования комплексов XN_α и XN_β бромистого этидия с ДНК, соответствующие первому (α -комплекс) и второму (β -комплекс) типам связывания. На данном этапе физическое соответствие α - и β -комплексов интеркаляционному или внешнему типам связывания не рассматривается.

С учетом бимодальности экспериментальные данные (см. рисунок 4.6) описываются выражением:

$$A = A_0 - \Delta\varepsilon_\alpha \theta_{(\alpha)} N_0 - \Delta\varepsilon_\beta \theta_{(\beta)} N_0, \quad (4.28)$$

где $\Delta\varepsilon_\alpha$ и $\Delta\varepsilon_\beta$ — разности коэффициентов молярного поглощения ЕВ в свободном и связанном состоянии для α - и β -комплексов соответственно. Расчет долей $\theta_{(\alpha)}$, $\theta_{(\beta)}$ проводился с использованием системы уравнений МакГи — фон

Хиппеля, учитывающей образование двух различных типов комплексов, неспецифичных к нуклеотидной последовательности [124,210,230]:

$$\begin{cases} \theta_{(\alpha)} = K_{\alpha} x_1 \left(1 - n_{\alpha} \theta_{(\alpha)} - n_{\beta} \theta_{(\beta)}\right) \left(\frac{1 - n_{\alpha} \theta_{(\alpha)} - n_{\beta} \theta_{(\beta)}}{1 - (n_{\alpha} - 1) \theta_{(\alpha)} - (n_{\beta} - 1) \theta_{(\beta)}} \right)^{n_{\alpha} - 1} \\ \theta_{(\beta)} = K_{\beta} x_1 \left(1 - n_{\alpha} \theta_{(\alpha)} - n_{\beta} \theta_{(\beta)}\right) \left(\frac{1 - n_{\alpha} \theta_{(\alpha)} - n_{\beta} \theta_{(\beta)}}{1 - (n_{\alpha} - 1) \theta_{(\alpha)} - (n_{\beta} - 1) \theta_{(\beta)}} \right)^{n_{\beta} - 1} \end{cases}, \quad (4.29)$$

и уравнения, отражающего закон сохранения общей концентрации красителя:

$$x_0 = x_1 + \theta_{(\alpha)} N_0 + \theta_{(\beta)} N_0. \quad (4.30)$$

Система уравнений (4.29), (4.30) вытекает напрямую из системы (4.24) при $N = 1$ и $j = 2$.

Неизвестные параметры модели (прежде всего, это константы K_{α} , K_{β}) определялись из условия наилучшего совпадения расчетных (см. уравнения (4.28) — (4.30)) и экспериментальных значений оптической плотности (см. рисунок 4.6). Численные значения K_{α} и K_{β} представлены в виде зависимостей в координатах Вант-Гоффа на рисунке 4.8.

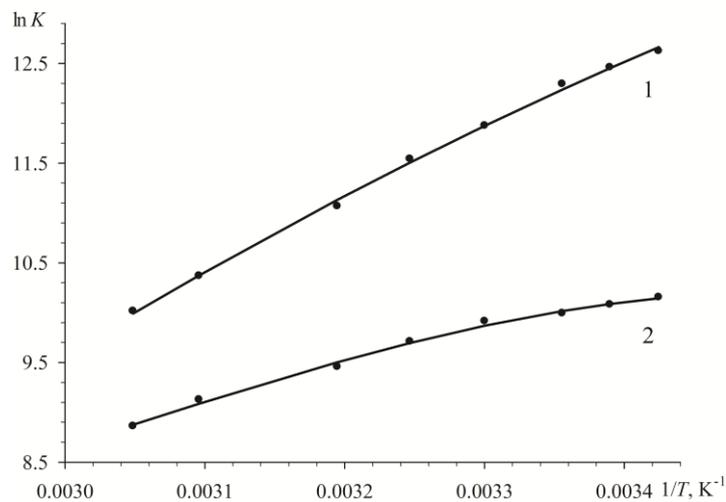


Рисунок 4.8. Зависимости $\ln K$ от $1/T$ для реакций образования комплексов ЕВ с ДНК: 1 — комплекс α ; 2 — комплекс β .

Числа пар оснований, приходящихся на одно место связывания в исследуемом температурном диапазоне, составили: $n_\alpha = 3.6$, $n_\beta = 1.0$, а интенсивности поглощения лиганда в составе α - и β -комплексов — соответственно $\Delta\varepsilon_\alpha = 3800$ л/(моль·см) и $\Delta\varepsilon_\beta = 60$ л/(моль·см).

Как следует из рисунка 4.8, зависимости Вант-Гоффа демонстрируют монотонную нелинейность, что предполагает ненулевое значение изменения теплоемкости ΔC_p и температурную зависимость изменения энтальпии ΔH , а также изменение энтропии ΔS в реакции комплексообразования в виде [218,219]:

$$\frac{\partial(\Delta H)}{\partial T} = \Delta C_p, \quad \frac{\partial(\Delta S)}{\partial T} = \frac{\Delta C_p}{T}. \quad (4.31)$$

Значения равновесных констант при различных температурах (см. рисунок 4.8) позволяют вычислить значения всех термодинамических параметров, входящих в (4.31), используя стандартное термодинамическое соотношение [218,219]:

$$\ln \frac{K(T)}{K_0} = \frac{-\Delta H + \Delta C_p T_0}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \ln \frac{T}{T_0}, \quad (4.32)$$

где K_0 — равновесная константа связывания лиганда с ДНК ($T_0 = 298$ К).

Результаты расчетов представлены в таблице 4.5. Здесь же приведены результаты измерения энтальпии и теплоемкости реакции образования интеркаляционного комплекса ЕВ-ДНК методом микрокалориметрии [231]. Значение расчетной теплоемкости α -комплекса совпадает с калориметрической, однако расчетные значения энтальпии оказываются выше экспериментальных по абсолютной величине. Подобное отличие является вполне ожидаемым и неоднократно отмечалось в литературе для тех ситуаций, когда требуется прямое сравнение данных анализа Вант-Гоффа и калориметрии [232]. К этому следует также добавить, что в работе [231] не производилось разделения типов комплексов, следовательно, калориметрически измеряемые значения ΔH фактически являются взвешенной суммой энергетики α - и β -комплексов, представленной в таблице 4.5. Это означает «заниженность» калориметрической энтальпии интеркаляционного ком-

плекса. В целом, следует отметить хорошее совпадение результатов микрокалориметрии с расчетной энергетикой образования α -комплекса, что прежде всего свидетельствует о том, что этот тип комплекса является интеркаляционным. Кроме этого, результаты единственного известного нам термодинамического анализа образования неинтеркаляционного комплекса ароматического красителя профлавина с тимусной ДНК приводят к значению энтальпии $\Delta H = -14.2$ кДж/моль [229], что хорошо согласуется с энтальпией образования β -комплекса в таблице 4.5 и независимо свидетельствует о том, что ЕВ связывается с «внешней поверхностью» биополимера.

Таблица 4.5 — Расчетные термодинамические параметры различных типов комплексов ЕВ с ДНК

комплекс	ΔH , кДж/моль (ΔS , Дж/(моль·К))				ΔC_p , Дж/(моль·К)
	20 °С	25 °С	35 °С	40 °С	
α	-49.7 (-65)	-52.9 (-77)	-58.3 (-94)	-61.0 (-103)	-540
β	-12.4 (42)	-18.0 (23)	-27.1 (-7)	-31.6 (-22)	-900
интеркаляция [219]	20 °С	25 °С	35 °С	45 °С	-580
	-34.7	-37.6	-43.1	-49.3	

Из таблицы 4.5 следует, что термодинамический профиль образования α - и β -комплексов имеет ряд существенных различий. Во-первых, энтальпия и энтропия α - комплекса характеризуется более глубокими отрицательными значениями по сравнению с β -комплексом. Этот факт находится в согласии с известным представлением о том, что образование интеркаляционного комплекса сопровождается значительным выделением энергии вследствие стэкинга ароматического хромофора лиганда и смежных пар оснований сайта интеркаляции, по сравнению с энергетически менее выгодными электростатическими взаимодействиями, стабилизирующими комплексы лигандов с «внешней поверхностью» ДНК [219,229,231]. Во-вторых, изменение теплоемкости β -комплекса более отрицательно, чем α -комплекса. Последнее, согласно выражениям (4.31), должно сопро-

вождаться уменьшением величин как энтальпии, так и энтропии реакций комплексообразования. Этот вывод согласуется с рядом ΔH , ΔS в таблице 4.5, рассчитанных независимо в каждой температурной точке по данным рисунка 4.8.

К сожалению, существующие в настоящее время представления о вкладе различных физических факторов в изменение теплоемкости реакций комплексообразования не являются однозначными. Различными исследователями выделяются как минимум три принципиальных вклада: изменения вибрации комплекса, гидрофобный вклад [233,234] и лишь сравнительно недавно признанный вклад электростатических взаимодействий [235]. Количественное выделение каждой из этих составляющих в суммарной теплоемкости реакций до сих пор проведено не было, однако проведенные оценки свидетельствуют о том, что для комплексов Лиганд — ДНК вибрационный вклад является относительно малозначимым по сравнению с гидрофобным вкладом [233,234,236]. Гидрофобные взаимодействия дают отрицательное, а электростатические — положительное изменение теплоемкости. Учитывая доминирующее в литературе представление о том, что при интеркаляции в ДНК суммарный электростатический вклад оказывается относительно небольшим (см. обзор [237]), в то время как для внешнего связывания электростатические взаимодействия могут быть значительными [220,227,229], полученные в настоящей работе более отрицательные значения ΔC_p для β -комплекса едва ли могут быть объяснены именно электростатикой. На наш взгляд, это является следствием гидрофобных взаимодействий при частичном блокировании молекулой EB большой бороздки ДНК [227]. Наиболее прямым свидетельством этому, помимо знака ΔC_p , являются положительные значения энтропии образования β -комплекса при комнатной температуре (см. таблицу 4.5), которые чаще всего интерпретируются как результат доминирующего вклада гидрофобных взаимодействий [238]. Данный вывод может быть также косвенно подтвержден тем фактом, что типичные неароматические лиганды, связывающиеся в основном с малой и большой бороздками ДНК, в среднем дают более отрицательные теплоемкости, чем ароматические лиганды [219] и одновременно характеризуются значительно большим гидрофобным вкладом [231]. Другая параллель — ароматиче-

ский антибиотик актиномицин D, хромофор которого интеркалирует, а боковые цепи укладываются в бороздку ДНК — обладает повышенным гидрофобным вкладом и более глубокими отрицательными изменениями теплоемкости по сравнению с аналогичными по молекулярной массе интеркаляторами [231]. Таким образом, полученные результаты в целом указывают на значительный вклад гидрофобных сил в стабилизацию комплексов бромистого этидия, связывающегося с «внешней поверхностью» ДНК.

В целом, проведенный выше анализ продемонстрировал возможность полноценного термодинамического исследования мультимодального связывания как частного случая обобщенной теории ИПД. Аналогичный подход может быть применен для любого лиганда, для которого возможно существование мультимодального связывания [216].

4.4. Косвенное доказательство необходимости учета протекторного механизма действия в кофеин-содержащих системах [204]

Как указывалось выше, на сегодняшний день в литературе не существует однозначного мнения по поводу учета протекторного механизма действия интерцепторов в системах Препарат — Интерцептор — ДНК. В первом разделе настоящей работы дан критический обзор соответствующих работ, напомним лишь, что ряд исследователей склоняется к мнению об отсутствии либо пренебрежимо малом влиянии протекторного механизма [24,26,47,50,59,61,63,99,100], в то время как другие объясняют наблюдаемое синергетическое действие смеси препаратов действием как интерцепторного, так и протекторного механизмов [71-74,94,102]. Выясним, насколько важен вклад протекторного механизма в общий синергизм смеси препаратов и является ли справедливым отсутствие его учета на примере систем Препарат — Кофеин — ДНК, по отношению к которым противоречивость выводов о роли действующих механизмов выражена наиболее сильно.

Объективно проследить наличие протекторного действия лиганда-интерцептора по отношению к ДНК одними только экспериментальными метода-

ми на данный момент не представляется возможным. Однако косвенно это может быть реализовано. Исключение из рассмотрения протекторного механизма означало бы отсутствие взаимодействия между интерцептором и ДНК, другими словами, это привело бы к обнулению равновесной константы K_{YN} (что эквивалентно обнулению доли θ_Y) в системе уравнений баланса массы (4.4) обобщенной теории ИПД.

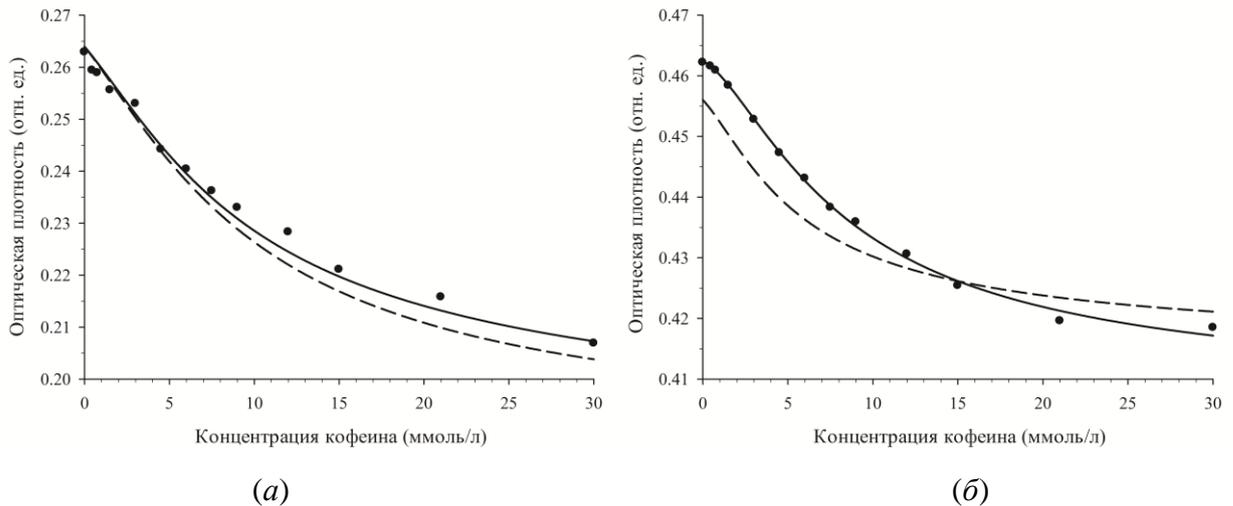


Рисунок 4.9. Результаты аппроксимации представленных точками экспериментальных данных по системам EB-CAF-ДНК (а) и PF-CAF-ДНК (б). Сплошными линиями показаны кривые титрования, рассчитанные по уравнениям (4.10), (4.11), (4.14) в исходном виде (см. рисунки 4.2, 4.4), пунктирными — теоретические кривые, рассчитанные по тем же уравнениям, в которых $K_{YN} = 0$.

