

УДК 577.113:541.49

## **СТОХАСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ГЕТЕРОАССОЦИИ АРОМАТИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ**

**Евстигнеев М.П.<sup>1</sup>, Дэвис Д.Б.<sup>2</sup>, Веселков А.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Кафедра физики, Севастопольский национальный технический университет,  
Студгородок Севастополь, 99053, Украина;

*E-mail:* [veselkov@sevgtu.sebastopol.ua](mailto:veselkov@sevgtu.sebastopol.ua)

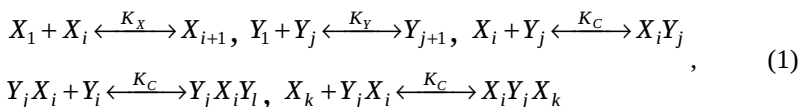
<sup>2</sup> School of Biological and Chemical Sciences, Birkbeck College, University of London,  
Gordon House, 29 Gordon Square, London WC1N 0PP, UK;

*E-mail:* [avease02@students.bbk.ac.uk](mailto:avease02@students.bbk.ac.uk)

*Разработана стохастическая модель гетероассоциации ароматических молекул, применимая для анализа данных ЯМР спектроскопии. Алгоритм вычисления параметров модели позволяет исследовать все возможные комплексы молекул, что существенно расширяет схему реакций, описывающую динамическое равновесие взаимодействующих молекулярных компонент в смешанном растворе.*

**Введение.** Исследования гетероассоциации ароматических молекул представляют важность как с физико-химической точки зрения – для установления природы физических взаимодействий, влияющих на сродство ароматических молекул в растворе, – так и с медико-биологической точки зрения – для выяснения молекулярных механизмов конкурентного связывания ароматических молекул с рецепторами, оказывающих влияние на эффективность действия биологически активных веществ. К этой проблеме можно отнести, например, взаимодействие антибиотиков с ароматическими молекулами из пищевых источников (полифенолы, метилксантины типа кофеина и т.п.), а также вопросы применения антибиотиков при их комбинации. Следовательно, исследование гетероассоциации ароматических молекул имеет отношение к эффективности действия антибиотиков и диете при химиотерапии. Такие исследования также необходимы для количественного анализа эффекта конкурентного связывания различных ароматических молекул с рецепторами, а также для установления молекулярного механизма действия ароматических соединений в качестве регуляторов фармакологической активности антибиотиков и как протекторов ДНК от связывания с ароматическими молекулами мутагенов [1].

Недавно в нашей лаборатории были разработаны различные статистико-термодинамические модели гетероассоциации для анализа данных ЯМР ароматических молекул в смешанных растворах [2,3]. В этих моделях предполагается существование динамического равновесия в растворе, включающего реакции бесконечномерной самоассоциации и гетероассоциации двух компонент  $X$  и  $Y$  в растворе:



где  $X_1$ ,  $Y_1$ , соответственно концентрации мономеров веществ  $X$  и  $Y$ ;  $X_i$ ,  $X_k$ ,  $Y_j$ ,  $Y_l$  – агрегаты, содержащие  $i$ ,  $k$  мономеров  $X$  и  $j$ ,  $l$  мономеров  $Y$ ;  $K_X$ ,  $K_Y$ ,  $K_C$  – равновесные константы самоассоциации и гетероассоциации молекул

С учетом закона действующих масс для схемы реакций (1) и принимая во внимание аддитивность химического сдвига в условиях быстрого молекулярного обмена, можно получить выражения для закона сохранения массы и наблюдаемого протонного химического сдвига как функции концентрации для обоих веществ в смешанном растворе. В сравнении с моделями гетероассоциации предложенными другими авторами [4], настоящие модели дают аналитические выражения, с помощью которых можно проводить анализ процессов гетероассоциации ароматических молекул методом ЯМР практически без ограничений на параметры самоассоциации и экспериментальные концентрации взаимодействующих молекул. Описанный аналитический подход явился важным шагом в проблеме изучения гетероассоциации ароматических молекул в растворе и позволил провести систематические исследования ассоциации молекул обладающих различными медико-биологическими и физико-химическими свойствами: мутаген-мутagen, антибиотик-мутagen и т.п. [1,2].

