

На правах рукописи

Бучельников Анатолий Сергеевич

**Развитие теории интерцепторно-протекторного действия
при совместном связывании биологически активных соединений с ДНК**

03.01.02 Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Пушино 2015

Работа выполнена на кафедре «Физика» ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

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

Официальные оппоненты: **Нечипуренко Юрий Дмитриевич,**
доктор физико-математических наук, профессор,
Институт молекулярной биологии имени
Н.Н. Энгельгардта РАН, старший научный сотрудник
отдела физики биологических систем

Русаков Алексей Вячеславович,
кандидат физико-математических наук, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, старший научный сотрудник лаборатории биофизики возбудимых сред

Ведущая организация: **ФГБУН Институт биофизики клетки РАН**

Защита состоится 23 сентября 2015 г. в 13³⁰ на заседании совета Д 002.093.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ПНЦ РАН по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область, и на сайте ИТЭБ РАН: <http://web.iteb.psn.ru>.

Автореферат диссертации разослан 11 августа 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.ф.-м.н.



Н.Ф. Ланина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. 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.

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 общем 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 молекулярных компонентов.

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 механизма 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 диссертационного исследования были представлены и обсуждены на: международных научно-технических конфе-

ренциях «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. Тезисы 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, указана связь диссертации с научными программами и темами, сформулированы цели и задачи диссертационного исследования, показана новизна и практическая значимость полученных результатов, а также указан личный вклад соискателя в опубликованные в соавторстве работы.

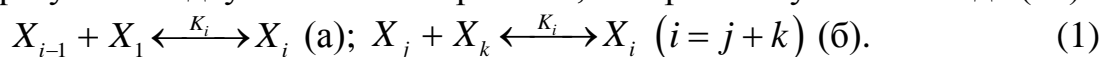
В первом разделе проведен краткий критический анализ накопленных к настоящему времени данных медико-биологических экспериментов на примере трех веществ (так называемых перехватчиков, или интерцепторов): кофеин, рибофлавин (витамин B₂) и хлорофиллин. Показано, что применение этих веществ совместно с ароматическими БАС как на *in vitro*, так и на *in vivo* уровне, выражается в изменении медико-биологического эффекта последних, причиной чему является наличие межмолекулярных взаимодействий. Сформулированы представления об интерцепторном и протекторном механизмах действия перехватчиков. Изложены общие принципы построения количественной теории интерцепторно-протекторного действия (ИПД), показана эволюция от редуцированных теорий ИПД к олигомерной теории. Основным недостатком существующих теорий ИПД признано отсутствие в них строгого учета как интерцепторного, так и протекторного механизмов действия.

Второй раздел посвящен краткому описанию использованного в диссертации спектрофотометрического метода исследования водных растворов ароматических БАС. Рассмотрены методы численного анализа данных, в частности, методы нелинейной оптимизации, такие как метод Левенберга — Марквардта и метод

ломанных доверительных областей (trust-region dogleg method). Вкратце изложены базовые понятия статистико-термодинамических методов моделирования многокомпонентного равновесия: метод трансфер-матриц (transfer matrix method) и метод производящих последовательность функций (sequence generating function method).

Третий раздел диссертационного исследования посвящен созданию статистико-термодинамического базиса интерцепторного механизма действия, т.е., в первую очередь, всеобъемлющей математической модели, учитывающей образование произвольных по составу и длине комплексов молекул.

Доказательство термодинамической выгодности последовательной межмолекулярной агрегации. При моделировании молекулярной агрегации используются два подхода, различающиеся по размеру (длине) присоединяемого агрегата. Нарращивание агрегата путем последовательного присоединения мономеров характеризуется последовательной модой (способом) агрегации (1а), а в случае, когда агрегат образуется из двух меньших агрегатов, говорят о случайной моде (1б):



Идея ответа на вопрос, какая из двух мод является предпочтительной при моделировании межмолекулярной агрегации, состоит в рассмотрении влияния потери трансляционных и вращательных степеней свободы агрегата при добавлении к нему новых молекул (мономеров либо агрегатов меньшего порядка) на саму реакцию комплексообразования. Показано, что в реакции типа (1б) изменения трансляционной и ротационной энтропий всегда будут более отрицательными, чем изменения этих энтропий в реакции типа (1а), независимо от каких-либо предположений относительно формы агрегатов. Это означает, что молекулярная само- и гетероассоциация, происходящая в соответствии с реакцией агрегации случайного типа (1б), энтропийно менее выгодна. Таким образом, допущение о последовательном характере само- и гетероассоциации молекул БАС и ароматических молекул-интерцепторов является корректным.

Обоснование справедливости использования бесконечномерных моделей агрегации. В настоящее время в литературе не существует единого физически обоснованного критерия выбора той или иной модели агрегации в молекулярных системах в контексте ограничений, вводимых на длину образующихся комплексов. Сравнение двух предельных случаев моделирования самоассоциации — димерной и бесконечномерной моделей, — которые с одинаковой невязкой описывают экспериментальные данные, показало, что они являются неразличимыми (взаимозаменяемыми) при условии $2K_2 = K_\infty$. Причина неразличимости кроется в частном решении общей системы уравнений, описывающих эффект неразличимости. Сформулирован ряд важных рекомендаций, касающихся выбора той или иной модели межмолекулярной ассоциации. В частности, установлено, что общепринятый критерий низких или высоких концентраций для использования соответственно димерной или бесконечномерной моделей в численном анализе экспериментальных данных некорректен.

Анализ существующих статистико-термодинамических подходов к описанию молекулярной гетероассоциации позволяет выделить как минимум два серьезных недостатка, присущих каждому из них:

1) некорректный учет так называемых «отраженных» комплексов, т.е. физически идентичных зеркально симметричных относительно друг друга комплексов, образующихся при бесконечномерной агрегации;

2) приближенный учет так называемых краевых эффектов, т.е. зависимости экспериментально измеряемого параметра от типа соседних молекул в комплексе.

В настоящей работе создана строгая статистико-термодинамическая модель гетероассоциации, учитывающая образование молекулярных комплексов произвольного состава и длины и лишенная отмеченных выше недостатков. Ключевым объектом модели является большая статистическая сумма, на основании которой далее могут быть записаны уравнения, связывающие параметры молекулярного равновесия с экспериментально наблюдаемым параметром. В диссертации приведены два способа вывода модели — с помощью метода трансфер-матриц и метода производящих последовательность функций. Здесь рассмотрим только метод трансфер-матриц, имея в виду, что в работе доказана полная эквивалентность двух подходов при описании молекулярной гетероассоциации в многокомпонентных системах БАС.

Вывод большой статистической суммы с помощью метода трансфер-матриц. Основным объектом матричной модели N -компонентной гетероассоциации является трансфер-матрица \mathbf{M} размера $N \times N$:

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

где K_{ij} — равновесная константа ассоциации молекул типа i и j , C_j — молярная концентрация молекул типа j . Возведение матрицы \mathbf{M} в степень $n-1$ позволяет перебрать все возможные комбинации n молекул N различных типов в n -мере. Далее, полученная степень матрицы \mathbf{M} может быть использована для получения большой статистической суммы N -компонентной системы:

$$\Xi = \sum_{n=1}^{\infty} \mathbf{c} \mathbf{M}^{n-1} \mathbf{1}^T = \mathbf{c} (\mathbf{I} - \mathbf{M})^{-1} \mathbf{1}^T, \quad (2)$$

где $\mathbf{c} = (C_1 \ C_2 \ \dots \ C_N)$, \mathbf{I} — единичная матрица порядка N .