Результаты расчетов экспериментальных кривых титрования в системах EB-CAF-ДНК и PF-CAF-ДНК (см. подраздел 4.2) с модифицированной указанным выше образом ($K_{YN} = 0$ или $\theta_Y = 0$) системой уравнений (4.10), (4.11), (4.14) приведены пунктирными линиями на рисунке 4.9. Аппроксимация экспериментальных зависимостей оптической плотности растворов становится заметно хуже, что однозначно указывает на частичное несоответствие модели эксперименту. Таким образом, полученный результат является первым косвенным экспериментальным доказательством важности учета протекторного механизма в трехкомпонентных кофеин-содержащих системах в диапазоне концентраций, близких к квазифизио-

логическим концентрациям (4.18), и является одним из важнейших результатов всей работы в целом.

4.5. Надежность количественного описания биологического эффекта в рамках обобщенной теории ИПД [239-242]

Обобщенная теория ИПД основывается на предположении, что равновесные параметры комплексообразования компонентов ДНК-содержащей смеси, полученные из отдельных физико-химических экспериментов, могут быть перенесены на биологическую систему при соблюдении квазифизиологических условий (4.18), что соответствует допущению 5 теории ИПД (см. подраздел 4.1). Очевидно, значения этих параметров, рассчитываемые численными методами, обладают некоторой погрешностью. В связи с этим одним из немаловажных вопросов обобщенной теории ИПД является вопрос о надежности оценки величины изменения биологического эффекта (фактор A_D), т.е. насколько его отклонение зависит от отклонений (ошибок в определении) исходных параметров модели (равновесных констант и концентраций). Следует отметить, что до настоящего времени такой анализ в строгом виде не выполнялся, а основывался, как правило, на качественных предположениях [239,241]. В данном подразделе приведены основные этапы этого количественного анализа.

Выше было показано, что олигомерная теория ИПД является предельным случаем обобщенной теории, и при отсутствии выраженной кооперативности связывания лигандов с ДНК эти подходы оказываются равнозначными. В связи с этим далее проведем оценку влияния разброса параметров в рамках олигомерной теории ИПД, наиболее системно изложенной в работе [102] (см. также раздел 1).

Для анализа зависимости отклонения фактора A_D от ошибок определения параметров модели была использована система уравнений (1.5) закона сохранения массы в трехкомпонентном растворе Препарат (X) — Интерцептор (Y) — ДНК (N). Фактор A_D определялся по формуле (4.3) (или эквивалентная ей (1.7)). Расчет влияния отклонения параметров, входящих в систему уравнений (1.5), на величину

ну фактора A_D производился следующим образом. Задавалось 15%-ное отклонение каждого параметра, соответствующее типичной ошибке их экспериментального определения, $(K \pm \delta K)$, и вычислялось значение фактора по формуле:

$$\delta A_D = A_D (K + \delta K) - A_D (K - \delta K). \quad (4.33)$$

Вычисление δA_D производилось при фиксированной концентрации интерцептора y_0 , соответствующей $A_D = 50\%$. Расчет был выполнен по отношению к группе ароматических биологически активных соединений в смеси с двумя типами молекул-интерцепторов: кофеин (CAF) и витамин B₂ (рибофлавин; RBF). Значения равновесных констант комплексообразования [102] приведены в таблице 4.6. Также здесь представлены фиксированные концентрации y_0 лигандов в парах с CAF и RBF, при которых фактор A_D равен 50%.

Таблица 4.6 — Значения равновесных констант ассоциации (в л/ммоль) и равновесных концентраций (в ммоль/л) интерцептора, при которых фактор $A_D = 50\%$.

Параметр	Лиганд Y	Лиганд X					
		DAU	DOX	NOR	NOV	EB	PF
K_X	CAF	0.72	1.8	0.13	28.6	0.305	0.7
K_Y		0.0118					
K_h		0.072	0.208	0.03	0.324	0.062	0.16
K_{XN}		560	800	2	850	72	15
K_{YN}		0.246					
y_0		13.190	7.8360	3.6880	5.7810	5.6520	2.4480
K_X		RBF	0.72	1.8	0.13	28.6	0.305
K_Y	0.265						
K_h	0.453		0.84 [88]	0.18	49	0.64	0.92
K_{XN}	560		800	2	850	72	15
K_{YN}	8						
y_0	0.8144		0.7904	0.13785	0.06408	0.2411	0.1415

Результаты расчетов представлены в таблице 4.7. Из таблицы видно, что для большинства комбинаций отклонение фактора A_D не превышает 4% по абсолютной величине (за исключением случая варьирования константы гетероассоциации K_h в системе NOV-RBF-ДНК). Этот результат означает, что погрешность изме-

рения параметров, входящих в систему уравнений (1.5) практически не играет значимой роли в оценке фактора A_D .

Таблица 4.7 — Максимальное отклонение фактора A_D (%) при вариации равновесных параметров комплексообразования в системе Препарат — Интерцептор — ДНК в пределах 15%

Параметр	Лиганд Y	Лиганд X					
		DAU	DOX	NOR	NOV	EB	PF
δK_X	CAF	0.01	0.01	0.00	0.08	0.00	0.01
δK_Y		0.87	0.60	0.29	0.45	0.43	0.19
δK_h		2.67	3.70	0.77	3.86	1.70	2.39
δK_{XN}		2.25	2.30	0.14	2.28	1.59	0.73
δK_{YN}		2.72	2.24	3.36	2.07	2.99	2.42
δN_0		1.11	1.12	0.07	0.97	0.79	0.37
δx_0		1.10	1.13	0.07	1.18	0.79	0.39
δK_X	RBF	0.02	0.03	0.00	0.02	0.01	0.00
δK_Y		0.98	1.00	0.23	0.09	0.39	0.48
δK_h		1.12	1.79	0.16	4.07	0.74	0.86
δK_{XN}		2.25	2.30	0.14	2.03	1.58	0.24
δK_{YN}		3.13	2.96	3.62	0.90	3.36	1.07
δN_0		1.13	1.15	0.20	0.85	0.87	0.13
δx_0		1.09	1.11	0.07	2.03	0.79	0.13

Наибольшее влияние на A_D оказывают три основных параметра: K_h , K_{XN} и K_{YN} , при этом параметры самоассоциации лигандов X и Y практически не оказывают какого-либо влияния на расчет. Этот результат в целом является предсказуемым, поскольку K_h непосредственно влияет на интерцепторный механизм, K_{YN} — на протекторный, K_{XN} — непосредственно определяет долю связанного с ДНК лиганда X. Сказанное означает, что если взаимодействия в системе Препарат — Интерцептор — ДНК укладываются в интерцепторно-протекторную гипотезу, то данные биологического эксперимента (фактор A_D) должны демонстрировать корреляцию с параметрами K_h , K_{XN} , K_{YN} (см. следующий подраздел). Однако в контексте данного подраздела наиболее важным результатом представленного в таблице 4.6 расчета является относительно слабая зависимость A_D от квазифизио-

логических концентраций x_0 и N_0 . Именно эти два параметра представляют наибольшую сложность для экспериментального измерения, а квазифизиологические условия дают лишь оценку порядка их значений [74,102].

Таблица 4.8 — Максимальное отклонение параметров (%) при варьировании значений фактора A_D в пределах 15%

Параметр	Лиганд Y	Лиганд X					
		DAU	DOX	NOR	NOV	EB	PF
δK_X	CAF	2378	9473	20442	993	19871	5848
δK_Y		212	306	611	394	417	884
δK_h		85.55	60.42	289.43	57.87	132.99	93.14
δK_{XN}		79.79	78.13	1969.82	79.48	106.99	519.35
δK_{YN}		74.21	89.52	62.08	97.39	69.31	85.83
δN_0		160.60	146.40	2891.48	145.27	392.58	663.27
δx_0		154.71	139.87	2864.28	111.21	377.93	634.36
δK_X	RBF	9703	5337	24458	641	14946	11207
δK_Y		184	182	752	1790	453	231
δK_h		210.51	128.84	1402.36	53.27	312.37	212.47
δK_{XN}		79.86	78.16	6614.96	84.44	106.99	3681.25
δK_{YN}		64.63	67.91	57.46	201.70	61.56	90.54
δN_0		167.32	155.28	1171.05	116.05	2958.08	2565.98
δx_0		150.64	133.02	2800.67	140.13	364.96	3155.55

Учитывая определенность параметров x_0 и N_0 лишь с точностью до порядка величины, рассмотрим теперь, при каком диапазоне варьирования квазифизиологических условий, будет наблюдаться отклонение значения фактора A_D в пределах типичной оценочной погрешности клеточного эксперимента (15%). По сути, данная задача является обратной по отношению к тому расчету, который был выполнен в таблице 4.7, т.е. расчет отклонения параметров при известном значении фактора A_D : $A_D \pm \delta A_D = 50\% \pm 15\%$. Результаты этого вычислительного эксперимента представлены в таблице 4.8.

Из таблицы 4.8 следует, что в среднем по всем исследованным комбинациям допустимо примерно 100%-ное варьирование значений параметров, входящих в систему уравнений (1.5), без введения заметной ошибки в оценку изменения биологического эффекта. Это указывает на «инертность» фактора A_D по отноше-

нию к вариации входящих в систему параметров. Ранее этот эффект неоднократно отмечался нами при расчете A_D для конкретных комбинаций лигандов [72-74,94,102], и, по-видимому, является общезначимым для систем Препарат — Интерцептор — ДНК. В сущности это частично снимает проблему переноса физико-химических параметров взаимодействия, фигурирующих в уравнениях (1.5), на реальную биологическую систему, и косвенно объясняет успех в приложении теории ИПД к данным биологического эксперимента *in vitro* [74,102].

4.6. Применение теории ИПД к данным биологического эксперимента [214,243-245]

Обобщая опубликованный к настоящему времени экспериментальный материал, можно выделить два варианта приложения теории ИПД к данным биологического эксперимента *in vitro*:

1) точечная оценка A_D , т.е. сравнение фактора A_D для различных лигандов X при фиксированной концентрации Y [102]. Точечная оценка возможна только в том случае, когда измерение A_D для разных лигандов произведено в идентичных экспериментальных условиях. Как правило, при таком подходе удобно пользоваться приближенным тождеством (1.9), отражающим эмпирически установленный факт того, что расположенные в порядке возрастания значения относительных изменений биологического эффекта набора лигандов X (которые экспериментально измерены при добавлении одного и того же интерцептора Y), совпадают с рядом чисел K_h^2/K_{XN} [102].

2) оценка по зависимости A_D от концентрации интерцептора y_0 [74]. Производится путем расчета функции $A_D(y_0)$ из решения системы уравнений баланса массы (например, система уравнений (4.4)).

Вся совокупность известных нам опубликованных данных биологического эксперимента *in vitro*, в первом приближении удовлетворяющих пяти сформулированным в подразделе 4.1 допущениям обобщенной теории ИПД и двум описан-

ным выше вариантам ее приложения к биосистеме, является достаточно ограниченной, и условно может быть разбита на две группы:

- 1) измерение цитостатического или цитотоксического эффекта действия лиганда X в присутствии Y на пролифелирующих клеточных линиях (например, [22,24]);
- 2) измерение мутагенной активности лиганда X в присутствии Y , как правило, в бактериальных системах (например, [17,26,60,62]).

Ниже приведен анализ экспериментальных данных, представленных в процитированных работах, в рамках теории ИПД.

4.6.1. Точечная оценка по данным мутагенного теста

Исходным биологическим основанием для разработки теории ИПД (см. раздел 1) являлись эксперименты на лейкемических клеточных линиях по регистрации цитотоксического эффекта различных ароматических БАС [1,94,102]. Сравнительно недавно впервые был использован мутагенный тест на светящихся бактериях штамма *Vibrio harveyi* по регистрации биологического синергизма в системах Препарат — Ксантин [17,26,60,62], продемонстрировавший протекторный эффект ксантинов и качественно подобный такому же эффекту, зафиксированному ранее на клеточных линиях [22,24]. В качестве первичной оценки воспользуемся данными работы [26] на штамме *Vibrio harveyi* для систем DOX-CAF и NOV-CAF, допускающих качественное сравнение с результатами в этих же системах, но на клеточных линиях из работы [22] (точечная оценка). Согласно данным [26], пересчитанным в единицы A_D , введение CAF одновременно с DOX и NOV вызывает снижение мутагенной активности антибиотиков на

$$A_D^{\text{exp}}(\text{DOX}) = \frac{47.5 - 1.25}{47.5} \cdot 100\% = 97\% \quad \text{и} \quad A_D^{\text{exp}}(\text{NOV}) = \frac{52.5 - 12}{52.5} \cdot 100\% = 77\%$$

соответственно, т.е. DOX более чувствителен к добавлению CAF, чем NOV. Аналогичный расчет по данным клеточного эксперимента [22] дает

$$A_D^{\text{exp}}(\text{DOX}) = \frac{74 - 35}{74} \cdot 100\% = 53\% \quad \text{и} \quad A_D^{\text{exp}}(\text{NOV}) = \frac{52 - 17}{52} \cdot 100\% = 67\%, \quad \text{т.е. DOX}$$

оказывается менее чувствительным, чем NOV. Таким образом, имеет место качественное различие результатов мутагенного теста и эксперимента на клеточных линиях. При этом применение теории ИПД как для строгого (из решения уравнений баланса массы (1.5)), так и эмпирического (из формулы (1.9)) расчета A_D с использованием данных [22] и [26] во всех случаях дает $A_D(\text{NOV}) > A_D(\text{DOX})$, т.е. полностью согласуется с данными клеточного эксперимента (расчет производился с использованием экспериментальных концентраций антибиотиков и интерцептора, а также констант комплексообразования, полученных ранее различными авторами в работах [26,102]). Из сказанного можно сделать вывод, что применение представлений об интерцепторно-протекторном механизме вообще и самой теории ИПД в частности в отношении данных мутагенного теста *Vibrio harveyi*, по-видимому, не является вполне корректным. Напомним, что теория ИПД основывается на допущении о действии лиганда X именно на уровне ДНК (см. допущение 1 в подразделе 4.1), что практически можно считать общепризнанным в отношении цитотоксического действия DOX и NOV в клеточных линиях [22,24]. Достаточно низкие концентрации антибиотиков, используемые в мутагенном тесте, являются нетоксическими, а механизм мутаций до конца невыяснен. Если мутагенная активность не обусловлена невалентным комплексообразованием X с ДНК, то и представления об интерцепторно-протекторном действии на уровне ДНК формально неприменимы, что может объяснить несоответствие результатов теории ИПД и мутагенного теста. Однако, как будет показано ниже, при условии доминирования интерцепторного механизма роль допущения 4 (см. подраздел 4.1) в теории ИПД становится малозначимой, и данные мутагенного теста становятся вполне интерпретируемыми в рамках теории ИПД.