Вместе с тем, аналитические модели имеют определенные недостатки – это, прежде всего, связано со сложностью и громоздкостью преобразований исходных уравнений, что не позволяет, в частности, рассмотреть с математической точки зрения пути образования комплексов с числом гетеростыков больше двух или учесть кооперативность агрегации каждого из взаимодействующих веществ в реакциях гетероассоциации. В работе [3] проведены подробные математические преобразования для вывода аналитических выражений обобщенной модели некооперативной молекулярной гетероассоциации, из которых можно заключить, что такая задача для четырех и более гетеростыков или тем более с учетом кооперативности самоассоциации каждого из взаимодействующих веществ при комплексообразовании ароматических молекул в растворе является практически неразрешимой. Иными словами аналитические модели на практике позволяют анализировать динамическое равновесие в растворе, описываемое схемой реакций (1). Последнее, однако, справедливо только в том случае, если вклад гетероассоциации в суммарное динамическое равновесие относительно невелик, что справедливо при выполнении следующих условий [3]:

$$K_C < K_X, K_Y; \quad \delta_C > \delta_d, \quad (2)$$

где  $\delta_C$ ,  $\delta_d$  – протонные химические сдвиги в гетерокомплексе в димере.

Если же, например, одно из условий (2) не выполняется, то комплексы с большим числом гетеростыков могут давать ощутимый вклад в равновесное распределение агрегатов и, следовательно, в регистрируемый химический сдвиг, что может привести к большим погрешностям в определении искомых параметров  $K_C$  и  $\delta_C$ . Действительно, в этом случае наличие гетеростыков в агрегате означает, что содержание такого комплекса в растворе может быть выше, чем самоассоциат с таким же числом молекул  $L$ , поэтому уже начиная с длины  $L = 4$  (возможно три гетеростыка) статистико-термодинамические модели будут давать ощутимую систематическую ошибку. В то же время наши исследования свидетельствуют о том, что в некоторых системах “антибиотик-мутagen” [2] условие (2) не выполняется, т.е. вклад гетероассоциации в энергетику комплексообразования существенен по сравнению с самоассоциацией этих молекул, а следовательно в таких молекулярных системах гетерокомплексы с числом гетеростыков больше двух могут влиять на экспериментальные параметры ЯМР. В связи с этим, представляется вполне логичной попытка создать математическую модель гетероассоциации в форме программного алгоритма, учитывающего все возможные гетеростыки в комплексе заданной длины – *стохастическую модель* гетероассоциации ароматических молекул в растворе.

**Результаты и обсуждение.** Алгоритм стохастической модели удобно представить в виде двух подпрограмм: первая вычисляет концентрации веществ  $X$  и  $Y$  (рисунок 1), вторая – химический сдвиг данного протона вещества  $X$  (рисунок 2). Последнее означает, что для реализации стохастического алгоритма в стандартном алгоритме обработки данных по аналитическим моделям требуется просто подменить ссылки на соответствующие подпрограммы расчета ссылками на эти процедуры. Таким образом, вычислительный эксперимент в аналитическом и алгоритмическом подходах моделирования гетероассоциации проводится по единой вычислительной схеме, описанной в работах [1-3].

Рассмотрим произвольный комплекс с числом молекул  $L$  (длина комплекса) и любым количеством гетеростыков от 0 (самоассоциат) до максимально возможного  $L-1$  (чередование молекул  $X$  и  $Y$ ). Поставим в соответствие молекуле вещества  $X$  единицу, а молекуле вещества  $Y$  – ноль. Тогда данный комплекс можно представить в виде двоичного числа  $C$  с количеством битов  $L$  (на рисунках – переменная *Complex*). Тестируя в цикле от 1 до  $L$  каждый бит на состояние 0 или 1 (цикл по переменной  $i$  на рисунках), можно вычислить концентрацию комплекса последовательным умножением константы образования стыка ( $K_X$  – гомостык “11”;  $K_Y$  – гомостык “00”;  $K_C$  – гетеростык “01” или “10”) на мономерную концентрацию бита (“1” –  $x_1$ , “0” –  $y_1$ ) (например, единица в сайте “...01...”

даст множитель  $K_C \cdot x_i$ ) – блоки 14-17 на рисунке 1. Вычисление химического сдвига будет зависеть от соседних битов, т.е. от того, какую добавку вносят две соседние молекулы  $\Delta\delta_C$  – от гетеростыка или  $\Delta\delta_S$  – от гомостыка. Последовательным суммированием этих добавок находится общий химический сдвиг текущего комплекса и его концентрация – блоки 14-17 на рисунке 2.