Большая статистическая сумма (2) содержит статистические веса всех возможных комплексов, формирующихся в растворе. Весь набор этих комплексов содержит также зеркально симметричные, или «отраженные», комплексы. При условии равенства равновесных констант $K_{ij} = K_{ji}$ они становятся физически неразличимыми. Принимая во внимание, что «отраженные» комплексы являются физически эквивалентными, скорректируем большую статистическую сумму (2):

$$\Xi_{\text{corr}} = \frac{\Xi + \Xi_{\text{symm}}}{2}, \quad (3)$$

где Ξ_{symm} — статистическая сумма симметричных относительно своего геометрического центра комплексов. Для получения развернутого вида Ξ_{symm} вводятся вспомогательные матрицы:

$$\mathbf{M}_s = \begin{pmatrix} K_{11}C_1 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & K_{22}C_2 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & K_{NN}C_N \end{pmatrix}, \quad \mathbf{M}_d = \mathbf{M} \circ \mathbf{M} = \begin{pmatrix} K_{11}^2C_1^2 & K_{12}^2C_2^2 & \cdots & K_{1N}^2C_N^2 \\ K_{21}^2C_1^2 & K_{22}^2C_2^2 & \cdots & K_{2N}^2C_N^2 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ K_{N1}^2C_1^2 & K_{N2}^2C_2^2 & \cdots & K_{NN}^2C_N^2 \end{pmatrix}.$$

Возведение матрицы \mathbf{M}_d в степень $n-1$ дает статистическую сумму двух «половин» симметричных комплексов общей длиной $2(n-1)$. После математических преобразований статистическая сумма симметричных относительно своего геометрического центра комплексов принимает вид:

$$\Xi_{\text{symm}} = \sum_{n=1}^{\infty} \mathbf{c}(\mathbf{I} + \mathbf{M}_s) \mathbf{M}_d^{n-1} \mathbf{1}^T = \mathbf{c}(\mathbf{I} + \mathbf{M}_s) (\mathbf{I} - \mathbf{M}_d)^{-1} \mathbf{1}^T. \quad (4)$$

Наконец, подстановка выражений (2) и (4) в выражение (3) позволяет получить скорректированную большую статистическую сумму N -компонентной системы:

$$\Xi_{\text{corr}} = \frac{1}{2} \mathbf{c} \left((\mathbf{I} - \mathbf{M})^{-1} + (\mathbf{I} + \mathbf{M}_s) (\mathbf{I} - \mathbf{M}_d)^{-1} \right) \mathbf{1}^T. \quad (5)$$

Если ввести вспомогательные матричные объекты:

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

то выражение (5) принимает окончательный вид:

$$\Xi_{\text{corr}} = \frac{1}{2} \mathbf{1} \left[(\Delta_c^{-1} - \mathbf{K})^{-1} + (\Delta_c^{-1} + \mathbf{K}_s) (\Delta_c^{-2} - \mathbf{K}_d)^{-1} \right] \mathbf{1}^T. \quad (6)$$

Вывод выражения для закона сохранения массы. Знание Ξ_{corr} позволяет получить равновесные параметры взаимодействия молекул в растворе, основываясь на формализме статистических сумм, который уже не связан с конкретным способом вывода статистической суммы. Общие концентрации C_{0i} могут быть найдены путем дифференцирования большой статистической суммы (5) по натуральному логарифму соответствующих мономерных концентраций C_i . Закон сохранения массы в N -компонентной системе в матричной форме имеет вид:

$$\Delta_T = \frac{1}{2} \left[(\mathbf{I} - \mathbf{M})^{-1} \mathbf{1}^T \mathbf{1} \Delta_c (\mathbf{I} - \mathbf{M})^{-1} + (\mathbf{I} - \mathbf{M}_d)^{-1} \mathbf{1}^T \mathbf{1} \Delta_c (\mathbf{I} + 2\mathbf{M}_s + \mathbf{M}_d) (\mathbf{I} - \mathbf{M}_d)^{-1} \right]. \quad (7)$$

где Δ_T — диагональная матрица размером $N \times N$, содержащая на главной диагонали общие концентрации соответствующих компонентов системы.

Вывод выражения для экспериментально наблюдаемого параметра. Экспериментально наблюдаемый параметр ξ_{0i} молекул i -го типа может быть получен путем усреднения собственных наблюдаемых параметров комплексов $\xi_i^{(s)}$:

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

где $\xi_i^{(m)}$ — наблюдаемый параметр молекулы, находящейся в мономерном состоянии; $f_i^{(s)}$ — мольная доля; $\Delta \xi_i^{(s)} = \xi_i^{(m)} - \xi_i^{(s)}$. После проведения некоторых преобразований данное выражение может быть записано в матричном виде:

$$\xi_0 = \xi_m - t \Delta_T^{-1} (\xi_m - \xi) \mathbf{S}, \quad (8)$$

где ξ_0 — $N \times N$ матрица, содержащая на главной диагонали экспериментально наблюдаемые параметры молекул всех типов; матрица \mathbf{S} является производной по логарифмам равновесных констант ассоциации;

$$\xi_m = \begin{pmatrix} \xi_1^{(m)} & \cdots & \xi_1^{(m)} \\ \vdots & & \vdots \\ \xi_N^{(m)} & \cdots & \xi_N^{(m)} \end{pmatrix}; \quad \xi = \begin{pmatrix} \xi_{11} & \cdots & \xi_{1N} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \xi_{N1} & \cdots & \xi_{NN} \end{pmatrix}.$$

Исследование частных случаев модели многокомпонентной гетероассоциации. Выведенная обобщенная модель легко сводится к известным в литературе частным случаям, что косвенно доказывает ее универсальность. Важным частным случаем обобщенной матричной модели является ситуация, 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. Модель такой агрегации обозначается как $1:n$ — для двухкомпонентной системы, $1:m:n$ — для трехкомпонентной системы и т.д. Большая статистическая сумма для таких систем в общем виде записывается следующим образом:

$$\Xi_{\text{corr}}^{(1)} = \Xi_{\text{corr}} \Big|_{C_i=0} + C_i \frac{\partial \Xi_{\text{corr}}}{\partial C_i} \Big|_{C_i=0}. \quad (9)$$

Подстановка выражения (5) в (9) при $N=2$ и $N=3$ позволяет получить статистические суммы $\Xi_{\text{corr}}^{(1)}$ для $1:n$ и $1:m:n$ моделей соответственно, которые в дальнейшем будут применены при построении обобщенной теории ИПД.

Верификация моделей гетероассоциации проводилась в два этапа: расчет равновесных параметров гетероассоциации в двухкомпонентных системах и затем подстановка полученных значений в расчет трехкомпонентных систем. В рамках настоящей работы были проведены эксперименты, в которых одним из компонентов являлся краситель (профлавин (PF)), другим — вещество, не поглощающее свет в видимой области (кофеин (CAF), никотинамид (NMD)). Во всех экспериментах концентрация профлавина составляла $1,26 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Здесь и далее эксперименты проводились при постоянных $\text{pH} = 6,86$ и температуре $T = 298$ К.