Очевидно, что интерцепторный механизм (гетероассоциация) не зависит от вида биорецептора и характера связывания лигандов с ним. Фактически данное представление неявно заложено в высказываемую авторами работ [17,26,60,62] гипотезу о том, что именно гетероассоциация ответственна за наблюдаемое сни-

жение мутагенной активности X в присутствии Y . Эта ситуация является частным случаем теории ИПД, который рассматривался выше (см. пункт 4.3.3), при котором в системе действует только интерцепторный механизм, а протекторный отсутствует (т.е. константа связывания интерцептора с ДНК K_{YN} в системе уравнений баланса массы обнуляется). Остановимся на этом случае более подробно.

Допущение о доминировании интерцепторного механизма в регистрируемых в мутагенном тесте биологических эффектах [17,26,60,62] дает основание предположить наличие корреляции относительного снижения мутагенной активности X в присутствии Y (т.е. экспериментально измеряемый фактор A_D^{exp}) с константой гетероассоциации K_h для различных комбинаций X - Y . Отметим, что существование подобной корреляции давно известно в системах Мутаген (X) — Хлорофиллин (Y), для которых интерцепторный механизм снижения мутагенной активности вещества X является общепризнанным [47]. Судя по данным мутагенного теста [17], такая корреляция на качественном уровне действительно может иметь место в отношении лигандов ICR170 и ICR191, а именно: полное подавление мутагенной активности ICR191 наблюдается при меньшей концентрации CAF (0.5 ммоль/л), чем в случае ICR170 (2.5 ммоль/л) (при примерно одинаковых концентрациях обоих мутагенов), что согласуется с рядом констант K_h (ICR191-CAF) $>$ K_h (ICR170-CAF). Если формально положить значение константы K_{XN} одинаковой для ICR191 и ICR170, то аналогичная корреляция фактора A_D с K_h напрямую вытекает также из выражения (1.9) теории ИПД. Все сказанное выше указывает на существование фундаментальной взаимосвязи величины измеряемого в мутагенном тесте биологического параметра и величины константы гетероассоциации. Выясним, в какой мере эта взаимосвязь может вытекать как частный случай теории ИПД.

Наиболее значимой, на наш взгляд, проверкой адекватности теории ИПД мутагенному тесту являются данные по большому числу ароматических мутагенов имидазо-хинолинового (IQ) типа в присутствии молекулы-интерцептора хлорофиллина (CHL), представленные в работе Дэшвуда [47] в форме зависимости

концентрации СНЛ I_{50} , необходимой для 50%-ного подавления мутагенной активности вводимого препарата (т.е. $A_D^{\text{exp}} = 1/2$), от константы гетероассоциации K_h (рисунок 4.10), и допускающие точечную оценку в рамках теории ИПД. Механизм мутагенного действия ароматических аминов IQ-типа, как правило, интерпретируется как следствие образования ковалентных комплексов с ДНК [246,247], что противоречит допущению 4 теории ИПД (см. подраздел 4.1). Вместе с тем, ковалентное связывание X-ДНК также подразумевает отсутствие конкуренции Y и X за ДНК (т.е. отсутствие протекторного механизма). Именно эта ситуация может быть формально промоделирована в рамках теории ИПД, если в уравнениях баланса массы положить $K_{YN} = 0$ (т.е. исключить протекторный механизм). Как было показано выше, соответствующее упрощение исходных уравнений закона сохранения массы теории ИПД дает в итоге упрощенное выражение для расчета фактора A_D в виде (4.23).

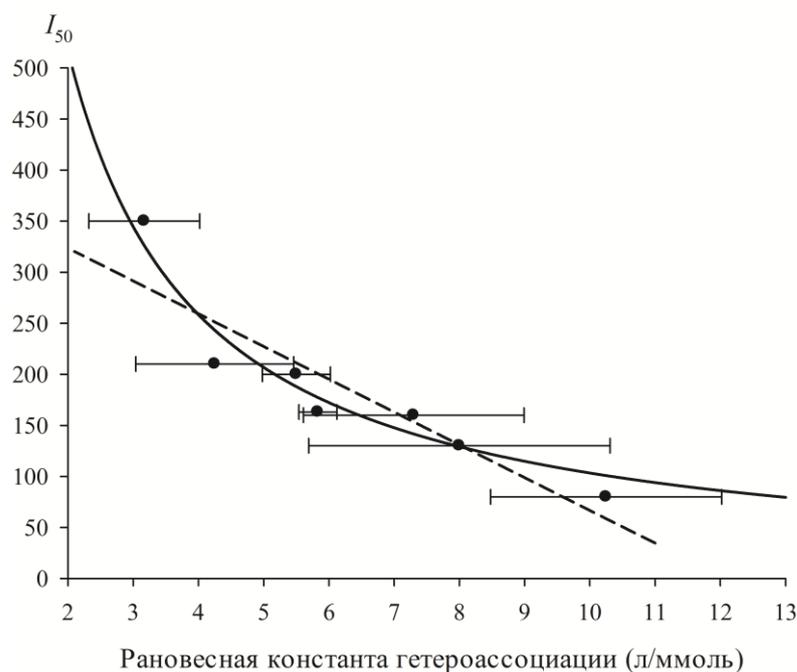


Рисунок 4.10. Корреляция значений I_{50} (концентрация хлорофиллина, при которой мутагенная активность IQ-лигандов падает в два раза [47]) со значениями констант гетероассоциации IQ-СНЛ: пунктирная прямая — линия регрессии из работы [47], $R^2 = 0.82$; сплошная кривая — зависимость, рассчитанная по уравнению (6), $R^2 = 0.94$.

Далее, учитывая микромолярные концентрации СНЛ (y_0) в мутагенном тесте и миллимолярный порядок значений констант гетероассоциации IQ-СНЛ K_h [47], получаем произведение в знаменателе (4.16) $K_h y_0 \ll 1$. Это приводит к дальнейшему упрощению (4.23) к виду $A_D \approx K_h y_0$. Возможность описания данных биологического эксперимента из работы [47] осуществляется путем перехода $y_0 \equiv I_{50}$ и $A_D \equiv 1/2$. Таким образом, с точностью до некоторого постоянного множителя B получаем связь измеряемого в биологическом эксперименте параметра I_{50} с константой гетероассоциации K_h в виде:

$$I_{50} = \frac{B}{K_h}. \quad (4.34)$$

Аппроксимация выражением (4.34) данных Дэшвуда [47] дает значительно лучшее соответствие эксперименту ($R^2 = 0.94$), чем исходная аппроксимация линейной зависимостью ($R^2 = 0.82$), представленная в цитируемой работе (рисунок 4.10). Это означает, что вытекающая из теории ИПД в частном случае гиперболическая взаимосвязь (4.34) биологического эффекта и K_h отражает фундаментальный эффект действия интерцепторного механизма и доказывает существование корреляции биологического эффекта с константой гетероассоциации K_h в условиях отсутствия протекторного механизма в системах Мутаген — Интерцептор — ДНК. Отметим, что этот результат находится в согласии с установленным в предыдущем подразделе фактом того, что именно равновесные константы комплексообразования в таких системах оказывают наибольшее влияние на величину A_D по сравнению с другими параметрами, входящими в систему уравнений баланса массы [239].

Таким образом, полученные результаты указывают на возможность применения теории ИПД к данным мутагенного теста при условии доминирования интерцепторного механизма действия. При таких условиях роль допущения 4 (нековалентное связывание Препарата с ДНК — см. подраздел 4.1) становится малозначимой. Однако описанный выше подход в общем случае необходимо использовать с осторожностью, и только для однотипных мутагенов, поскольку доля ко-

валентно связанных комплексов Мутаген — ДНК остается за рамками проведенного анализа и, возможно, послужит направлением дальнейшего расширения теории ИПД. Тем не менее, выявление фундаментального эффекта действия интерцепторного механизма в форме (4.34) для мутагенного теста является одним из важных достижений теории ИПД вообще и результатов настоящей работы в частности.

4.6.2. Точечная оценка по данным эксперимента на пролифелирующих клеточных линиях

К сожалению, прямое сравнение цитотоксического эффекта действия различных лигандов, измеренного в идентичных условиях в пролифелирующих клеточных линиях, условно возможно только по данным работы [22]. Эффект действия трех ароматических антибиотиков, DOX, NOV и эллиптицина (ELP), исследованный в данной работе в присутствии CAF, в единицах фактора A_D может быть охарактеризован рядом $A_D^{\text{exp}}(\text{NOV}) = 67\% > A_D^{\text{exp}}(\text{DOX}) = 53\% > A_D^{\text{exp}}(\text{ELP}) = 27.5\%$. Аналогичный расчет в рамках теории ИПД с использованием константы связывания ELP с ДНК $K_{XV} = 6 \cdot 10^5$ л/моль [248] и константы гетероассоциации с кофеином $K_h = 320$ л/моль [74], дает иную последовательность лигандов: $A_D(\text{NOV}) = 41.7\% > A_D(\text{ELP}) = 38.5\% > A_D(\text{DOX}) = 32.6\%$, причем эта последовательность остается неизменной при варьировании констант комплексообразования и концентраций, входящих в систему уравнений баланса массы (1.5). Как и ранее в работе [102], наблюдается согласие точечной оценки по теории ИПД с данными эксперимента на антибиотиках DOX и NOV, однако ELP выпадает из приведенного выше ряда. Причина этому, по-видимому, достаточно тривиальна, и заключается в том, что DOX и NOV, согласно данным [22], проявляют синергизм с CAF преимущественно при одновременном введении комбинации лигандов в биосистему и слабо взаимодействуют с CAF при последовательном введении, в то время как ELP демонстрирует наибольший эффект именно при по-

следовательно, а не одновременном введении с САФ. Это противоречит допущению 2 теории ИПД (см. подраздел 4.1) и означает, что в системе ELP-САФ могут действовать механизмы, отличные от интерцепторно-протекторного. За объективным исключением ELP, необходимо подчеркнуть, что во всех известных случаях (точечная оценка для систем DOX-САФ, NOV-САФ [102] и оценка по концентрационной зависимости в системе TPT-САФ [74]) теория ИПД дает хорошее согласие с данными эксперимента на пролифелирующих клеточных линиях в отношении измеряемого биологического параметра, характеризующего изменение цитотоксической активности лиганда X при введении интерцептора Y . Таким образом, пролифелирующие клеточные линии остаются объектом, наиболее однозначно описываемым в рамках теории ИПД.

4.6.3. Оценка по концентрационной зависимости фактора A_D

С использованием мутагенного теста на *Vibrio harveyi* авторы работ [60,62] измерили зависимость изменения мутагенной активности имидазо-хинолиновых гетероциклических ароматических аминов (IQ) в присутствии различных ксантинов, включая САФ. На рисунке 4.11 представлены экспериментально и теоретически (по уравнениям (1.5)) рассчитанные зависимости $A_D(y_0)$ с использованием параметров комплексообразования, взятых из процитированных работ, и оценочного значения константы $K_{XV} = 2970$ л/моль связывания с ДНК соединений, близких по структуре к аминам IQ-типа, из работы [249].

Полученные кривые демонстрируют ярко выраженное расхождение теории и эксперимента. Варьирование параметров комплексообразования, входящих в уравнения баланса массы в рамках допустимой погрешности по аналогии с проведенной ранее успешной (в смысле согласия с теорией ИПД) оценкой экспериментальной кривой $A_D(y_0)$ в системе TPT-САФ [74], не привело к согласию с экспериментом. Причина обнаруженного несоответствия теории ИПД эксперименту, по-видимому, заключается в том, что механизм биологического действия

ароматических аминов IQ-типа состоит в образовании ковалентных комплексов с ДНК [244], что противоречит допущению 4 теории ИПД (см. подраздел 4.1) и делает бессмысленным введение константы K_{XN} с последующим расчетом мольных долей f^X из уравнений баланса массы. Однако, как отмечалось выше, ковалентное связывание X-ДНК подразумевает отсутствие протекторного механизма, и эта ситуация формально может быть описана в рамках теории ИПД. Если в уравнениях баланса массы (1.5) положить $K_{YN} = 0$, то теоретическая кривая $A_D(y_0)$ практически совпадет с экспериментальной (рисунок 4.11). Этот важный результат полностью согласуется с приведенной выше точечной оценкой A_D для систем ICR191-CAF, ICR170-CAF и Мутаген — Хлорофиллин (рисунок 4.10) при аналогичном условии $K_{YN} = 0$ и свидетельствует в пользу справедливости теории ИПД.

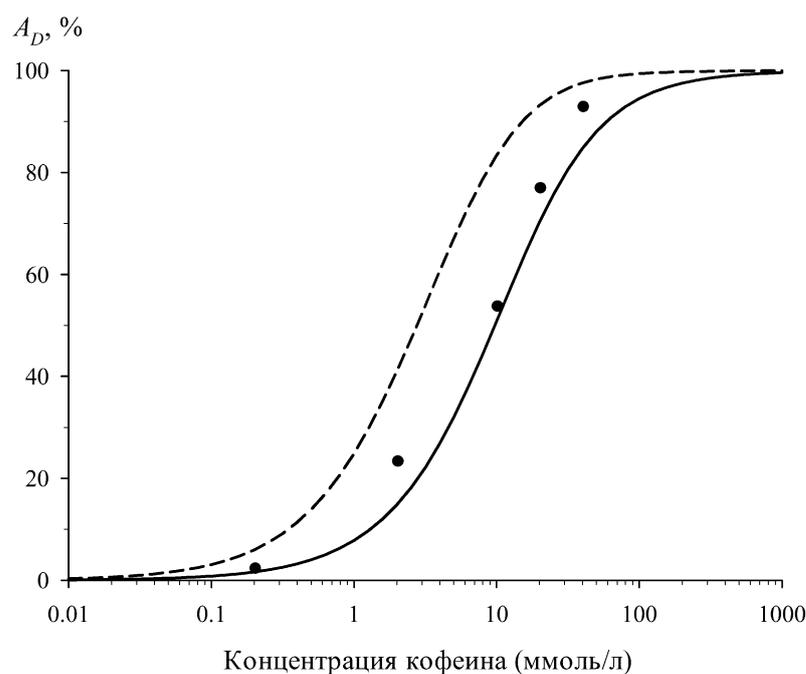


Рисунок 4.11. Зависимости фактора A_D в системе IQ-CAF-ДНК от концентрации кофеина: экспериментально пересчитанный A_D , расчет A_D с учетом (пунктирная кривая, $R^2 = 0.72$) и без учета (сплошная кривая, $R^2 = 0.97$) протекторного механизма.

Таким образом, информация о характере связывания с ДНК играет принципиально важную роль для правильного применения теории ИПД к данным биологического эксперимента.