Таким образом могут быть определены концентрация и химический сдвиг произвольного комплекса. Перебор в цикле всех чисел от 0 до  $2^L - 1$  означает генерирование всех возможных комплексов длиной  $L$  (цикл по переменной *Complex* на рисунках). И, наконец, внешний цикл от мономерной формы 1 до заданной максимальной длины комплекса  $N$  полностью завершит процедуру генерирования (цикл по переменной  $l$  на рисунках). Описанный алгоритм генерации положен в основу стохастической модели гетероассоциации

В результате последовательного суммирования концентраций каждого комплекса внутри циклов (блоки 22,23 на рисунке 1) получается суммарная концентрация, аналогичная выражению для закона сохранения массы в аналитических моделях [2,3]. Последовательное суммирование

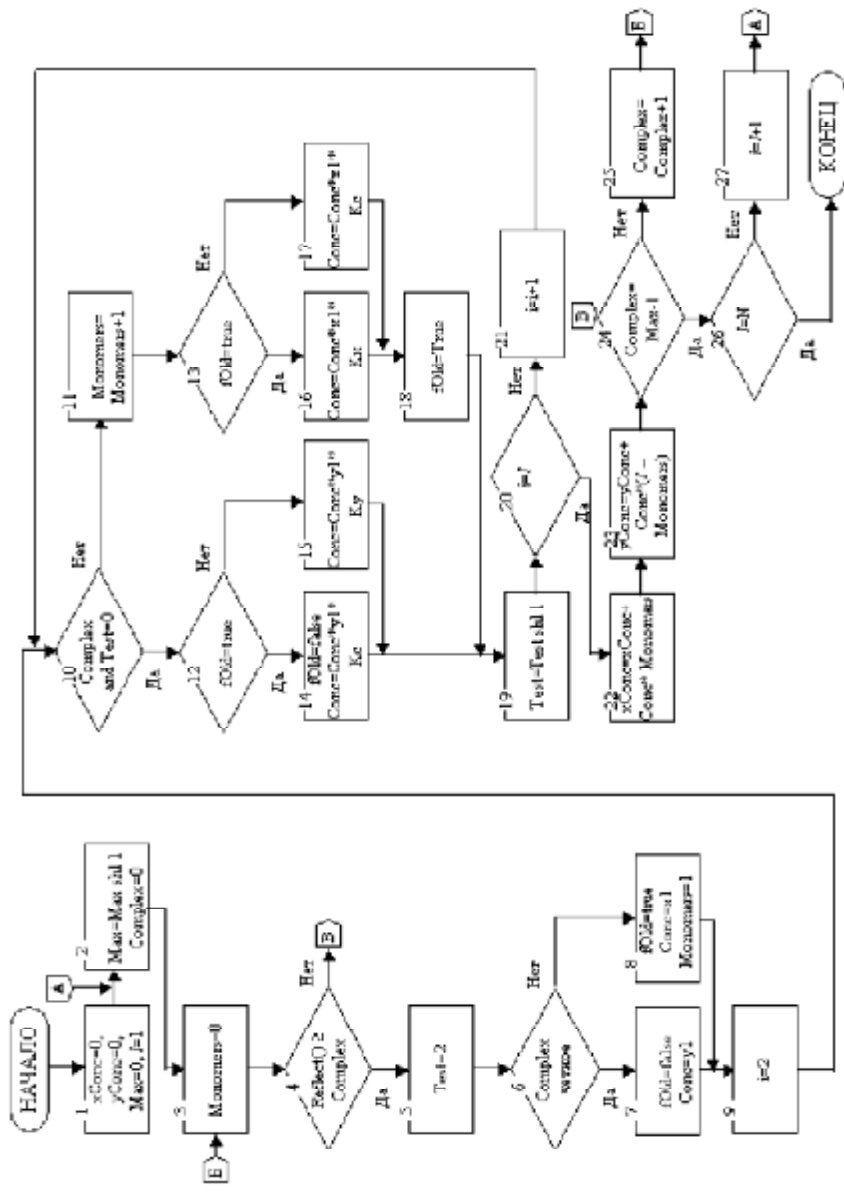


Рисунок 1 - Алгоритм процедуры вычисления суммарной концентрации

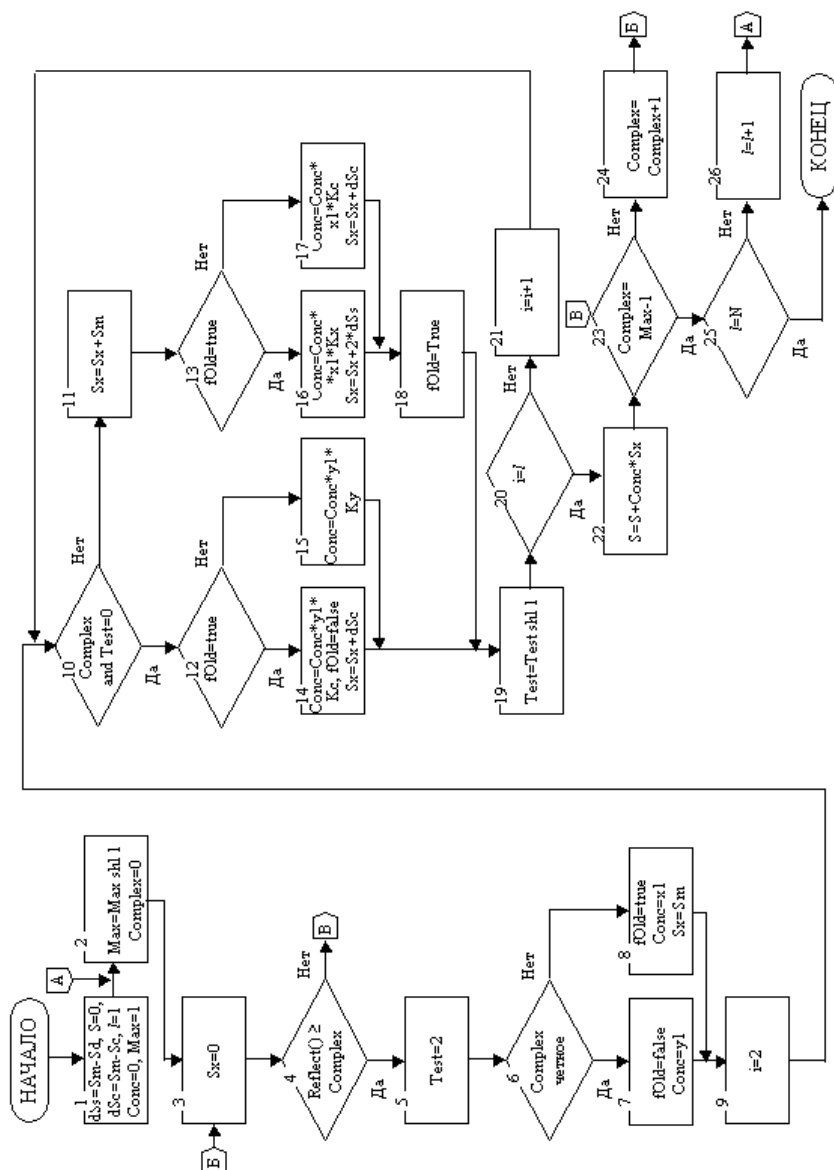


Рисунок 2 - Алгоритм процедуры вычисления суммарного химического сдвига

произведений концентрации сгенерированного комплекса  $C$  на его химический сдвиг (блок 22 на рисунке 2) даст суммарный химический

сдвиг относительно единиц (вещество  $X$ ). Отсюда вполне понятным становится физический смысл алгоритма стохастической модели: если в аналитических моделях исходные выражения раскрывались аналитически, то в стохастической модели та же самая операция производится алгоритмически в виде набора программных циклов, основу которых составляют закон действующих масс, закон сохранения массы и аддитивность химического сдвига.

Принципиально важным для обеспечения корректности стохастической модели является учет тождественности зеркально отраженных комплексов. Точно так же, как и суммирование в аналитических моделях, в стохастической модели перебор всех возможных комплексов в цикле всегда дает пару зеркально отображенных друг относительно друга. Следовательно, если текущий комплекс  $C$  и перевернутый ему  $C^{-1}$  находятся в отношении  $C \leq C^{-1}$ , то это означает, что  $C$  встречается впервые и поэтому должен быть учтен в цикле. В противном случае комплекс  $C$  игнорируется. Это условие реализовано в общем алгоритме на рисунках 1,2 в блоке 4, и в сущности выполняет роль коэффициента  $1/2$  в базовой модели [2] и скорректированной суммы в обобщенной модели [3].