Изменения в спектрах красителя (рис. 1, 2) свидетельствуют о наличии взаимодействия между молекулами PF и CAF и формировании в растворе гетерокомплексов PF-CAF и PF-NMD. Аппроксимация концентрационных зависимостей по $1:n$ модели (рис. 1б, 2б) позволила рассчитать параметры двухкомпонентного равновесия (таблица 1), а именно константу гетероассоциации K_h и коэффици-

ент экстинкции гетеродимера ϵ_h . Также в таблице 1 приведены значения коэффициентов детерминации R^2 , свидетельствующие о хорошем качестве аппроксимации.

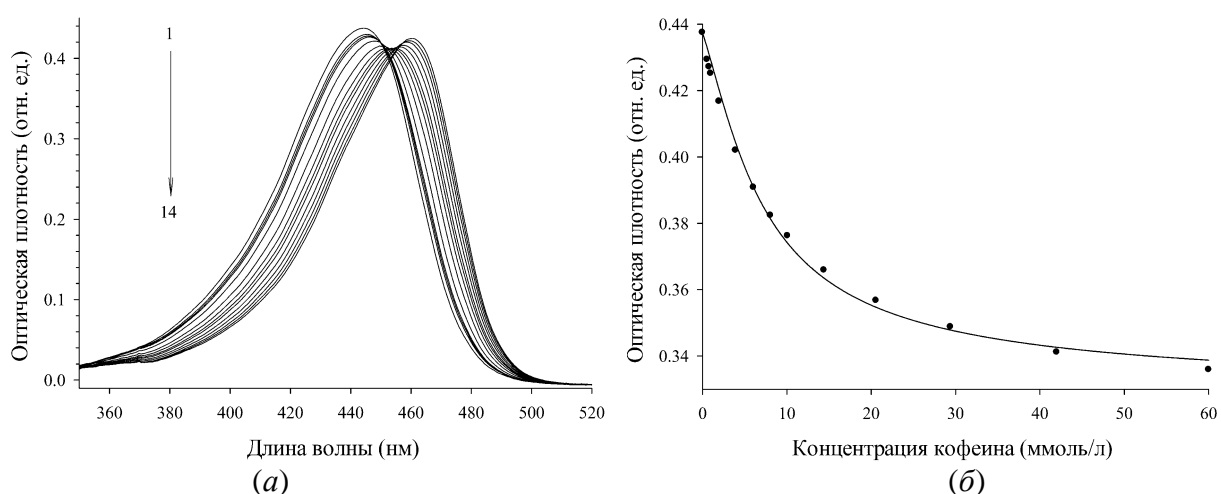


Рис. 1. Электронные спектры поглощения растворов PF-CAF (а) и зависимость оптической плотности этих растворов от концентрации CAF, снятая на длине волны 444,5 нм (б); точками показаны экспериментальные данные, сплошной линией – теоретическая аппроксимация.

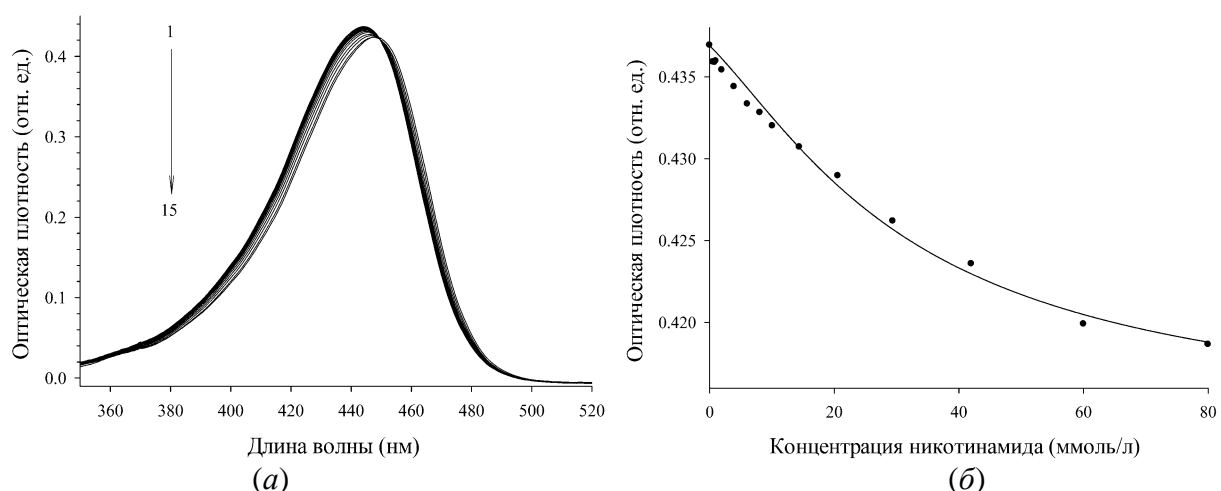


Рис. 2. Электронные спектры поглощения растворов PF-NMD (а) и зависимость оптической плотности этих растворов от концентрации NMD, снятая на длине волны 444,5 нм (б); точками показаны экспериментальные данные, сплошной линией – теоретическая аппроксимация.

Таблица 1 — Численные значения равновесных параметров гетероассоциации

Система	K_h , л/моль	ϵ_h , л/(моль·см)	R^2
PF-CAF	139,7	30246	0,9937
PF-NMD	31,5	33710	0,9878

Верификация модели трехкомпонентных взаимодействий заключалась в подстановке в исходную вычислительную процедуру значений равновесных параметров само- и гетероассоциации, полученных ранее из экспериментов по исследованию одно- и двухкомпонентных систем. При этом осуществлялся только расчет мономерных концентраций по уравнениям закона сохранения массы, под-

гонка теоретической кривой титрования под экспериментальную не производилась. Расчетная кривая на рис. 3б достаточно неплохо описывает экспериментальную, что указывает на справедливость 1:m:n модели гетероассоциации.