В настоящем разделе дано обобщение теории интерцепторно-протекторного действия (ИПД) на случай многокомпонентных систем Лиганд1 — Лиганд2 — ... — Лиганд N — ДНК. Ключевыми особенностями, отличающими обобщенную теорию ИПД от предыдущих (см. раздел 1), является полноценный учет интерцепторного и протекторного механизмов на уровне полимерной ДНК и установление количественной взаимосвязи между наблюдаемым в биологическом эксперименте относительным изменением биологического эффекта (фактор A_D) и физико-химическими параметрами молекулярного комплексообразования (концентрации и константы комплексообразования). Впервые сформулирована физическая модель, лежащая в основе обобщенной теории ИПД, и показано ее редуцирование к частным теориям ИПД, разработанным ранее другими авторами.

Проведен анализ возможности применения теории ИПД к опубликованным к настоящему времени данным биологических экспериментов *in vitro*. Показано, что теория хорошо описывает данные измерения апоптоза в пролифелирующих клеточных линиях и мутагенности в бактериальных системах, индуцированных комбинациями ароматических БАС типа Препарат — Интерцептор. Выявлен фундаментальный эффект действия интерцепторного механизма в виде гиперболической взаимосвязи константы гетероассоциации и антимутагенной активности хлорофиллина в отношении ароматических гетероциклических аминов имидазохинолинового типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе дано развитие обобщенной теории интерцепторно-протекторного действия (ИПД) для комбинаций ДНК-связывающихся ароматических БАС в системах Препарат — Интерцептор1 — Интерцептор2 — ... — ДНК. Предметом исследования теории ИПД является установление взаимосвязи измеряемого в биологическом эксперименте параметра с физико-химическими параметрами межмолекулярного взаимодействия (равновесные концентрации и константы комплексообразования).

По нашему мнению, можно выделить следующие основные направления дальнейшего развития теории ИПД:

1. Преобразование уравнений теории ИПД на случай ковалентного связывания X с ДНК. Несмотря на то что, как было показано выше, фундаментальная взаимосвязь константы гетероассоциации и биологического эффекта вполне интерпретируема в рамках имеющейся теории, тем не менее, доля ковалентно связанных комплексов должна быть учтена в анализе в явном виде.

2. Проведенный в подразделе 4.6 анализ опубликованных данных биологического эксперимента позволил установить количественную взаимосвязь между K_h и A_D . Однако в подразделе 4.5 была также выявлено влияние и двух других параметров, K_{XV} и K_{YV} , что позволяет предсказать существование их корреляции с данными биологического эксперимента. Поиск этой корреляции потребует постановки специального биологического эксперимента и может стать важным тестом на справедливость применения теории ИПД к конкретным комбинациям БАС.

3. В настоящее время накоплен значительный объем биологических данных о синергизме комбинаций препаратов белок-направленного действия. Представляет несомненный интерес адаптация теории ИПД к системам подобного рода. При этом следует отметить, что, по нашим сведениям, практически во всех известных случаях используется лишь представление о конкуренции препаратов за места посадки на белок (т.е. протекторный механизм действия), но влияние гетероассоциации (интерцепторный механизм) до сих пор не рассматривалось вообще.

ВЫВОДЫ

Основные выводы настоящей работы могут быть сформулированы следующим образом.

1. Сформулированная физическая модель комбинированного действия ДНК-связывающихся биологически активных соединений (БАС) в системах Препарат — Интерцептор1 — Интерцептор2 — ... — ДНК позволяет проводить количественный анализ экспериментальных данных по связыванию БАС с биорецептором.

2. Дано статистико-термодинамическое обоснование эмпирическому допущению последовательного характера агрегации, а также доказана эквивалентность бесконечномерных моделей само- и гетероассоциации с точки зрения описания ими экспериментальных данных.

3. На основании методов трансфер-матриц и производящих последовательность функций получена новая матричная формулировка уравнений закона сохранения массы и наблюдаемого экспериментального параметра в модели многокомпонентной некооперативной гетероассоциации Лиганд1 — Лиганд2 — ... — Лиганд N . Созданный на основе данной формулировки вычислительный алгоритм позволяет проводить количественный анализ многокомпонентного равновесия в системах агрегирующих ароматических БАС.

4. Сформулированы уравнения баланса массы в обобщенной теории интерцепторно-протекторного действия (ИПД) с использованием модели полимерной ДНК в качестве биорецептора, проведена ре-параметризация уравнений. Анализ данных спектрофотометрического титрования показал важность учета протекторного механизма в системах Препарат — Кофеин — ДНК.

5. Теория ИПД применена к количественному описанию данных измерения апоптоза в пролифелирующих клеточных линиях и мутагенности в бактериальных системах, индуцированных комбинациями ароматических БАС. Выявлена функциональная взаимосвязь константы гетероассоциации и наблюдаемого в биологическом эксперименте параметра при условии доминирования интерцепторного механизма действия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

CAF	caffeine; кофеин
CHL	chlorophyllin; хлорофиллин
DAU	daunomycin; дауномицин
DOX	doxorubicin (adriamycin); доксорубицин (адриамицин)
EB	ethidium bromide; бромистый этидий
ELP	ellipticine; эллиптицин
FMN	flavin-mononucleotide; флавин-монопнуклеотид
IQ	2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline; 2-амино-3-метилимидазо[4,5-f]-хинолин
NMD	nicotinamide; никотинамид
NOR	norfloxacin; норфлоксацин
NOV	novatrone (mitoxantrone); новатрон (митоксантрон)
PF	proflavine; профлавин
RBF	riboflavin (vitamin B ₂); рибофлавин (витамин B ₂)
SGF	sequence generating function; производящая последовательность функция
TM	transfer matrix; трансфер-матрица
TPT	topotecan; топотекан
БАС	биологически активное соединение
ГЦА	гетероциклический амин
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИК	инфракрасный
ИПД	интерцепторно-протекторное действие
РНК	рибонуклеиновая кислота
УФ	ультрафиолетовый
ЯМР	ядерный магнитный резонанс

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Evstigneev, M.P. DNA-binding aromatic drug molecules: Physico-chemical interactions and their biological roles / M.P. Evstigneev. — Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2010. — 96 p.
2. Веселков, О.Н. Фізичні принципи молекулярної організації і структурної динаміки біополімерів. / О.Н. Веселков, М.П. Євстигнєєв // Монографія. — [Благой Ю.П., Веселков О.Н., Волков С.Н. та ін.]: за ред. В.Я.Малєєва. — Харків: ХНУ імені В.Н.Каразіна, 2012. — 352 с. — Розділ «Молекулярні аспекти спільної дії ароматичних БАР на ДНК» — С. 210-261.
3. Epstein, R.J. Drug-induced DNA damage and tumor chemosensitivity / R.J. Epstein // *J. Clin. Oncol.* — 1990. — V. 8, № 12. — P. 2062-2084.
4. Машковский, М.Д. Лекарственные средства. Часть II / М.Д. Машковский. — М.: Медицина, 1985. — Т. 2. — 576 с.
5. Graham, D.M. Caffeine: its identity, dietary sources, intake and biological effects / D.M. Graham // *Nutr. Rev.* — 1978. — V. 36, № 4. — P. 97-102.
6. Pozniak, P.C. The carcinogenicity of caffeine and coffee: a review / P.C. Pozniak // *J. Am. Diet. Assoc.* — 1985. — V. 85, № 9. — P. 1127-1133.
7. Kihlman, B.A. Caffeine and chromosomes / B.A. Kihlman. — New York: Elsevier, 1977. — 504 p.
8. Sadzuka, Y. Mechanism of caffeine modulation of the antitumor activity of adriamycin / Y. Sadzuka, E. Mochizuki, Y. Takino // *Toxicol. Lett.* — 1995. — V. 75, № 1-3. — P. 39-49.
9. Sadzuka, Y. Effects of methylxanthine derivatives on adriamycin concentration and antitumor activity / Y. Sadzuka, A. Iwazaki, A. Miyagishima, Y. Nozawa, S. Hirota // *Cancer Sci.* — 1995. — V. 86, № 6. — P. 594-599.
10. Kakuyamanee Iwazaki, A. Effect of methylxanthine derivatives on doxorubicin transport and antitumor activity / A. Kakuyamanee Iwazaki, Y. Sadzuka // *Curr. Drug Metab.* — 2001. — V. 2, № 4. — P. 379-395.
11. Grigg, G.W. Amplification of phleomycin induced death and DNA breakdown by caffeine in *Escherichia coli* / G.W. Grigg // *Mol. Gen. Genet.* — 1970. — V. 107, № 2. — P. 162-172.
12. Sleigh, M.J. Induction of local denaturation in DNA in vitro by phleomycin and caffeine / M.J. Sleigh, G.W. Grigg // *FEBS Lett.* — 1974. — V. 39, № 1. — P. 35-38.
13. Sharma, A. Fluoroquinolones: antimicrobial agents of the 90's / A. Sharma, A. Kela, R. Khosla, V. Mehta // *Indian J. Pharmacol.* — 1994. — V. 26, № 4. — P. 249-261.
14. Radandt, J.M. Interactions of fluoroquinolones with other drugs: mechanisms, variability, clinical significance, and management / J.M. Radandt, C.R. Marchbanks, M.N. Dudley // *Clin. Infect. Dis.* — 1992. — V. 14, № 1. — P. 272-284.
15. Ross, W.E. Relationship between cytotoxicity and DNA strand breakage produced by adriamycin and other intercalating agents / W.E. Ross, L.A. Zwellung, K.W. Kohn // *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* — 1979. — V. 5, № 8. — P. 1221-1224.
16. Kapuscinski, J. The modulation of the DNA-damaging effect of polycyclic aromatic agents by xanthines: Part I. Reduction of cytostatic effects of quinacrine mustard by caffeine / J. Kapuscinski, B. Ardelt, J. Piosik, M. Zdunek, Z. Darzynkiewicz // *Biochem. Pharmacol.* — 2002. — V. 63, № 4. — P. 625-634.
17. Piosik, J. Alleviation of mutagenic effects of polycyclic aromatic agents (quinacrine mustard, ICR-191 and ICR-170) by caffeine and pentoxifylline / J. Piosik, K. Ulanowska, A. Gwizdek-Wisniewska, A. Czyż, J. Kapuściński, G. Węgrzyn // *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* — 2003. — V. 530, № 1-2. — P. 47-57.
18. Ulanowska, K. Impaired mutagenic activities of MPDP⁺ (1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium) and MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium) due to their interactions with me-

- thylxanthines / K. Ulanowska, J. Piosik, A. Gwizdek-Wiśniewska, G. Węgrzyn // *Bioorg. Med. Chem.* — 2007. — V. 15, № 15. — P. 5150-5157.
19. Chin, D.-H. Neocarzinostatin as a probe for DNA protection activity — molecular interaction with caffeine / D.-H. Chin, H.-H. Li, H.-M. Kuo, P.-D.L. Chao, C.-W. Liu // *Mol. Carcinog.* — 2012. — V. 51, № 4. — P. 327-338.
 20. Khalil, S.A. Interaction of caffeine with phenothiazine derivatives // S.A. Khalil, L.K. El-Khordagui, A.M. Saleh // *Int. J. Pharmaceut.* — 1983. — V. 16, № 3. — P. 271-283.
 21. Ganapathi, R. Modulation of adriamycin and N-trifluoroacetyl adriamycin-14-valerate induced effects on cell cycle traverse and cytotoxicity in P388 mouse leukemia cells by caffeine and the calmodulin inhibitor trifluoperazine / R. Ganapathi, D. Grabowski, H. Schmidt, A. Yen, G. Iliakis // *Cancer Res.* — 1986. — V. 46, № 11. — P. 5553-5557.
 22. Traganos, F. Caffeine modulates the effects of DNA-intercalating drugs in vitro: a flow cytometric and spectrophotometric analysis of caffeine interaction with novantrone, doxorubicin, ellipticine, and the doxorubicin analogue AD198 / F. Traganos, J. Kapuscinsky, Z. Darzynkiewicz // *Cancer Res.* — 1991. — V. 51, № 14. — P. 3682-689.
 23. Iliakis, G. Differential reduction by caffeine of adriamycin induced cell killing and cell cycle delays in chinese hamster V79 cells / G. Iliakis, M. Nusse, R. Ganapathi, J. Egner, A. Yen // *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* — 1986. — V. 12, № 11. — P. 1987-1995.
 24. Traganos, F. Caffeine reverses the cytotoxic and cell kinetic effects of novantrone (mitoxantrone) / F. Traganos, B. Kaminska-Eddy, Z. Darzynkiewicz // *Cell Prolif.* — 1991. — V. 24, № 3. — P. 305-319.
 25. Pérez, C. Caffeine attenuates the action of amsacrine and etoposide in U-937 cells by mechanisms which involve inhibition of RNA synthesis / C. Pérez, F. Pelayo, N.E. Vilaboa, P. Aller // *Int. J. Cancer.* — 1994. — V. 57, № 6. — P. 889-893.
 26. Piosik, J. Methylxanthines (caffeine, pentoxifylline and theophylline) decrease the mutagenic effect of daunomycin, doxorubicin and mitoxantrone / J. Piosik, A. Gwizdek-Wiśniewska, K. Ulanowska, J. Ochociński, A. Czyż, G. Węgrzyn // *Acta Biochim. Polon.* — 2005. — V. 52, № 4. — P. 923-926.
 27. Quiles, J.L. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity / J.L. Quiles, J.R. Huertas, M. Battino, J. Mataix, M.C. Ramirez-Tortosa // *Toxicology.* — 2002. — V. 180, № 1. — P. 79-95.
 28. Webster, R.P. Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repair enzyme activity by dietary riboflavin / R.P. Webster, M.D. Gawde, R.K. Bhattacharya // *Cancer Lett.* — 1996. — V. 98, № 2. — P. 129-135.
 29. Edenharder, R. Antimutagenic effects and possible mechanisms of action of vitamins and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food / R. Edenharder, A. Worf-Wandelburg, M. Decker, K.L. Platt // *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* — 1999. — V. 444, № 1. — P. 235-248.
 30. Bhattacharya, R.K. Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B1: in vitro effect of vitamins / R.K. Bhattacharya, A.R. Francis, T.K. Shetty // *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* — 1987. — V. 188, № 2. — P. 121-128.
 31. Akompong, T. Gametocytocidal activity and synergistic interactions of riboflavin with standard antimalarial drugs against growth of plasmodium falciparum in vitro / T. Akompong, S. Eksi, K. Williamson, K. Haldar // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2000. — V. 44, № 11. — P. 3107-3111.
 32. Pangrekar, J. Effects of riboflavin deficiency and riboflavin administration on carcinogen-DNA binding / J. Pangrekar, K. Krishnaswamy, V. Jagadeesan // *Food Chem. Toxicol.* — 1993. — V. 31, № 10. — P. 745-750.
 33. Лантушенко, А.О. Протекторное действие витамина В₂ по отношению к антибиотику топотекану in vitro / А.О. Лантушенко, А.А. Мосунов, З. Даржинкевич, М.П. Евстигнеев // *Физика живого.* — 2007. — Т. 15, № 2. — С. 18-23.
 34. Hayatsu, H. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis / H. Hayatsu, S. Arimoto, T. Negishi // *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* — 1988. — V. 202, № 2. — P. 429-446.