Для сравнения результатов расчета аналитическим и алгоритмическим методом для тестовой системы – гетероассоциация акридинового красителя профлавина (PF) с фенантридиновым красителем бромистым этидием (EB) [3] – был проведен вычислительный эксперимент по стохастической модели при максимальной длине комплекса  $N = 10$ . В таблицу сведены результаты расчета по базовой, обобщенной и стохастической моделям.

Таблица 1 – Параметры гетероассоциации PF( $X$ ,  $K_X = 700 \pm 70$  л/моль) и EB( $Y$ ,  $K_Y = 305 \pm 14$  л/моль) в 0.1 моль/л фосфатном буфере рD 7.1,  $T = 298$  К, рассчитанные по различным аналитическим (базовая и обобщенная) и стохастической ( $N = 10$ ) моделям

| Модель                   | $\delta_C$ , м.д. |      |      |      | $K_C$ , л/моль |
|--------------------------|-------------------|------|------|------|----------------|
|                          | H9                | H1/8 | H2/7 | H4/5 |                |
| Базовая <sup>*)</sup>    | 7.64              | 7.08 | 6.56 | 6.03 | 690±60         |
| Обобщенная <sup>*)</sup> | 7.75              | 7.15 | 6.59 | 6.15 | 520±50         |
| Стохастическая           | 7.80              | 7.19 | 6.60 | 6.21 | 500±50         |

<sup>\*)</sup> Данные взяты из работы [3]

Из таблицы следует, что различия параметров гетероассоциации, полученные по обобщенной и стохастической моделям сравнительно невелики. Можно ожидать большего расхождения результатов при увеличении константы  $K_C$  или экранирования  $\Delta\delta_C$  и, наоборот, тенденции к

адению результатов полученных по различным моделям, при кении вклада гетерокомплексов в суммарное динамическое равесие. При этом в рамках модельных ограничений стохастическая модель может рассматриваться в качестве основной для оценки параметров ассоциации ароматических молекул в водном растворе.

Рассчитанные параметры гетероассоциации PF-EB (таблица) соответствуют предельному значению условий (2):  $K_C \approx K_X$ , следовательно можно предположить, что максимальная погрешность базовой модели при соблюдении условий (2) не превышает границы 30% [3].

Используя тестовую систему PF-EB, была также проведена верификация алгоритма стохастической модели. При этом в алгоритм было добавлено условие исключения комплексов с числом гетеростыков больше 2. В результате при  $N > 6$  различие расчетных параметров полученных по аналитической и алгоритмической моделям становилось исчезающе малым.

Анализ алгоритма стохастической модели позволяет сделать вывод, что степени свободы алгоритмического описания гетероассоциации молекул не ограничиваются только расширением схемы реакций (1), что является следствием программного подхода к рассмотрению каждого типа сгенерированного комплекса. В заключение можно отметить некоторые потенциальные возможности алгоритма стохастической модели для моделирования процессов ассоциации ароматических молекул в растворе:

- учет кооперативности агрегации каждого из взаимодействующих веществ при анализе гетероассоциации молекул;
- моделирование смешанной ассоциации трех и более ароматических веществ;
- учет дальних взаимодействий при расчете экранирования протонов молекул в агрегате или комплексе

#### ***Библиографический список***

1. 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. — P. 354–366.
2.  $^1\text{H}$  NMR investigation of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution: factors involved in the stabilization of complexes of daunomycin and acridine drugs / D.B. Davies, D.A. Veselkov, V.V. Kodintsev, M.P. Evstigneev, A.N. Veselkov // Molecular Phys. — 2000. — V. 98. — P. 1961–1971.
3. A generalized NMR-derived statistical-thermodynamical model 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. — P. 2252–2266.
4. Martin R.B. Comparisons of indefinite self-association models / R.B. Martin // Chem. Rev. — 1996. — V. 96. — P. 3043–3064.

***Поступила в редакцию 08.04.2002 г.***