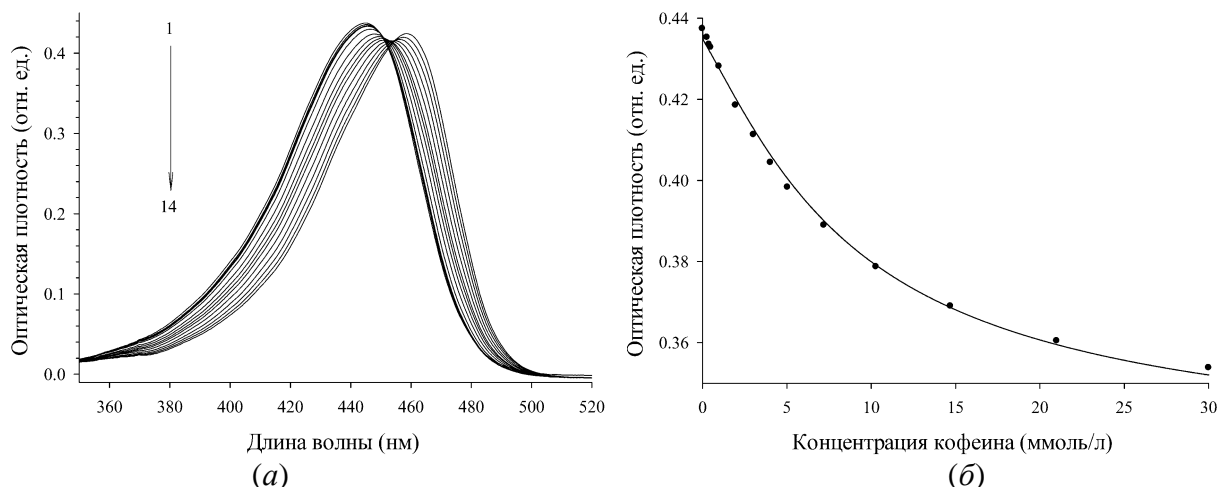


Рис. 3. Электронные спектры поглощения трехкомпонентных растворов PF-CAF-NMD (а) и зависимость оптической плотности этих растворов от концентрации САФ, снятая на длине волны 444,5 нм (б). Концентрация NMD составляла $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л, см. обозначения рисунка 1. Точками показаны экспериментальные данные, сплошной линией – теоретическая аппроксимация.

Четвертый раздел диссертации посвящен развитию теории интерцепторно-протекторного действия (ИПД) на случай многокомпонентного конкурентного связывания биологически активных соединений с ДНК.

Формулировка основных положений обобщенной теории ИПД. Отправной точкой создания обобщенной теории ИПД является представление о гетероассоциации (интерцепторный механизм) и конкуренции за места посадки на ДНК (протекторный механизм) как о двух базовых молекулярных процессах, изменяющих эффективную концентрацию препарата при введении интерцепторов и модулирующих таким образом измеряемый биологический отклик. Сформулированы пять базовых допущений обобщенной теории ИПД, описывающих условия протекания реакций нековалентного комплексообразования и имеющих характер постулатов.

Закон сохранения массы в N-компонентной ДНК-содержащей системе записывается в виде системы N уравнений вида

$$C_i^{(0)} = \frac{\partial Z_{\text{het}}}{\partial \ln C_i} + \theta_i N_0, \quad (10)$$

где $C_i^{(0)}$, C_i — соответственно общая и мономерная концентрации лиганда i -го типа, 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. Для определения долей θ_i система уравнений типа (10) дополняется системой N уравнений МакГи — фон Хиппеля (J. Mol. Biol., 1974, 86, 469-489):

$$\theta_i = K_{iN} C_i \left(1 - \sum_{k=1}^N n_k \theta_k \right) \left(\frac{1 - \sum_{k=1}^N n_k \theta_k}{1 - \sum_{k=1}^N (n_k - 1) \theta_k} \right)^{n_i - 1}, \quad (11)$$

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. Использование уравнений МакГи — фон Хиппеля (11) отражает ключевую особенность обобщенной теории ИПД — учет взаимодействия лигандов с полимерной ДНК.

Расчет факторов R_D и A_D . Основу количественной теории ИПД составляет анализ значений так называемых факторов R_D и A_D , вводимых для оценки вкладов протекторного и интерцепторного механизмов в общее взаимодействие интерцепторов с ДНК и вычисляемых по формулам:

$$R_D = \frac{\theta_X^{(0)} - \theta_X^{(C)}}{\theta_X^{(0)} - \theta_X^{(H)}}, \quad A_D = \frac{\theta_X^{(0)} - \theta_X}{\theta_X^{(0)}}. \quad (12)$$

где $\theta_X^{(C)}$ — мольная доля комплексов X -ДНК (под X понимается основной, действующий препарат) при «отключенной» гетероассоциации и «включенном» комплексообразовании всех интерцепторов с ДНК; $\theta_X^{(H)}$ — мольная доля комплексов X -ДНК при «включенной» гетероассоциации и «отключенном» комплексообразовании всех интерцепторов с ДНК; $\theta_X^{(0)}$ — мольная доля комплексов X -ДНК при «отключенных» гетероассоциации и комплексообразовании всех интерцепторов с ДНК; θ_X — мольная доля молекул препарата X , связанных с ДНК в присутствии молекул интерцепторов при «включенных» гетероассоциации и комплексообразовании. Фактор A_D тождественен 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.

Модификация уравнений обобщенной теории ИПД для анализа спектрофотометрических данных заключается в объединении 1: n модели гетероассоциации с подходом МакГи — фон Хиппеля с использованием системы уравнений вида (10). Выведено выражение для экспериментально наблюдаемого параметра, позволяющего проводить аппроксимацию зависимостей оптической плотности препарата от концентрации другого компонента системы.

Верификация уравнений обобщенной теории ИПД заключалась в определении степени отклонения расчетной концентрационной зависимости наблюдаемого параметра от экспериментально измеренной. Были проведены эксперименты титрованием в трехкомпонентных системах Бромистый этидий (EB) — Кофеин (CAF) — ДНК и Профлавин (PF) — Кофеин (CAF) — ДНК (использовалась ДНК молок лосося). На рис. 4, 5 представлены соответственно спектры поглощения бромистого этидия и профлавина в их смесях с кофеином, с одной стороны, и с кофеином и ДНК, с другой.

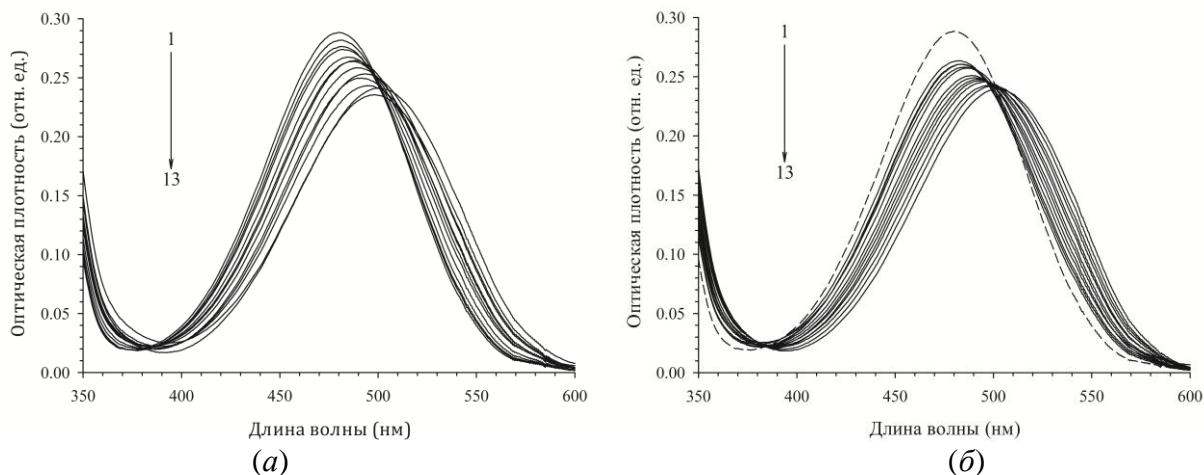


Рис. 4. Электронные спектры поглощения растворов EB ($x_0 = 50$ мкмоль/л) с САФ (а) и с САФ и ДНК ($N_0 = 28.9$ мкмоль/л) (б). На рисунке (б) пунктирной линией изображен спектр чистого EB.