35. Ong, T.-M. Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures / T.-M. Ong, W.-Z. Whong, J. Stewart, H.E. Brockman // *Mutat. Res. Lett.* — 1986. — V. 173, № 2. — P. 111-115.
36. Whong, W.-Z. Comparative antimutagenicity of chlorophyllin and five other agents against aflatoxin B1-induced reversion in *Salmonella typhimurium* strain TA98 / W.-Z. Whong, J. Stewart, H.E. Brockman, T.-M. Ong // *Teratog., Carcinog., Mutagen.* — 1988. — V. 8, № 4. — P. 215-224.
37. Dashwood, R.H. Chemopreventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B1 (AFB1)-DNA binding in vivo and anti-mutagenic activity against AFB1 and two heterocyclic amines in the salmonella mutagenicity assay / R.H. Dashwood, V. Breinholt, G.S. Bailey // *Carcinogenesis.* — 1991. — V. 12, № 5. — P. 939-942.
38. Breinholt, V. Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in rainbow trout / V. Breinholt, J. Hendricks, C. Pereira, D. Arbogast, G. Bailey // *Cancer Res.* — 1995. — V. 55, № 1. — P. 57-62.
39. Dashwood, R.H. Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B1: a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout / R.H. Dashwood, T. Negishi, H. Hayatsu, V. Breinholt, J. Hendricks, G. Bailey // *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* — 1998. — V. 399, № 2. — P. 245-253.
40. Tachino, N. Mechanisms of the in vitro antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen / N. Tachino, D. Guo, W.M. Dashwood, S. Yamane, R. Larsen, R. Dashwood // *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* — 1994. — V. 308, № 2. — P. 191-203.
41. Keshava, C. Chlorophyllin significantly reduces benzo[a]pyrene-DNA adduct formation and alters cytochrome P450 1A1 and 1B1 expression and EROD activity in normal human mammary epithelial cells / C. Keshava, R.L. Divi, T.L. Einem, D.L. Richardson, S.L. Leonard, N. Keshava, M.C. Poirier, A. Weston // *Environ. Mol. Mutagen.* — 2009. — V. 50, № 2. — P. 134-144.
42. Surh, Y.-J. Inhibition by chlorophyllin of forward and reverse bacterial mutagenicity of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide / Y.-J. Surh // *Phytother. Res.* — 1998. — V. 12, № 8. — P. 580-583.
43. Reddy, A.P. Inhibition of dibenzo[a,l]pyrene-induced multi-organ carcinogenesis by dietary chlorophyllin in rainbow trout / A.P. Reddy, U. Harttig, M.C. Barth, W.M. Baird, M. Schimerlik, J.D. Hendricks, G.S. Bailey // *Carcinogenesis.* — 1999. — V. 20, № 10. — P. 1919-1926.
44. Margaret Pratt, M. The importance of carcinogen dose in chemoprevention studies: quantitative interrelationships between, dibenzo[a,l]pyrene dose, chlorophyllin dose, target organ DNA adduct biomarkers and final tumor outcome / M. Margaret Pratt, A.P. Reddy, J.D. Hendricks, C. Pereira, T.W. Kensler, G.S. Bailey // *Carcinogenesis.* — 2006. — V. 28, № 3. — P. 611-624.
45. Dashwood, R.H. Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] (IQ)-DNA binding by chlorophyllin: studies of enzyme inhibition and molecular complex formation / R.H. Dashwood, D. Guo // *Carcinogenesis.* — 1992. — V. 13, № 7. — P. 1121-1126.
46. Dashwood, R.H. Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) to rat liver DNA / R.H. Dashwood // *Carcinogenesis.* — 1992. — V. 13, № 1. — P. 113-118.
47. Dashwood, R.H. Antimutagenic potency of chlorophyllin in the *Salmonella* assay and its correlation with binding constants of mutagen-inhibitor complexes / R.H. Dashwood, D. Guo // *Environ. Mol. Mutagen.* — 1993. — V. 22, № 3. — P. 164-171.
48. Sugiyama, C. Inhibition of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline-mediated DNA-adduct formation by chlorophyllin in *Drosophila* / C. Sugiyama, A. Shinoda, H. Hayatsu, T. Negishi // *Cancer Sci.* — 1996. — V. 87, № 4. — P. 325-328.
49. Schwab, C.E. Search for compounds that inhibit the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines / C.E. Schwab, W.W. Huber, W. Parzefall, G. Hietsch, F. Kassie, R. Schulte-Hermann, S. Knasmüller // *Crit. Rev. Toxicol.* — 2000. — V. 30, № 1. — P. 1-69.

50. Pietrzak, M. Attenuation of acridine mutagen ICR-191 — DNA interactions and DNA damage by the mutagen interceptor chlorophyllin / M. Pietrzak, H. Dorota Halicka, Z. Wieczorek, J. Wieczorek, Z. Darzynkiewicz // *Biophys. Chem.* — 2008. — V. 135, № 1-3. — P. 69-75.
51. Bez, G.C. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of chlorophylls and chlorophyllin in cultured V79 cells / G.C. Bez, B.Q. Jordão, V.E.P. Vicentini, M.S. Mantovani // *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* — 2001. — V. 497, № 1—2. — P. 139-145.
52. Rampazo, L.G.L. Chlorophyllin antimutagenesis mechanisms under different treatment conditions in the micronucleus assay in V79 cells / L.G.L. Rampazo, B.Q. Jordão, V.E.P. Vicentini, M.S. Mantovani // *Cytologia.* — 2002. — V. 67, № 3. — P. 323-327.
53. Roberts, J.J. Potentiation of sulphur mustard or cisplatin-induced toxicity by caffeine in Chinese hamster cells correlates with formation of DNA double-strand breaks during replication on a damaged template / J.J. Roberts, V.P. Kotsaki-Kovatsi // *Mutat. Res., DNA Repair Rep.* — 1986. — V. 165, № 3. — P. 207-220.
54. Selby, C.P. Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine / C.P. Selby, A. Sancar // *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* — 1990. — V. 87, № 9. — P. 3522-3525.
55. Hill, G.M. Attenuation of cytotoxic natural product DNA intercalating agents by caffeine / G.M. Hill, D.M. Moriarity, W.N. Setzer // *Sci. Pharm.* — 2011. — V. 79, № 4. — P. 729-747.
56. Woziwodzka, A. Caffeine and other methylxanthines as interceptors of food-borne aromatic mutagens: inhibition of Trp-P-1 and Trp-P-2 mutagenic activity / A. Woziwodzka, G. Gołuński, D. Wyrzykowski, R. Kaźmierkiewicz, J. Piosik // *Chem. Res. Toxicol.* — 2013. — V. 26, № 11. — P. 1660-1673.
57. Kapuscinski, J. Thermodynamical model of mixed aggregation of intercalators with caffeine in aqueous solution / J. Kapuscinski, M. Kimmel // *Biophys. Chem.* — 1993. — V. 46, № 2. — P. 153-163.
58. Zdunek, M. Thermodynamical model of mixed aggregation of ligands with caffeine in aqueous solution. Part II / M. Zdunek, J. Piosik, J. Kapuscinski // *Biophys. Chem.* — 2000. — V. 84, № 1. — P. 77-85.
59. Piosik, J. The modulation by xanthines of the DNA-damaging effect of polycyclic aromatic agents: Part II. The stacking complexes of caffeine with doxorubicin and mitoxantrone / J. Piosik, M. Zdunek, J. Kapuscinski // *Biochem. Pharmacol.* — 2002. — V. 63, № 4. — P. 635-646.
60. Ulanowska, K. Formation of stacking complexes between caffeine (1,2,3-trimethylxanthine) and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine may attenuate biological effects of this neurotoxin / K. Ulanowska, J. Piosik, A. Gwizdek-Wiśniewska, G. Wegrzyn // *Bioorg. Chem.* — 2005. — V. 33, № 5. — P. 402-413.
61. Piosik, J. De-intercalation of ethidium bromide and propidium iodine from DNA in the presence of caffeine / J. Piosik, K. Wasielewski, A. Woziwodzka, W. Śledź, A. Gwizdek-Wiśniewska // *Centr. Eur. J. Biol.* — 2010. — V. 5, № 1. — P. 59-66.
62. Woziwodzka, A. Caffeine, pentoxifylline and theophylline form stacking complexes with IQ-type heterocyclic aromatic amines / A. Woziwodzka, A. Gwizdek-Wiśniewska, J. Piosik // *Bioorg. Chem.* — 2011. — V. 39, № 1. — P. 10-17.
63. Gołuński, G. Modulation of acridine mutagen ICR191 intercalation to DNA by methylxanthines — Analysis with mathematical models / G. Gołuński, A. Woziwodzka, Ie. Iermak, M. Rychłowski, J. Piosik // *Bioorg. Med. Chem.* — 2013. — V. 21, № 11. — P. 3280-3289.
64. Larsen, R.W. Spectroscopic and molecular modeling studies of caffeine complexes with DNA intercalators / R.W. Larsen, R. Jasuja, R.K. Hetzler, P.T. Muraoka, V.G. Andrada, D.M. Jameson // *Biophys. J.* — 1996. — V. 70, № 1. — P. 443-452.
65. Bolotin, P.A. Spectrophotometric investigation of the hetero-association of caffeine and thiazine dye in aqueous solution / P.A. Bolotin, S.F. Baranovsky, M.P. Evstigneev // *Spectrochim. Acta, Part A.* — 2006. — V. 64, № 3. — P. 693-697.

66. Барановский, С.Ф. Взаимодействие бромистого этидия и кофеина с ДНК в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин, М.П. Евстигнеев, Д.Н. Чернышев // Журн. прикл. спектр. — 2009. — Т. 76, № 1. — С. 143-151.
67. Banerjee, S. Ultrafast spectroscopic study on caffeine mediated dissociation of mutagenic ethidium from synthetic DNA and various cell nuclei / S. Banerjee, D. Bhowmik, P.K. Verma, R.K. Mitra, A. Sidhhanta, G. Basu, S.K. Pal // *J. Phys. Chem. B.* — 2011. — V. 115, № 49. — P. 14776-14783.
68. Davies, D.B. Self-association of the antitumour agent novatrone (mitoxantrone) and its hetero-association with caffeine / D.B. Davies, D.A. Veselkov, M.P. Evstigneev, A.N. Veselkov // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* — 2001. — № 1. — P. 61-67.
69. Evstigneev, M.P. NMR investigation of the effect of caffeine on the hetero-association of an anticancer drug with a vitamin / M.P. Evstigneev, V.P. Evstigneev, D.B. Davies // *Chem. Phys. Lett.* — 2006. — V. 432, № 1-3. — P. 248-251.
70. Evstigneev, M.P. Effect of a mixture of caffeine and nicotinamide on the solubility of vitamin (B₂) in aqueous solution / M.P. Evstigneev, V.P. Evstigneev, A.A. Hernandez Santiago, D.B. Davies // *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* — 2006. — V. 28, № 1-2. — P. 59-66.
71. Davies, D.B. Hetero-association of caffeine and aromatic drugs and their competitive binding with a DNA oligomer / D.B. Davies, D.A. Veselkov, L.N. Djimant, A.N. Veselkov // *Eur. Biophys. J.* — 2001. — V. 30, № 5. — P. 354-366.
72. Evstigneev, M.P. Complexation of anthracycline drugs with DNA in the presence of caffeine / M.P. Evstigneev, V.V. Khomich, D.B. Davies // *Eur. Biophys. J.* — 2006. — V. 36, № 1. — P. 1-11.
73. Evstigneev, M.P. Complexation of norfloxacin with DNA in the presence of caffeine / M.P. Evstigneev, K.A. Rybakova, D.B. Davies // *Biophys. Chem.* — 2006. — V. 121, № 2. — P. 84-95.
74. Evstigneev, M.P. Quantification of the interceptor action of caffeine on the in vitro biological effect of the anti-tumour agent topotecan / M.P. Evstigneev, A.A. Mosunov, V.P. Evstigneev, H.G. Parkes, D.B. Davies // *Eur. Biophys. J.* — 2011. — V. 40, № 8. — P. 969-980.
75. Мосунов, А.А. Изучение методом ¹H ЯМР-спектроскопии комплексообразования ароматических биологически активных соединений с антибиотиком топотеканом / А.А. Мосунов, В.В. Костюков, М.П. Евстигнеев // *Укр. биохим. журн.* — 2012. — Т. 84, № 2. — С. 61-72.
76. Мосунов, А.А. Комплексообразование ароматических биологически активных соединений с антибиотиком топотеканом: анализ по данным ¹H ЯМР спектроскопии / А.А. Мосунов, А.С. Бучельников, М.П. Евстигнеев // *Биофиз. вестник.* — 2011. — Т. 26, № 1. — С. 5-16.
77. Andrejuk, D.D. Structural and thermodynamic analysis of the hetero-association of theophylline with aromatic drug molecules / D.D. Andrejuk, A.A. Hernandez Santiago, V.V. Khomich, V.K. Voronov, D.B. Davies, M.P. Evstigneev // *J. Mol. Struct.* — 2008. — V. 889, № 1-3. — P. 229-236.
78. Hernandez Santiago, A.A. Complexation of biologically active aromatic compounds with DNA in the presence of theophylline / A.A. Hernandez Santiago, D.D. Andrejuk, A.M. Cervantes Tavera, D.B. Davies, M.P. Evstigneev // *J. Biol. Phys.* — 2009. — V. 35, № 2. — P. 115-126.
79. Hernandez Santiago, A.A. ¹H NMR study of the complexation of aromatic drugs with dimethylxanthine derivatives / A.A. Hernandez Santiago, M. Gonzalez Flores, S.A. Rosas Castilla, A.M. Cervantes Tavera, R. Gutierrez Perez, V.V. Khomich, D.V. Ovchinnikov, H.G. Parkes, M.P. Evstigneev // *J. Mol. Struct.* — 2012. — V. 1010. — P. 139-145.
80. Muñoz, M.A. Molecular associations of flavins with betacarbolines and related indols / M.A. Muñoz, C. Carmona, J. Hidalgo, P. Guardado, M. Balón // *Bioorg. Med. Chem.* — 1995. — V. 3, № 1. — P. 41-47.
81. Codoñer, A. Spectroscopic study of molecular associations between riboflavin and some (dihydro) β-carboline derivatives / A. Codoñer, P. Medina, C. Ortiz, E. Jover // *Spectrochim. Acta, Part A.* — 1993. — V. 49, № 3. — P. 321-327.