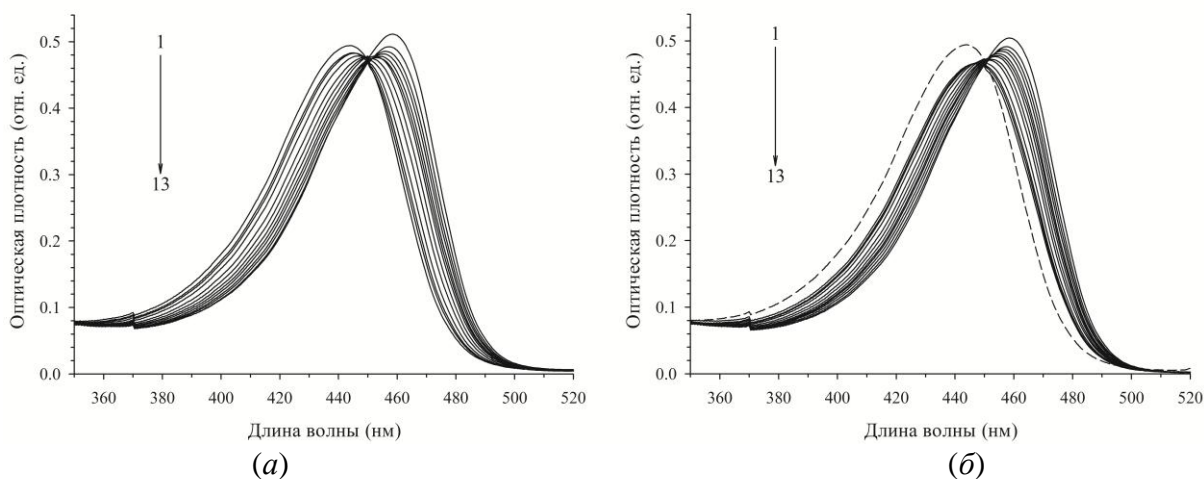


Рис. 5. Электронные спектры поглощения растворов PF ($x_0 = 13$ мкмоль/л) с САФ (а) и с САФ и ДНК ($N_0 = 19.5$ мкмоль/л) (б). На рисунке (б) пунктирной линией изображен спектр чистого PF.

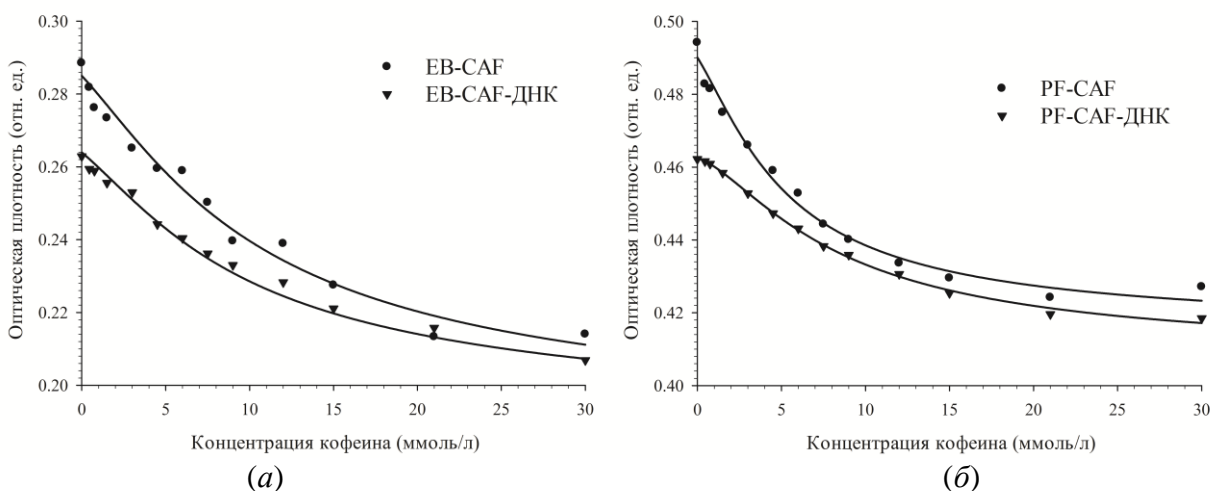


Рис. 6. Зависимости оптической плотности растворов с бромистым этидием (а) и профлавином (б) от концентрации кофеина на длинах волн 480 нм и 444 нм соответственно. Точками показаны экспериментальные данные, сплошными линиями – аппроксимирующие кривые.

В обоих случаях из сравнения двух наборов спектров четко наблюдается достаточно сильное взаимодействие как между красителем и кофеином, так и между красителем и ДНК. Четко прослеживаются батохромные сдвиги полос поглощения обоих красителей, что свидетельствует об образовании достаточно прочных комплексов.

Аппроксимации подвергались значения оптической плотности растворов различной концентрации, снятой на максимуме поглощения свободного красителя (рис. 6). Из рисунка видно, что аппроксимация кривых является вполне удовлетворительной, что свидетельствует об успешной верификации и адекватности подобранной модели.

Редуцирование обобщенной теории ИПД к олигомерной теории. Показано, что выведенная и верифицированная ранее олигомерная теория ИПД не противоречит обобщенной теории, являясь ее частным случаем. Действительно, представляя олигомеры ДНК как отдельные независимые участки полимерной ДНК, уравнения МакГи — фон Хиппеля трансформируются в уравнения Скэтчарда (Ann. New York Acad. Sci., 1949, 51, 660-672):

$$\theta_i = \frac{K_{iN} C_i}{1 + \sum_{k=1}^N K_{kN} C_k}. \quad (13)$$

Следует заметить, что при $N = 2$ уравнения (13) полностью соответствуют уравнениям из олигомерной теории ИПД.

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* были подобраны подходящие концентрации компонентов (Препарат, Интерцептор, ДНК), называемые квазифизиологическими условиями:

$$x_0 = 10 \text{ мкмоль/л}, y_0 \text{ — var}, N_0 = 40 \text{ мкмоль/л}. \quad (14)$$

На рис. 7 изображены зависимости факторов R_D , A_D от концентрации кофеина в трехкомпонентных системах Препарат — Кофеин — ДНК, рассчитанные по формулам (12).

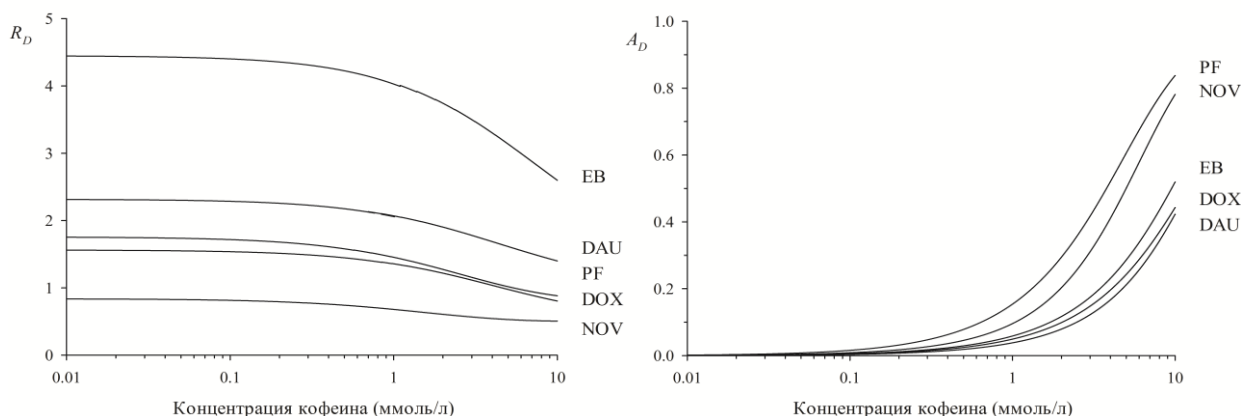


Рис. 7. Зависимости факторов R_D и A_D от концентрации кофеина при квазифизиологических условиях (14) в системах Препарат — Кофеин — ДНК. В качестве препарата были использованы PF (профлавин), NOV (новатрон), EB (бромитсый этидий), DOX (доксорубицин), DAU (дауномицин).

Из рис. 7 видно, что 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 того или иного препарата к добавлению кофеина, в целом совпадают с полученными ранее аналогичными значениями при помощи олигомерной теории ИПД.

Теория ИПД без учета протекторного механизма. В качестве частного случая обобщенной теории ИПД можно рассматривать ситуацию, при которой исключен протекторный механизм действия, что выражается в исключении из уравнений закона сохранения массы всех слагаемых, ответственных за комплексообразование интерцепторов с ДНК, т.е. эквивалентно обнулению доли θ_Y . Это допущение вводится некоторыми исследователями на основании малости значения константы комплексообразования интерцептора с ДНК либо невозможности проведения качественного независимого эксперимента в системе Интерцептор — ДНК с целью установления точного значения этой константы. Соответствующее упрощение исходных уравнений олигомерной теории ИПД приводит к выражению:

$$A_D \approx \frac{K_h y_0}{1 + K_h y_0}. \quad (15)$$

Теория ИПД без учета интерцепторного механизма. В этом случае константы гетероассоциации обнуляются и Z_{het} в (10) редуцируется к статистической сумме самоассоциации лиганда. Тогда система (11) описывает обычное независимое связывание с ДНК N типов лигандов либо, что то же самое, — связывание с ДНК одного и того же лиганда, но различными способами (т.н. случай мультимодального связывания). Для многокомпонентной 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 (10) примет вид:

$$C_i^{(0)} = C_i + \sum_{j=1}^{m_i} \theta_{i(j)} N_0. \quad (16)$$

Примером исследования мультимодального связывания в диссертации является спектрофотометрический эксперимент по изучению связывания EB с ДНК при различных концентрациях и температурах. Предполагается, что EB связывается с полимерной ДНК двумя способами: интеркаляцией и электростатическим связыванием с внешней поверхностью полимера. Анализ термодинамики комплексообразования EB-ДНК проводился по концентрационным зависимостям оптической плотности смеси на длине волны, соответствующей максимуму поглощения красителя в мономерной форме в диапазоне температур 19-55 °С. В основу анализа данных эксперимента было положено предположение о том, что лиганд существует в растворе в мономерной и в связанной с ДНК формах.

Расчетные значения равновесной константы комплексообразования укладываются в график, изображенный на рис. 8. Характерной особенностью этой зависимости является ее выраженная нелинейная форма, которая с одной стороны может интерпретироваться как проявляющаяся в «загибе» кривой при понижении температуры. Различные варианты интерпретации этого феномена указывают на

то, что эта особенность кривых Вант-Гоффа отражает именно факт бимодального связывания красителя ЕВ с ДНК.

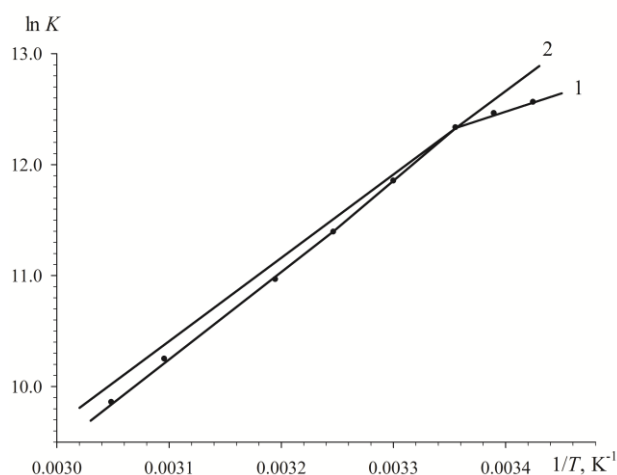


Рис. 8. Зависимость $\ln K$ от $1/T$ комплексообразования ЕВ-ДНК: 1 — экспериментальные данные; 2 — аппроксимирующая прямая, параллельно перенесенная в точку касания с графиком (1) при $T = 298$ К.

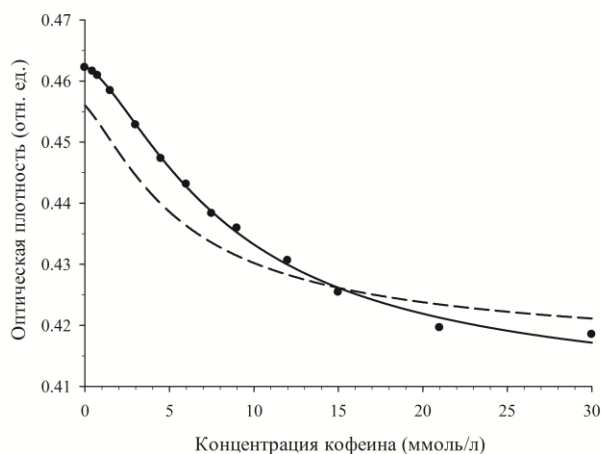


Рис. 9. Результаты аппроксимации экспериментальных данных по системе PF-SAF-ДНК. Точками показаны экспериментальные данные, сплошными линиями — аппроксимирующие кривые.

Доказательство необходимости учета протекторного механизма в кофеин-содержащих системах. Рассмотрим случай нековалентного связывания с ДНК двух классических интеркаляторов — бромистого этидия и профлавина — в присутствии кофеина. Исключение из рассмотрения протекторного механизма означало бы отсутствие взаимодействия между интерцептором и ДНК, т.е. обнуление соответствующих констант взаимодействия в системе уравнений баланса массы обобщенной теории ИПД (10), (11). Были проанализированы зависимости оптической плотности в исследованных системах ЕВ-SAF-ДНК и PF-SAF-ДНК (последняя в качестве примера представлена на рис. 9). Сплошными линиями указаны расчетные кривые титрования, аналогичные тем, что указаны на рис. 6. Пунктирными линиями показаны кривые, рассчитанные по тем же уравнениям, в которых произведено обнуление константы комплексообразования интерцепторов с ДНК. Аппроксимация экспериментальных зависимостей становится заметно хуже, что однозначно указывает на частичное несоответствие модели эксперименту. Полученный результат является экспериментальным доказательством важности учета протекторного механизма в трехкомпонентных кофеин-содержащих системах (при условии нековалентного связывания всех компонент с ДНК) в диапазоне концентраций, близких к квазифизиологическим концентрациям (14).