82. Codoñer, A. Spectroscopic study of molecular associations between FMN and β -carbolines / A. Codoñer, P. Medina, E. Jover, J.A. Sanchez // *Spectrochim. Acta, Part A.* — 1993. — V. 49, № 12. — P. 1793-1799.
83. Codoñer, A. Spectroscopic study of intermolecular complexes between FAD and some β -carboline derivatives / A. Codoñer, I.S. Monzó, F. Tomás, R. Valero // *Spectrochim. Acta, Part A.* — 1986. — V. 42, № 7. — P. 765-769.
84. Codoñer, A. Spectroscopic study of molecular associations between flavins FAD and RFN and some indole derivatives / A. Codoñer, I.S. Monzó, P. Medina, F. Tomás // *Spectrochim. Acta, Part A.* — 1987. — V. 43, № 3. — P. 389-394.
85. Ramu, A. The riboflavin-mediated photooxidation of doxorubicin / A. Ramu, M.M. Mehta, J. Liu, I. Turyan, A. Aleksic // *Cancer Chemother. Pharmacol.* — 2000. — V. 46, № 6. — P. 449-458.
86. Raiczuk, G.B., Inhibition of flavin metabolism by adriamycin in skeletal muscle / G.B. Raiczuk, J. Pinto // *Biochem. Pharmacol.* — 1988. — V. 37, № 9. — P. 1741-1744.
87. Wood, A.W. Mechanism of the inhibition of mutagenicity of a benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide by riboflavin 5'-phosphate / A.W. Wood, J.M. Sayer, H.L. Newmark, H. Yagi, D.P. Michaud, D.M. Jerina, A.H. Conney // *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* — 1982. — V. 79, № 17. — P. 5122-5126.
88. Kharasch, E.D. The molecular basis for complexation of adriamycin with flavin mononucleotide and flavin adenine mononucleotide / E.D. Kharasch, R.F. Novak // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1981. — V. 212, № 1. — P. 20-36.
89. Datta, S. Molecular complex formation between riboflavin and salicylate in an aqueous medium / S. Datta, C. Mukhopadhyay, S.K. Bose // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* — 2003. — V. 76, № 9. — P. 1729-1734.
90. Барановский, С.Ф. Ассоциация рибофлавина, кофеина и натриевого эфира салициловой кислоты в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин // *Журн. прикл. спектр.* — 2007. — Т. 74, № 2. — С. 188-194.
91. Datta, S. Stability and conformation of the complexes of riboflavin with aromatic hydroxy compounds in an aqueous medium / S. Datta, C. Mukhopadhyay, S. Bhattacharya, S. Kumar Bose // *Spectrochim. Acta, Part A.* — 2006. — V. 64, № 1. — P. 116-126.
92. Evstigneev, M.P. ^1H NMR study of the hetero-association of flavin-monomonucleotide with mutagenic dyes: ethidium bromide and proflavine / M.P. Evstigneev, Yu.V. Mukhina, D.B. Davies // *Mol. Phys.* — 2006. — V. 104, № 4. — P. 647-654.
93. Semenov, M.A. Intermolecular hydrogen bonds in hetero-complexes of biologically active aromatic molecules probed by the methods of vibrational spectroscopy / M.A. Semenov, I.N. Blyzniuk, T.V. Bolbukh, A.V. Shestopalova, M.P. Evstigneev, V.Ya. Maleev // *Spectrochim. Acta, Part A.* — 2012. — V. 95. — P. 224-229.
94. Evstigneev, M.P. Complexation of daunomycin with a DNA oligomer in the presence of an aromatic vitamin (B_2) determined by NMR spectroscopy / M.P. Evstigneev, Yu.V. Mykhina, D.B. Davies // *Biophys. Chem.* — 2005. — V. 118, № 2-3. — P. 118-127.
95. Мухина, Ю.В. Нековалентные взаимодействия флавин-моноклеотида с биологически активными ароматическими веществами и ДНК: дис. ... канд. физ.-мат. наук: 03.00.02 / Мухина Юлия Викторовна. — Севастополь, 2006. — 164 с.
96. Romert, L. Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity / Romert L., M. Curvall, D. Jenssen // *Mutagenesis.* — 1992. — V. 7, № 5. — P. 349-355.
97. Arimoto, S. Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity / S. Arimoto, S. Fukuoka, C. Itome, H. Nakano, H. Rai, H. Hayatsu // *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* — 1993. — V. 287, № 2. — P. 293-305.
98. Ardel, B. Chlorophyllin protects cells from the cytostatic and cytotoxic effects of quinacrine mustard but not of nitrogen mustard / B. Ardel, J. Kunicki, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz // *Int. J. Oncol.* — 2001. — V. 18, № 4. — P. 849-853.

99. Pietrzak, M. Interactions of chlorophyllin with acridine orange, quinacrine mustard and doxorubicin analyzed by light absorption and fluorescence spectroscopy / M. Pietrzak, Z. Wieczorek, A. Stachelska, Z. Darzynkiewicz // *Biophys. Chem.* — 2003. — V. 104, № 1. — P. 305-313.
100. Pietrzak, M. The “interceptor” properties of chlorophyllin measured within the three-component system: Intercalator-DNA-chlorophyllin / M. Pietrzak, Z. Wieczorek, J. Wieczorek, Z. Darzynkiewicz // *Biophys. Chem.* — 2006. — V. 123, № 1. — P. 11-19.
101. Веселков, А.Н. Анализ взаимодействия антибиотика митоксантрона с ДНК в присутствии кофеина в водном растворе по данным ^1H -ЯМР спектроскопии / А.Н. Веселков, С.А. Высоцкий, М.П. Евстигнеев, Д.А. Веселков, Л.Н. Дымант, П.А. Болотин, Д.Б. Дэвис // *Биополимеры и клетка.* — 2002. — Т. 18, № 4. — P. 287-296.
102. Evstigneev, M.P. Quantitation of the molecular mechanisms of biological synergism in a mixture of DNA-acting aromatic drugs / M.P. Evstigneev, A.O. Lantushenko, V.P. Evstigneev, Yu.V. Mykhina, D.B. Davies // *Biophys. Chem.* — 2008. — V. 132, № 2-3. — P. 148-158.
103. Tornaletti, S. Studies on DNA binding of caffeine and derivatives: evidence of intercalation by DNA-unwinding experiments / S. Tornaletti, P. Russo, S. Parodi, A.M. Pedrini // *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression.* — 1989. — V. 1007, № 1. — P. 112-115.
104. Maria Johnson, I. Spectral analysis of naturally occurring methylxanthines (theophylline, theobromine and caffeine) binding with DNA / I. Maria Johnson, H. Prakash, J. Prathiba, R. Raghunathan, R. Malathi // *PLoS ONE.* — 2012. — V. 7, № 12. — Art. No. e50019.
105. Nafisi, S. Structural features of DNA interaction with caffeine and theophylline / S. Nafisi, F. Manouchehri, H.-A. Tajmir-Riahi, M. Varavipour // *J. Mol. Struct.* — 2008. — V. 875, № 1-3. — P. 392-399.
106. Fritzsche, H. On the interaction of caffeine with nucleic acids: IV. Studies of the caffeine-DNA interaction by infrared and ultraviolet linear dichroism, proton and deuterium nuclear magnetic resonance / H. Fritzsche, H. Lang, H. Sprinz, W. Pohle // *Biophys. Chem.* — 1980. — V. 11, № 1. — P. 121-131.
107. Maria Johnson, I. RNA binding efficacy of theophylline, theobromine and caffeine / I. Maria Johnson, S.G. Bhuvan Kumar, R. Malathi // *J. Biomol. Struct. Dyn.* — 2003. — V. 20, № 5. — P. 687-692.
108. Fritzsche, H. On the interaction of caffeine with nucleic acids. III. ^1H NMR studies of caffeine-5'-adenosine monophosphate and caffeine-poly(riboadenylate) interactions / H. Fritzsche, I. Petri, H. Schütz, K. Weller, P. Sedmera, H. Lang // *Biophys. Chem.* — 1980. — V. 11. — P. 109-119.
109. Kan, L.-S. ^1H - and ^{13}C -NMR studies on caffeine and its interaction with nucleic acids / L.-S. Kan, P.N. Borer, D.M. Cheng, P.O.P. Ts'o // *Biopolymers.* — 1980. — V. 19, № 9. — P. 1641-1654.
110. Poltev, V.I. Caffeine interactions with nucleic acids. Molecular mechanics calculations of model systems for explanation of mechanisms of biological actions / V.I. Poltev, T.I. Grokhilina, A. Deriabina, E. González // *Theor. Chem. Acc.* — 2003. — V. 110, № 6. — P. 466-472.
111. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рем. — М.: Мир, 2004. — 469 с.
112. Lubas, B. Proton NMR study of the interaction of riboflavin with the egg-yolk apoprotein / B. Lubas, M. Soltysik // *FEBS Lett.* — 1977. — V. 79, № 1. — P. 179-182.
113. Monaco, H.L. Crystal structure of chicken riboflavin-binding protein / H.L. Monaco // *EMBO J.* — 1997. — V. 16, № 7. — P. 1475-1483.
114. Dardare, N. Binding affinities of commonly employed sensitizers of viral inactivation / N. Dardare, M.S. Platz // *Photochem. Photobiol.* — 2002. — V. 75, № 6. — P. 561-564.
115. Hu, Y.-M. Study on the interaction between riboflavin and herring sperm DNA by fluorescence spectrometry / Y.-M. Hu, X.-M. Wang, D. Fei, F.-Q. Dong, L.-S. Ding // *Huaxue xuebao.* — 2008. — V. 66, № 10. — P. 1245-1251.
116. Березняк, Е.Г. Спектроскопическое и калориметрическое исследование системы флавино-мононуклеотид — ДНК / Е.Г. Березняк, Н.А. Гладковская, Е.В. Духопельников, А.С. Хребтова, А.В. Зинченко // *Биофиз. вестник.* — 2010. — Т. 24, № 1. — С. 14-19.

117. Neault, J.-F. DNA-chlorophyllin interaction / J.-F. Neault, H.A. Tajmir-Riahi // *J. Phys. Chem. B.* — 1998. — V. 102, № 9. — P. 1610-1614.
118. Neault, J.F. Structural analysis of DNA-chlorophyll complexes by Fourier transform infrared difference spectroscopy / J.F. Neault, H.A. Tajmir-Riahi // *Biophys. J.* — 1999. — V. 76, № 4. — P. 2177-2182.
119. Tajmir-Riahi, H.-A. DNA adducts with chlorophyll and chlorophyllin as antimutagenic agents photosynthesis research protocols / H.-A. Tajmir-Riahi, J.-F. Neault, S. Diamantoglou // *Methods in Molecular Biology* (ed.: R. Carpentier). — 2004. — V. 274, “Photosynthesis research protocols”. — P. 159-171.
120. Marty, R. RNA adducts with chlorophyll and chlorophyllin: stability and structural features / R. Marty, A.A. Ouameur, J.F. Neault, H.A. Tajmir-Riahi // *J. Biomol. Struct. Dyn.* — 2004. — V. 22, № 1. — P. 45-50.
121. Lyles, M.B. Caffeine and other xanthines as cytochemical blockers and removers of heterocyclic DNA intercalators from chromatin / M.B. Lyles, I.L. Cameron // *Cell Biol. Int.* — 2002. — V. 26, № 2. — P. 145-154.
122. Bedner, E. Caffeine dissociates complexes between DNA and intercalating dyes: Application for bleaching fluorochrome-stained cells for their subsequent restaining and analysis by laser scanning cytometry / E. Bedner, L. Du, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz // *Cytometry.* — 2001. — V. 43, № 1. — P. 38-45.
123. Wang, H. Quantitative study of competitive binding of drugs to protein by microdialysis/high-performance liquid chromatography / H. Wang, H. Zou, Y. Zhang // *Anal. Chem.* — 1998. — V. 70, № 2. — P. 373-377.
124. McGhee, J.D. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice / J.D. McGhee, P.H. von Hippel // *J. Mol. Biol.* — 1974. — V. 86, № 2. — P. 469-489.
125. Ермак, Е.Л. Влияние конкурирующих лигандов разного типа на связывание актиноинового производного ActII с ДНК / Е.Л. Ермак, Е.Б. Круглова // *Вестник СевГТУ (серия «Физика и математика»)*. — 2005. — Т. 70. — С. 118-126.
126. Ермак, Е.Л. Спектрофотометрическое исследование механизмов связывания аналогов цитидина и бромистого этидия с ДНК / Е.Л. Ермак, Е.Б. Круглова, Л.И. Пальчиковская, И.В. Алексеева // *Биополимеры и клетка.* — 2007. — V. 23, № 6. — P. 529-537.
127. Ермак, Е.Л. Связывание теофиллина с тимусной ДНК в присутствии конкурирующих лигандов / Е.Л. Ермак, Е.Б. Круглова // *Биофиз. вестник.* — 2007. — Т. 19, № 2. — С. 13-19.
128. Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions / G. Scatchard // *Ann. New York Acad. Sci.* — 1949. — V. 51, № 4. — P. 660-672.
129. Davies, D.B. NMR determination of the hetero-association of phenanthridines with daunomycin and their competitive binding to a DNA oligomer / D.B. Davies, D.A. Veselkov, A.N. Veselkov // *Eur. Biophys. J.* — 2002. — V. 31, № 2. — P. 153-162.
130. Евстигнеев, М.П. Физические механизмы ассоциации биологически активных ароматических молекул и их конкурентного связывания с ДНК: дис. ... кандидата физ.-мат. наук: 03.00.02 / Евстигнеев Максим Павлович. — Харьков, 2002. — 186 с.
131. Лантушенко, А.О. Влияние боковых цепей ароматических лигандов на процессы ассоциации и конкурентного связывания с ДНК: дис. ... кандидата физ.-мат. наук: 03.00.02 / Лантушенко Анастасия Олеговна. — Харьков, 2003. — 203 с.
132. Евстигнеев, М.П. Межмолекулярные взаимодействия биологически активных ароматических веществ и ДНК в водном растворе: дис. ... доктора физ.-мат. наук: 03.00.02 / Евстигнеев Максим Павлович. — Харьков, 2007. — 342 с.
133. Рыбакова, К.А. Механизмы взаимодействия антибактериального препарата норфлоксацина и ДНК-связывающихся ароматических лигандов в водной среде: дис. ... кандидата физ.-мат. наук: 03.00.02 / Рыбакова Кристина Александровна. — Севастополь, 2008. — 215 с.