Надежность количественного описания биологического эффекта в рамках обобщенной теории ИПД. В рамках диссертационного исследования был выяснен вопрос о надежности оценки величины изменения биологического эффекта (фактор A_D). Показано, что погрешность измерения концентраций, входящих в систему уравнений закона сохранения массы, практически не играет значимой роли в оценке фактора A_D . Это отражает свойство «инертности» фактора A_D по отношению к квазифизиологическим концентрациям, экспериментальное определение

которых обычно сильно затруднено, и частично снимает проблему переноса физико-химических параметров взаимодействия на реальную биологическую систему.

Наибольшее влияние на значение фактора A_D оказывают три основных параметра: константы гетероассоциации K_h , а также константы комплексообразования препарата (K_{XN}) и интерцептора (K_{YN}) с ДНК. 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 данными параметрами. Обсуждение взаимосвязи физико-химических параметров взаимодействия и данных биологического эксперимента *in vitro* будет рассмотрено ниже.

Применение теории ИПД к данным биологического эксперимента. 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 препаратов X при фиксированной концентрации интерцепторов Y .
- 2) оценка по зависимости A_D от концентрации интерцептора y_0 .

Вся совокупность известных нам опубликованных данных биологического эксперимента *in vitro* условно может быть разбита на две группы:

- 1) измерение цитостатического или цитотоксического эффекта действия лиганда X в присутствии Y на пролифелирующих клеточных линиях;
- 2) измерение мутагенной активности лиганда X в присутствии Y в бактериальных системах.

Точечная оценка фактора A_D по данным мутагенного теста. Анализ литературных данных указывает на существование фундаментальной взаимосвязи величины измеряемого в мутагенном тесте биологического параметра и величины константы гетероассоциации. В целях проверки адекватности теории ИПД мутагенному тесту были взяты данные по большому числу ароматических мутагенов имидазо-хинолинового типа (IQ) в присутствии молекулы-интерцептора хлорофиллина (CHL), представленные в работе Дэшвуда и Гуо (Environ. Mol. Mutagen., 1993, 22, 164-171). Согласно современным представлениям, мутагены IQ-типа действуют путем ковалентного связывания с ДНК, что исключает роль протекторного механизма со стороны CHL. Эта ситуация может быть промоделирована в рамках теории ИПД без протекторного механизма: т.е. необходимо использовать уравнение (15) для расчета фактора A_D . С учетом микромолярных концентраций CHL, использованных в работе Дэшвуда, получена связь измеряемого в биологическом эксперименте параметра I_{50} с константой гетероассоциации K_h в виде:

$$I_{50} = B/K_h. \quad (17)$$

где B — некоторый постоянный множитель. Аппроксимация выражением (17) данных Дэшвуда дает значительно лучшее соответствие эксперименту ($R^2 = 0.94$), чем исходная аппроксимация линейной зависимостью ($R^2 = 0.82$), представленная в цитируемой работе (рис. 10).

Полученные результаты указывают на возможность применения теории ИПД к данным мутагенного теста при условии доминирования интерцепторного механизма действия. Выявление фундаментального эффекта действия интерцепторного механизма в форме (17) для мутагенного теста является одним из важных достижений теории ИПД вообще и результатов настоящей работы в частности.

Точечная оценка фактора A_D по данным эксперимента на пролифелирующих клеточных линиях. Анализ литературы показал, что практически во всех известных случаях (точечная оценка для систем доксорубицин — кофеин, новатрон — кофеин и оценка по концентрационной зависимости в системе топотекан — кофеин) теория ИПД дает хорошее согласие с данными эксперимента на пролифелирующих клеточных линиях в отношении измеряемого биологического параметра, характеризующего изменение цитотоксической активности основного препарата при введении интерцептора. Таким образом, пролифелирующие клеточные линии остаются объектом, наиболее однозначно описываемым в рамках теории ИПД.

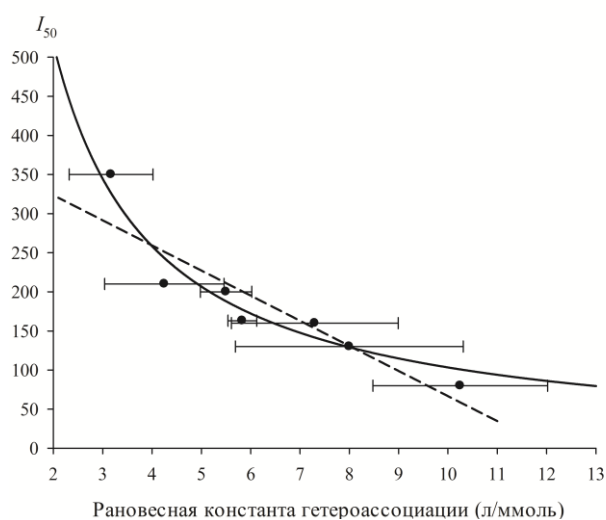


Рис. 10. Корреляция значений I_{50} со значениями констант гетероассоциации IQ-SHL: пунктирная прямая — линия регрессии из работы Дэшвуда и Гуо; сплошная кривая — зависимость, рассчитанная по уравнению (17).

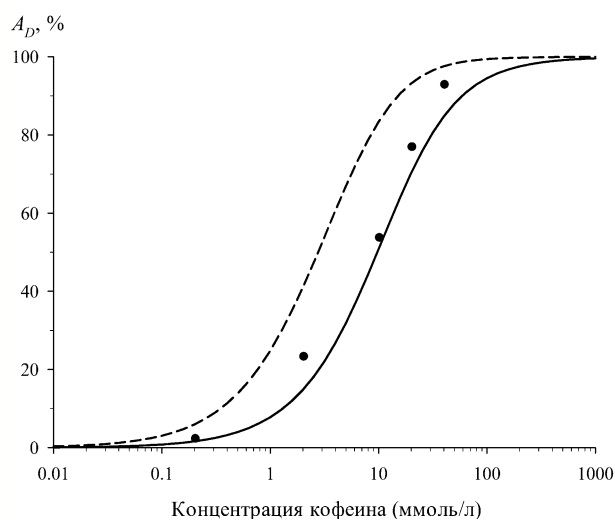


Рис. 11. Зависимости фактора A_D в системе IQ-CAF-ДНК от концентрации кофеина: экспериментально пересчитанный A_D , расчет A_D с учетом (пунктирная кривая) и без учета (сплошная кривая) протекторного механизма.

Оценка по концентрационной зависимости фактора A_D . С использованием мутагенного теста группа исследователей из Университета Гданьска (Польша) измерили зависимость изменения мутагенной активности ароматических аминов типа IQ в присутствии различных ксантинов, включая CAF (Bioorg. Chem., 2005, 33, 402-413; Bioorg. Chem., 2011, 39, 10-17). На рис. 11 точками представлены эти данные в пересчете на единицы A_D . Отсутствие учета протекторного механизма (см. результаты анализа данных Дэшвуда и Гуо выше) приводит к более качественной аппроксимации экспериментальной зависимости $A_D(y_0)$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе дано развитие обобщенной теории интерцепторно-протекторного действия (ИПД) для комбинаций ДНК-связывающихся ароматических БАС в системах Препарат — Интерцептор1 — Интерцептор2 — ... — ДНК.