134. Евстигнеев, В.П. Многокомпонентные взаимодействия ароматических биологически активных соединений и ДНК в водном растворе: дис. ... кандидата физ.-мат. наук: 03.00.02 / Евстигнеев Владислав Павлович. — Харьков, 2009. — 182 с.
135. Davies, D.B. Hetero-association of anticancer antibiotics in aqueous solution: NMR and molecular mechanics analysis / D.B. Davies, M.P. Evstigneev, D.A. Veselkov, A.N. Veselkov // *Biophys. Chem.* — 2005. — V. 117, № 2. — P. 111-118.
136. Collins, J.M. Potential roles for preclinical pharmacology in Phase I clinical trials / J.M. Collins, D.S. Zaharko, R.L. Dedrick, B.A. Chabner // *Cancer Treat. Rep.* — 1986. — V. 70, № 1. — P. 73-80.
137. Gianni, L. Pharmacology and clinical toxicity of 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin: an example of successful application of pharmacokinetics to dose escalation in phase I trials / Gianni L., L. Viganò, A. Surbone, D. Ballinari, P. Casali, C. Tarella, J.M. Collins, G. Bonadonna // *J. Natl. Cancer Inst.* — 1990. — V. 82, № 6. — P. 469-477.
138. Sundman-Engberg, B. Intracellular concentrations of mitoxantrone in leukemic cells in vitro vs in vivo / B. Sundman-Engberg, U. Tidefelt, A. Gruber, C. Paul // *Leukemia Res.* — 1993. — V. 17, № 4. — P. 347-352.
139. Feofanov, A. Quantitative confocal spectral imaging analysis of mitoxantrone within living K562 cells: intracellular accumulation and distribution of monomers, aggregates, naphthoquinoline metabolite, and drug-target complexes / A. Feofanov, S. Sharonov, F. Fleury, I. Kudelina, I. Nabiev // *Biophys. J.* — 1997. — V. 73, № 6. — P. 3328-3336.
140. Теренин, А.Н. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений / А.Н. Теренин. — Л.: Наука, 1967. — 616 с.
141. Levenberg, K. A method for the solution of certain problems in least squares / K. Levenberg // *Q. Appl. Math.* — 1944. — V. 2. — P. 164-168.
142. Osborne, M.R. Nonlinear least squares: the Levenberg algorithm revisited / M.R. Osborne // *The ANZIAM Journal.* — 1976. — V. 19, № 03. — P. 343-357.
143. Moré, J. The Levenberg-Marquardt algorithm: implementation and theory / J. Moré // *Numer. Anal.* — 1978. — V. 630, № — P. 105-116.
144. Conn, A.R. Trust region methods / A.R. Conn, N.I.M. Gould, P.L. Toint // *MPS-SIAM Series on optimization.* — Philadelphia: SIAM, 2000. — 959 p.
145. Moré, J.J. Recent developments in algorithms and software for trust region methods / Moré J.J. // *Mathematical programming: the state of the art.* — 1983. — P. 258-287.
146. Powell, M.J.D. A new algorithm for unconstrained optimization / M.J.D. Powell // *Nonlinear programming* (eds.: J. Rosen, O. Mangasarian, K. Ritter). — New York: Academic Press, 1970. — P. 31-65.
147. Powell, M. A hybrid method for nonlinear equations / M. Powell // *Numerical methods for nonlinear algebraic equations* (ed.: P. Rabinowitz). — London: Gordon and Breach Science, 1970. — P. 87-144.
148. Нечипуренко, Ю.Д. Анализ связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами / Ю.Д. Нечипуренко // *Биофизика.* — 2014. — Т. 59, № 1. — С. 12-36.
149. Poland, D. Evaluation of linear chain partition functions by computer derivation of secular equations. I. General technique; Titration of rigid macromolecules / D. Poland // *J. Chem. Phys.* — 1973. — V. 58, № 9. — P. 3574-3579.
150. Poland, D. Theory of helix-coil transitions in biopolymers / D. Poland, H.A. Scheraga. — New York: Academic Press, 1970. — 797 p.
151. Poland, D. Cooperative equilibria in physical biochemistry / D. Poland. — Oxford: Clarendon Press, 1978. — 344 p.
152. Weller, K. Thermodynamical model of indefinite mixed association of two components and NMR data analysis for caffeine-AMP interaction / K. Weller, H. Schütz, I. Petri // *Biophys. Chem.* — 1984. — V. 19, № 4. — P. 289-298.
153. Бэкстер, Р. Точно решаемые модели в статистической механике / Р. Бэкстер. — М.: Мир, 1985. — 488 с.

154. Изюмов, Ю.А. Статистическая механика магнитоупорядоченных систем / Ю.А. Изюмов, Ю.Н. Скрябин. — М.: Наука, 1987. — 264 с.
155. Kramers, H.A. Statistics of the two-dimensional ferromagnet. Part I / Kramers H.A., G.H. Wannier // *Phys. Rev.* — 1941. — V. 60, № 3. — P. 252-262.
156. Zimm, B.H. Theory of the phase transition between helix and random coil in polypeptide chains / Zimm B.H., J.K. Bragg // *J. Chem. Phys.* — 1959. — V. 31, № 2. — P. 526-535.
157. Hill, T.L. Some statistical problems concerning linear macromolecules / T.L. Hill // *J. Polymer Sci.* — 1957. — V. 23, № 104. — P. 549-562.
158. Zimm, B.H. Theory of “Melting” of the Helical Form in Double Chains of the DNA Type / B.H. Zimm // *J. Chem. Phys.* — 1960. — V. 33, № 5. — P. 1349-1356.
159. Crothers, D.M. Calculation of melting curves for DNA / D.M. Crothers // *Biopolymers.* — 1968. — V. 6, № 10. — P. 1391-1404.
160. Chen, Y.-D. Multiple binding of ligands to a linear biopolymer / Y.-D. Chen // *Methods Enzymol.* — 2004. — V. 379, № — P. 145-152.
161. Teif, V.B. General transfer matrix formalism to calculate DNA-protein-drug binding in gene regulation: application to OR operator of phage λ / V.B. Teif // *Nucleic Acids Res.* — 2007. — V. 35, № 11. — Art. No. e80.
162. Tsuchiya, T. Cooperative binding of n -mers with steric hindrance to finite and infinite one-dimensional lattices / T. Tsuchiya, A. Szabo // *Biopolymers.* — 1982. — V. 21, № 5. — P. 979-994.
163. Lifson, S. Partition functions of linear-chain molecules / S. Lifson // *J. Chem. Phys.* — 1964. — V. 40, № 12. — P. 3705-3710.
164. Woodbury, J.C.P. Matrix polynomial extension of the sequence-generating function method for macromolecular binding / J.C.P. Woodbury // *J. Chem. Phys.* — 1990. — V. 92, № 8. — P. 5127-5135.
165. Martin, R.B. Comparisons of indefinite self-association models / R.B. Martin // *Chem. Rev.* — 1996. — V. 96, № 8. — P. 3043-3064.
166. Evstigneev, M.P. Random versus sequential pathway of molecular self-assembly / M.P. Evstigneev, A.S. Buchelnikov, V.P. Evstigneev // *Phys. Rev. E.* — 2012. — V. 85, № 6. — Art. No. 061405.
167. Evstigneev, M.P. Indistinguishability of the models of molecular self-assembly / M.P. Evstigneev, A.S. Buchelnikov, V.V. Kostjukov, I.S. Pashkova, V.P. Evstigneev // *Supramol. Chem.* — 2013. — V. 25, № 4. — P. 199-203.
168. D’Orsogna, M.R. Stochastic self-assembly of incommensurate clusters / M.R. D’Orsogna, G. Lakatos, T. Chou // *J. Chem. Phys.* — 2012. — V. 136, № 8. — Art. No. 084110.
169. De Greef, T.F.A. Supramolecular polymerization / T.F.A. De Greef, M.M.J. Smulders, M. Wolfs, A.P.H.J. Schenning, R.P. Sijbesma, E.W. Meijer // *Chem. Rev.* — 2009. — V. 109, № 11. — P. 5687-5754.
170. Martos, A. Characterization of self-association and heteroassociation of bacterial cell division proteins FtsZ and ZipA in solution by composition gradient — static light scattering / A. Martos, C. Alfonso, P. López-Navajas, R. Ahijado-Guzmán, J. Mingorance, A.P. Minton, G. Rivas // *Biochemistry.* — 2010. — V. 49, № 51. — P. 10780-10787.
171. Rabinowitch, E. Polymerization of dyestuffs in solution. Thionine and methylene blue / E. Rabinowitch, L.F. Epstein // *J. Am. Chem. Soc.* — 1941. — V. 63, № 1. — P. 69-78.
172. Laurenzi, I.J. Kinetics of random aggregation-fragmentation processes with multiple components / I.J. Laurenzi, S.L. Diamond // *Phys. Rev. E.* — 2003. — V. 67, № 5. — Art. No. 051103.
173. Beshnova, D.A. Profiles of equilibrium constants for self-association of aromatic molecules / D.A. Beshnova, A.O. Lantushenko, D.B. Davies, M.P. Evstigneev // *J. Chem. Phys.* — 2009. — V. 130, № 16. — Art. No. 165105.
174. Бешнова, Д.А. Антикооперативность при комплексообразовании ароматических соединений и ДНК в водном растворе: дис. ... кандидата физ.-мат. наук: 03.00.02 / Бешнова Дарья Александровна. — Севастополь, 2011. — 225 с.

175. Kostjukov, V.V. Parsing of the free energy of aromatic-aromatic stacking interactions in solution / V.V. Kostjukov, N.M. Khomytova, A.A. Hernandez Santiago, A.-M. Cervantes Tavera, J. Salas Alvarado, M.P. Evstigneev // *J. Chem. Thermodyn.* — 2011. — V. 43, № 10. — P. 1424-1434.
176. Maczek, A. *Statistical thermodynamics* / A. Maczek. — Oxford: Oxford University Press, 1998. — 92 p.
177. Remeta, D.P. Thermodynamic characterization of daunomycin-DNA interactions: microcalorimetric measurements of daunomycin-DNA binding enthalpies / D.P. Remeta, C.P. Mudd, R.L. Berger, K.J. Breslauer // *Biochemistry.* — 1991. — V. 30, № 40. — P. 9799-9809.
178. Gill, S.J. Partition function formalism for analyzing calorimetric experiments / S.J. Gill, K.P. Murphy, C.H. Robert // *J. Chem. Educ.* — 1990. — V. 67, № 11. — P. 928-931.
179. Stoesser, P.R. Calorimetric study of self-association of 6-methyl-purine in water / P.R. Stoesser, S.J. Gill // *J. Phys. Chem.* — 1967. — V. 71, № 3. — P. 564-567.
180. Heyn, M.P. The self-association of ATP: thermodynamics and geometry / M.P. Heyn, R. Bretz // *Biophys. Chem.* — 1975. — V. 3, № 1. — P. 35-45.
181. Thordarson, P. *Binding constants and their measurement* / P. Thordarson // *Supramolecular chemistry: from molecules to nanomaterials.* — New York: John Wiley & Sons, 2012.
182. Барановский, С.Ф. Комплексообразование гетероциклических лигандов с ДНК в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин, М.П. Евстигнеев, Д.Н. Чернышев // *Журн. прикл. спектр.* — 2008. — Т. 75, № 2. — С. 242-249.
183. Turcu, I. Size dependence of molecular self-assembling in stacked aggregates. 1. NMR investigation of ciprofloxacin self-association / I. Turcu, M. Bogdan // *J. Phys. Chem. B.* — 2012. — V. 116, № 22. — P. 6488-6498.
184. Chaires, J.B. Self-association of daunomycin / J.B. Chaires, N. Dattagupta, D.M. Crothers // *Biochemistry.* — 1982. — V. 21, № 17. — P. 3927-3932.
185. Ercolani, G. Comment on 'Self-assembled multiporphyrin arrays mediated by self-complementary quadrupole hydrogen bond motifs' / G. Ercolani // *Chem. Comm.* — 2001. — № 15. — P. 1416-1417.
186. Thordarson, P. Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry / P. Thordarson // *Chem. Soc. Rev.* — 2011. — V. 40, № 3. — P. 1305-1323.
187. Veselkov, A.N. A general nuclear magnetic resonance analysis of hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution / A.N. Veselkov, M.P. Evstigneev, D.A. Veselkov, D.B. Davies // *J. Chem. Phys.* — 2001. — V. 115, № 5. — P. 2252-2266.
188. Evstigneev, V.P. Complete solution of the problem of one-dimensional non-covalent non-cooperative self-assembly in two-component systems / V.P. Evstigneev, A.A. Mosunov, A.S. Buchelnikov, A.A. Hernandez Santiago, M.P. Evstigneev // *J. Chem. Phys.* — 2011. — V. 134, № 19. — Art. No. 194902.
189. Evstigneev, M.P. A method for analysis of multicomponent systems of interacting aromatic molecules in solution / M.P. Evstigneev, V.P. Evstigneev, D.B. Davies // *J. Chem. Phys.* — 2007. — V. 127, № 15. — Art. No. 154511.
190. Odille, F.G.J. On the characterization of dynamic supramolecular systems: A general mathematical association model for linear supramolecular copolymers and application on a complex two-component hydrogen-bonding system / F.G.J. Odille, S. Jónsson, S. Stjernqvist, T. Rydén, K. Wärnmark // *Chem. Eur. J.* — 2007. — V. 13, № 34. — P. 9617-9636.
191. Evstigneev, M.P. Stochastic models (cooperative and non-cooperative) for NMR analysis of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution / M.P. Evstigneev, D.B. Davies, A.N. Veselkov // *Chem. Phys.* — 2006. — V. 321, № 1-2. — P. 25-33.
192. Евстигнеев, М.П. Кооперативность в реакциях гетероассоциации ароматических молекул / М.П. Евстигнеев, Д.А. Бешнова, А.О. Розвадовская // *Хим. физика.* — 2007. — Т. 26, № 9. — С. 60-66.
193. Мосунов, А.А. Физические механизмы регуляции биологической активности антибиотика топотекана в присутствии ароматических соединений: дис. ... кандидата физ.-мат. наук: 03.00.02 / Мосунов Андрей Алексеевич. — Севастополь, 2011. — 209 с.

194. Kong, Y. Solution of one-dimensional self-assembly problem in multiple-component systems with correction of overcounting of non-symmetrical complexes / Y. Kong // *J. Chem. Phys.* — 2011. — V. 135, № 15. — Art. No. 156101.
195. Kong, Y. A simple method for evaluating partition functions of linear polymers / Y. Kong // *J. Phys. Chem. B.* — 2001. — V. 105, № 41. — P. 10111-10114.
196. Buchelnikov, A.S. General statistical-thermodynamical treatment of one-dimensional multicomponent molecular hetero-assembly in solution / A.S. Buchelnikov, V.P. Evstigneev, M.P. Evstigneev // *Chem. Phys.* — 2013. — V. 421. — P. 77-83.
197. Бучельников, А.С. Моделирование многокомпонентного равновесия биологически активных ароматических молекул в водном растворе / А.С. Бучельников, В.П. Евстигнеев // *Вестник СевНТУ (серия «Физика и математика»)*. — 2011. — Т. 99. — С. 3-11.
198. Евстигнеев, В.П. Модель некооперативных взаимодействий в многокомпонентной смеси ароматических соединений / В.П. Евстигнеев, А.С. Бучельников // *Материалы V международной конференции “Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии” 21-25 апреля 2009 г.* — Севастополь. — 2009. — С. 145-146.
199. Buchelnikov, A.S. Matrix model of non-co-operative interactions of aromatic compounds in multicomponent mixture / A.S. Buchelnikov, V.P. Evstigneev // *Program and Abstracts of Young Scientists Conference “Modern Problems of Theoretical Physics” 22-24 December 2010.* — Kyiv. — 2010. — P. 51.
200. Тихонов, В.И. Марковские процессы / В.И. Тихонов, М.А. Миронов. — М.: Советское радио, 1977. — 488 с.
201. Horn, R.A. Topics in matrix analysis / R.A. Horn, C.R. Johnson. — New York: Cambridge University Press, 1991. — 607 p.
202. Kong, Y. Distribution of runs and longest runs: A new generating function approach / Kong Y. // *J. Am. Stat. Assoc.* — 2006. — V. 101, № 475. — P. 1253-1263.
203. Ribeiro, L. Multicomponent complex formation between vinpocetine, cyclodextrins, tartaric acid and water-soluble polymers monitored by NMR and solubility studies / L. Ribeiro, R.A. Carvalho, D.C. Ferreira, F.J.B. Veiga // *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* — 2005. — V. 24, № 1. — P. 1-13.
204. Buchelnikov, A.S. General analysis of competitive binding in drug-interceptor-DNA systems / A.S. Buchelnikov, A.A. Hernandez Santiago, M. Gonzalez Flores, R. Vazquez Ramirez, D.B. Davies, M.P. Evstigneev // *Eur. Biophys. J.* — 2012. — V. 41, № 3. — P. 273-283.
205. Buchelnikov, A.S. Development of an analytical approach to study a three-component hetero-association by means of spectrophotometry / A.S. Buchelnikov, A.F. Khrustalev, M.P. Evstigneev // *Appl. Spectrosc.* — 2013. — V. 67, № 1. — P. 29-35.
206. Бучельников, А.С. Исследование межмолекулярной ассоциации в системе профлавинокфеин-никотинамид / А.С. Бучельников, М.П. Евстигнеев // *Тезисы докладов X Международной научной конференции “Ломоносов-2011” 25-28 апреля 2011 г.* — Севастополь. — 2011. — С. 262.
207. Antonovsky, V.L. Studies of intermolecular interactions of nucleic acid bases in aqueous solutions by the proton magnetic resonance method: Self-association of 6,9-dimethyladenine and its pyrazole analogue and their association with methyl-substituted cytosine and uracil / V.L. Antonovsky, A.S. Gukovskaja, G.V. Nekrasova, B.I. Sukhorukov, I.I. Tchervin // *Biochim. Biophys. Acta, Nucleic Acids Protein Synth.* — 1973. — V. 331, № 1. — P. 9-20.
208. Евстигнеев, М.П. Теория интерцепторно-протекторного действия при совместном связывании с ДНК ароматических биологически активных соединений / М.П. Евстигнеев, В.П. Евстигнеев, А.С. Бучельников // *Тези доповідей V з'їзду Українського біофізичного товариства 22-25 червня 2011 р.* — Луцьк. — 2011. — С. 56-57.
209. Бучельников, А.С. Обобщенная модель конкурентного связывания в системах Препарат-Перехватчик-ДНК / А.С. Бучельников, Л.Э. Родригес Оропеса, М.П. Евстигнеев // *Материалы XII конференции молодых ученых “Радиофизика, Электроника, Фотоника и Биофизика” 4-7 декабря 2012 г.* — Харьков. — 2012. — С. 16.

210. Заседателев, А.С. Теория одномолекулярной адсорбции. I. Адсорбция малых молекул на гомополимере / А.С. Заседателев, Г.В. Гурский, М.В. Волькенштейн // Молек. биология. — 1971. — Т. 5, № 2. — С. 245-251.
211. Kowalczykowski, S.C. Cooperative and noncooperative binding of protein ligands to nucleic acid lattices: experimental approaches to the determination of thermodynamic parameters / S.C. Kowalczykowski, L.S. Paul, N. Lonberg, J.W. Newport, J.A. McSwiggen, P.H. von Hippel // Biochemistry. — 1986. — V. 25, № 6. — P. 1226-1240.
212. Kapuscinski, J. Interactions of antitumor agents ametantrone and mitoxantrone (novatrone) with double-stranded DNA / J. Kapuscinski, Z. Darzynkiewicz // Biochem. Pharmacol. — 1985. — V. 34, № 24. — P. 4203-4213.
213. Chaires, J.B. Biophysical chemistry of the daunomycin-DNA interaction / J.B. Chaires // Biophys. Chem. — 1990. — V. 35, № 2-3. — P. 191-202.
214. Бучельников, А.С. Анализ данных биологического эксперимента *in vitro* на основе теории интерцепторно-протекторного действия ДНК-связывающихся препаратов / А.С. Бучельников, М.П. Евстигнеев // Материалы докладов международной научно-методической конференции “Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы” 24-27 июня 2013 г. — Воронеж. — 2013. — С. 109-112.
215. Traganos, F. Caffeine prevents apoptosis and cell cycle effects induced by camptothecin or topotecan in HL-60 cells / F. Traganos, J. Kapuscinski, J. Gong, B. Ardelt, R.J. Darzynkiewicz, Z. Darzynkiewicz // Cancer Res. — 1993. — V. 53, № 19. — P. 4613-4618.
216. Барановский, С.Ф. Термодинамический анализ комплексообразования бромида этидия с ДНК в водном растворе / С.Ф. Барановский, Д.Н. Чернышев, А.С. Бучельников, М.П. Евстигнеев // Биофизика. — 2011. — Т. 56, № 2. — С. 235-241.
217. Sovenyhazi, K.M. Spectroscopic studies of the multiple binding modes of a trimethine-bridged cyanine dye with DNA / K.M. Sovenyhazi, J.A. Bordelon, J.T. Petty // Nucleic Acids Res. — 2003. — V. 31, № 10. — P. 2561-2569.
218. Hopkins, H.P. Temperature dependence of enthalpy changes for ethidium and propidium binding to DNA: Effect of alkylamine chains / H.P. Hopkins, J. Fumero, W.D. Wilson // Biopolymers. — 1990. — V. 29, № 2. — P. 449-459.
219. Lane, A.N. Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands / A.N. Lane, T.C. Jenkins // Q. Rev. Biophys. — 2000. — V. 33, № 3. — P. 255-306.
220. Porumb, H. The solution spectroscopy of drugs and the drug-nucleic acid interactions / H. Porumb // Prog. Biophys. Mol. Biol. — 1978. — V. 34, № 3. — P. 175-195.
221. Waring, M.J. Structural requirements for the binding of ethidium to nucleic acids / M.J. Waring // Biochim. Biophys. Acta, Nucleic Acids Protein Synth. — 1966. — V. 114, № 2. — P. 234-244.
222. LePecq, J.B. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization / J.B. LePecq, C. Paoletti // J. Mol. Biol. — 1967. — V. 27, № 1. — P. 87-106.
223. Nafisi, S. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue / S. Nafisi, A.A. Saboury, N. Keramat, J.-F. Neault, H.-A. Tajmir-Riahi // J. Mol. Struct. — 2007. — V. 827, № 1-3. — P. 35-43.
224. Близнюк, Ю.Н. Исследование комплексообразования бромистого этидия с ДНК методом спектроскопии комбинационного рассеяния / Ю.Н. Близнюк, Т.В. Больбух, Е.Б. Круглова, М.А. Семенов, В.Я. Малеев // Биополимеры и клетка. — 2009. — V. 25, № 2. — P. 126-132.
225. Minasyan, S.H. Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA / S.H. Minasyan, L.A. Tavadyan, A.P. Antonyan, H.G. Davtyan, M.A. Parsadanyan, P.O. Vardevanyan // Bioelectrochemistry. — 2006. — V. 68, № 1. — P. 48-55.
226. Garland, F. Comparative studies of the binding of ethidium bromide and its photoreactive analogs to nucleic acids by fluorescence and rapid kinetics / F. Garland, D.E. Graves, L.W. Yielding, H.C. Cheung // Biochemistry. — 1980. — V. 19, № 14. — P. 3221-3226.

227. Monaco, R.R. A novel major groove binding site in B-form DNA for ethidium cation / R.R. Monaco // *J. Biomol. Struct. Dyn.* — 2007. — V. 25, № 2. — P. 119-125.
228. Dougherty, G. A comparison of the base-pair specificities of three phenanthridine drugs using solution spectroscopy / G. Dougherty // *Int. J. Biochem.* — 1982. — V. 14, № 6. — P. 493-504.
229. Berman, H.M. The interaction of intercalating drugs with nucleic acids / H.M. Berman, Young, P. R. // *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* — 1981. — V. 10, № — P. 87-114.
230. Нечипуренко, Ю.Д. Взаимодействия между аналогами антибиотика дистамицина А, адсорбированными на ДНК / Ю.Д. Нечипуренко, А.С. Крылов, А.С. Заседателев, Г.В. Гурский // *Молек. биология.* — 1984. — V. 18, № 2. — P. 332-342.
231. Ren, J. Energetics of DNA intercalation reactions / J. Ren, T.C. Jenkins, J.B. Chaires // *Biochemistry.* — 2000. — V. 39, № 29. — P. 8439-8447.
232. Chaires, J.B. Possible origin of differences between van't Hoff and calorimetric enthalpy estimates / J.B. Chaires // *Biophys. Chem.* — 1997. — V. 64, № 1-3. — P. 15-23.
233. Ha, J.-H. Role of the hydrophobic effect in stability of site-specific protein-DNA complexes / J.-H. Ha, R.S. Spolar, M.T. Record Jr // *J. Mol. Biol.* — 1989. — V. 209, № 4. — P. 801-816.
234. Chervenak, M.C. A direct measure of the contribution of solvent reorganization to the enthalpy of binding / M.C. Chervenak, E.J. Toone // *J. Am. Chem. Soc.* — 1994. — V. 116, № 23. — P. 10533-10539.
235. Gallagher, K. Electrostatic contributions to heat capacity changes of DNA-ligand binding / K. Gallagher, K. Sharp // *Biophys. J.* — 1998. — V. 75, № 2. — P. 769-776.
236. Kostjukov, V.V. Partition of thermodynamic energies of drug-DNA complexation / V.V. Kostjukov, N.M. Khomytova, M.P. Evstigneev // *Biopolymers.* — 2009. — V. 91, № 9. — P. 773-790.
237. Kostjukov, V.V. Electrostatic contribution to the energy of binding of aromatic ligands with DNA / V.V. Kostjukov, N.M. Khomytova, D.B. Davies, M.P. Evstigneev // *Biopolymers.* — 2008. — V. 89, № 8. — P. 680-690.
238. Ross, P.D. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability / P.D. Ross, S. Subramanian // *Biochemistry.* — 1981. — V. 20, № 11. — P. 3096-3102.
239. Buchelnikov, A.S. On the reliability of quantitation of biological effect in drug-interceptor-DNA systems / A.S. Buchelnikov, V.P. Evstigneev, L.E. Rodríguez Oropeza, M.P. Evstigneev // *Eur. Biophys. J.* — 2013. — V. 42, № 4. — P. 315-319.
240. Евстигнеев, В.П. Влияние неточности определения физико-химических параметров взаимодействия ароматических соединений в ДНК-содержащих системах на расчет фактора A_D / В.П. Евстигнеев, А.С. Бучельников // *Материалы VII Международной конференции “Актуальные вопросы биологической физики и химии” 26-30 апреля 2011 г.* — Севастополь. — 2011. — С. 204-205.
241. Бучельников, А.С. Надежность определения факторов R_D и A_D в трехкомпонентных ДНК-содержащих системах / А.С. Бучельников, В.П. Евстигнеев // *Материалы XI конференции молодых ученых “Радиофизика, Электроника, Фотоника и Биофизика” 29 ноября — 1 декабря 2011 г.* — Харьков. — 2011. — С. 67.
242. Бучельников, А.С. Некоторые аспекты теории интерцепторно-протекторного действия молекул в трехкомпонентных ДНК-содержащих системах / А.С. Бучельников, А.А. Румянцев, В.П. Евстигнеев // *Тезисы докладов XI Международной научной конференции “Ломоносов-2012” 23-27 апреля 2012 г.* — Севастополь. — 2012. — С. 253.
243. Buchelnikov, A.S. Quantitative correlation of the *in vitro* biological effect with parameters of molecular complexation in mutagen-interceptor systems / A.S. Buchelnikov, M.P. Evstigneev // *J. Theor. Biol.* — 2014. — V. 357. — P. 268-271.
244. Бучельников, А.С. Применение теории интерцепторно-протекторного действия к данным биологического эксперимента *in vitro* / А.С. Бучельников, В.А. Рубакина, А.А. Мосунов, М.П. Евстигнеев // *Биофиз. вестник.* — 2013. — Т. 30, № 2. — С. 106-117.
245. Бучельников, А.С. Развитие теории интерцепторно-протекторного действия при совместном связывании биологически активных соединений с ДНК / А.С. Бучельников //

- Сборник тезисов докладов XXI международной конференции молодых ученых “Ломоносов-2014”. — Москва, 7-11 апреля 2014 г. — С. 36-37.
246. Turesky, R.J. Characterization of DNA adducts formed in vitro by reaction of *N*-hydroxy-2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and *N*-hydroxy-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline at the C-8 and N² atoms of guanine / R.J. Turesky, S.C. Rossi, D.H. Welti, J.O. Lay, F.F. Kadlubar // Chem. Res. Toxicol. — 1992. — V. 5, № 4. — P. 479-490.
247. Sugimura, T. Heterocyclic amines: mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish / T. Sugimura, K. Wakabayashi, H. Nakagama, M. Nagao // Cancer Sci. — 2004. — V. 95, № 4. — P. 290-299.
248. Dodin, G. Binding of ellipticine base and ellipticinium cation to calf-thymus DNA / G. Dodin, M.-A. Schwaller, J. Aubard, C. Paoletti // Eur. J. Biochem. — 1988. — V. 176, № 2. — P. 371-376.
249. Sartorius, J. Intercalation mechanisms with ds-DNA: binding modes and energy contributions with benzene, naphthalene, quinoline and indole derivatives including some antimalarials / J. Sartorius, H.-J. Schneider // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. — 1997. — № 11. — P. 2319-2328.