Можно выделить следующие основные направления дальнейшего развития теории ИПД:

1. Строгое преобразование уравнений теории ИПД на случай ковалентного связывания основного препарата с ДНК.

2. Поиск корреляции между константами комплексообразования препарата и интерцепторов с ДНК, с одной стороны, и данными биологического эксперимента, с другой, 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 интерес адаптация теории ИПД к системам подобного рода.

ВЫВОДЫ

Основные выводы диссертации 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 — ... — ЛигандN. 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 пролиферирующих клеточных линиях и мутагенности в бактериаль-

ных системах, индуцированных комбинациями ароматических БАС. Выявлена функциональная взаимосвязь константы гетероассоциации и наблюдаемого в биологическом эксперименте параметра при условии доминирования интерцепторного механизма действия.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Барановский С.Ф., Чернышев Д.Н., Бучельников А.С., Евстигнеев М.П. Термодинамический анализ комплексообразования бромида этидия с ДНК в водном растворе // Биофизика. — 2011. — Т. 56, № 2. — С. 235-241.
2. Buchelnikov A.S., Hernandez Santiago A.A., Gonzalez Flores M., Vazquez Ramirez R., Davies D.B., Evstigneev M.P. General analysis of competitive binding in drug-interceptor-DNA systems // Eur. Biophys. J. — 2012. — V. 41, № 3. — P. 273-283.
3. Evstigneev M.P., Buchelnikov A.S., Evstigneev V.P. Random versus sequential pathway of molecular self-assembly // Phys. Rev. E. — 2012. — V. 85, № 6. — Art. No. 061405.
4. Buchelnikov A.S., Khrustalev A.F., Evstigneev M.P. Development of an analytical approach to study a three-component hetero-association by means of spectrophotometry // Appl. Spectrosc. — 2013. — V. 67, № 1. — P. 29-35.
5. Evstigneev M.P., Buchelnikov A.S., Kostjukov V.V., Pashkova I.S., Evstigneev V.P. Indistinguishability of the models of molecular self-assembly // Supramol. Chem. — 2013. — V. 25, № 4. — P. 199-203.
6. Buchelnikov A.S., Evstigneev V.P., Rodríguez Oropeza L.E., Evstigneev M.P. On the reliability of quantitation of biological effect in drug-interceptor-DNA systems // Eur. Biophys. J. — 2013. — V. 42, № 4. — P. 315-319.
7. Buchelnikov A.S., Evstigneev V.P., Evstigneev M.P. General statistical-thermodynamical treatment of one-dimensional multicomponent molecular hetero-assembly in solution // Chem. Phys. — 2013. — V. 421. — P. 77-83.
8. Buchelnikov A.S., Evstigneev M.P. Quantitative correlation of the *in vitro* biological effect with parameters of molecular complexation in mutagen-interceptor systems // J. Theor. Biol. — 2014. — V. 357. — P. 268-271.
9. Бучельников А.С., Рубакина В.А., Мосунов А.А., Евстигнеев М.П. Применение теории интерцепторно-протекторного действия к данным биологического эксперимента *in vitro* // Биофиз. вестник. — 2013. — Т. 30, № 2. — С. 106-117.
10. Бучельников А.С., Евстигнеев В.П. Моделирование многокомпонентного равновесия биологически активных ароматических молекул в водном растворе // Вестник СевНТУ (серия «Физика и математика»). — 2011. — Т. 99. — С. 3-11.
11. Евстигнеев В.П., Бучельников А.С. Модель некооперативных взаимодействий в многокомпонентной смеси ароматических соединений // Материалы V международной конференции “Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии” 21-25 апреля 2009 г. — Севастополь. — 2009. — С. 145-146.

12. Buchelnikov A.S., Evstigneev V.P. Matrix model of non-co-operative interactions of aromatic compounds in multicomponent mixture // Program and Abstracts of Young Scientists Conference “Modern Problems of Theoretical Physics” 22-24 December 2010. — Kyiv. — 2010. — P. 51.
13. Бучельников А.С., Евстигнеев М.П. Исследование межмолекулярной ассоциации в системе профлавин-кофеин-никотинамид // Тезисы докладов X Международной научной конференции “Ломоносов-2011” 25-28 апреля 2011 г. — Севастополь. — 2011. — С. 262.
14. Евстигнеев В.П., Бучельников А.С. Влияние неточности определения физико-химических параметров взаимодействия ароматических соединений в ДНК-содержащих системах на расчет фактора A_D // Материалы VII Международной конференции “Актуальные вопросы биологической физики и химии” 26-30 апреля 2011 г. — Севастополь. — 2011. — С. 204-205.
15. Евстигнеев М.П., Евстигнеев В.П., Бучельников А.С. Теория интерцепторно-протекторного действия при совместном связывании с ДНК ароматических биологически активных соединений // Тези доповідей V з'їзду Українського біофізичного товариства 22-25 червня 2011 р. — Луцьк. — 2011. — С. 56-57.
16. Бучельников А.С., Евстигнеев В.П. Надежность определения факторов R_D и A_D в трехкомпонентных ДНК-содержащих системах // Материалы XI конференции молодых ученых “Радиофизика, Электроника, Фотоника и Биофизика” 29 ноября — 1 декабря 2011 г. — Харьков. — 2011. — С. 67.
17. Бучельников А.С., Румянцев А.А., Евстигнеев В.П. Некоторые аспекты теории интерцепторно-протекторного действия молекул в трехкомпонентных ДНК-содержащих системах // Тезисы докладов XI Международной научной конференции “Ломоносов-2012” 23-27 апреля 2012 г. — Севастополь — 2012. — С. 253.
18. Бучельников А.С., Родригес Оропеса Л.Э., Евстигнеев М.П. Обобщенная модель конкурентного связывания в системах Препарат-Перехватчик-ДНК // Материалы XII конференции молодых ученых “Радиофизика, Электроника, Фотоника и Биофизика” 4-7 декабря 2012 г. — Харьков. — 2012. — С. 16.
19. Бучельников А.С., Евстигнеев М.П. Анализ данных биологического эксперимента *in vitro* на основе теории интерцепторно-протекторного действия ДНК-связывающихся препаратов // Материалы докладов международной научно-методической конференции “Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы” 24-27 июня 2013 г. — Воронеж. — 2013. — С. 109-112.
20. Бучельников А.С. Развитие теории интерцепторно-протекторного действия при совместном связывании биологически активных соединений с ДНК // Сборник тезисов докладов XXI международной конференции молодых ученых “Ломоносов-2014”. — Москва, 7-11 апреля 2014 г. — С. 36-37.

Подписано в печать 05.08.2015. Формат 60×84 1/16.
Гарнитура Times. Усл. п. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ 1.
Оригинал-макет подготовлен и тиражирован в ИПК НИУ «БелГУ»
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

