

УДК 577.113:541.49

Д.А. Бешнова¹; Л.В. Глобина¹;

С.Г. Осетров², доцент, канд. физ.-мат. наук,

А.О. Розвадовская¹, доцент, канд. физ.-мат. наук

¹ Кафедра физики, Севастопольский национальный технический университет,

Стрелецкая балка, г. Севастополь, 99053, Украина;

E-mail: lantushenko@mail.ru

² Кафедра физики, Высший военно-морской институт им. П.С.Нахимова

АНАЛИЗ САМОАССОЦИИ АРОМАТИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЬНЫХ ПОДХОДОВ

Получены выражения для расчета протонного химического сдвига по некооперативным и кооперативным моделям с гиперболическим затуханием и дробным возрастанием равновесной константы самоассоциации ароматических молекул. Рассмотренные модели могут быть использованы для более подробного анализа агрегации ароматических молекул в водном растворе методом ЯМР.

Введение. В настоящее время считается, что ароматические молекулы, имеющие в своем составе плоский гетероциклический хромофор, при домицелльных концентрациях способны взаимодействовать в растворе путем образования вертикальных стопок, стабилизированных стэкинг-взаимодействиями ароматических хромофоров [1,2]. Данный процесс, известный под названием самоассоциации, представляет интерес как с физико-химической, так и биофизической точки зрения, и является необходимым элементом проведения корректного количественного анализа связывания биологически активных ароматических веществ с биополимерами – белками и ДНК – в диапазоне повышенных концентраций молекул [3], например, при изучении связывания лигандов методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Метод ядерного магнитного резонанса является одним из наиболее широко распространенных и эффективных экспериментальных методов, позволяющим получить информацию как о равновесных параметрах реакций самоассоциации, так и о структурах комплексов, образуемых в растворе.

Анализ самоассоциации ароматических молекул методом ЯМР в большинстве случаев производится с использованием бесконечномерных моделей кооперативной и некооперативной агрегации в растворе [1,2]. Эти два класса моделей отличаются характером изменения равновесной константы реакции ассоциации в зависимости от длины агрегата: в некооперативной модели (НК) константы равновесия K_i для реакций последовательной агрегации



предполагаются одинаковыми при всех значениях i : $K_1 = K_2 = \dots = K_i = K$; в бесконечномерной кооперативной модели (КП) равновесные константы реакций (1) полагаются равными для всех $i \geq 2$ ($K_2 = K_3 = \dots = K_i = K$) и $K_1 = \sigma K$, где σ – параметр кооперативности. При этом агрегация с $\sigma < 1$ считается кооперативной, $\sigma \approx 1$ некооперативной, $\sigma > 1$ антикооперативной.

Ранее было показано, что НК модель может приводить к завышенному вкладу агрегатов высокого порядка [4,5], в связи с чем был предложен модифицированный вид кооперативной и некооперативной моделей с аналитически заданной формой зависимости константы от длины агрегата. Наиболее применимыми из них оказались модели с гиперболическим затуханием ($K_i = K/i$) (ЗТ) и дробным возрастанием ($K_i = K(i-1)/i$) (ВЗ) [1,5,6]. Тем не менее, для ЯМР эти модели ранее не использовались.

В настоящей работе получены аналитические выражения для расчета наблюдаемого в ЯМР эксперименте протонного химического сдвига по кооперативной и некооперативной моделям с затуханием и возрастанием константы самоассоциации в зависимости от длины агрегата. По моделям ЗТ и ВЗ проведены расчеты параметров реакций самоассоциации различных типов биологически активных ароматических молекул. Проведен анализ параметров агрегации молекул в зависимости от примененного модельного подхода.

Результаты и обсуждение.

Обобщенная запись уравнений последовательной самоассоциации. В основе моделирования процессов взаимодействия ароматических молекул в водном растворе лежит предположение о выполнении законов действующих масс и закона сохранения массы [1,2]. На основании закона сохранения массы в общем случае записывается общая концентрация x_0 молекул вещества X в растворе с учетом формально бесконечномерной ассоциации (количество молекул в текущем агрегате $i \rightarrow \infty$)

$$x_0 = \sum_{i=1}^{\infty} i x_i, \quad (2)$$

где x_i – концентрация агрегатов, состоящих из i молекул, определяемой по закону действующих масс согласно реакции ассоциации (1):

$$x_2 = K_2 x_1^2, \quad x_3 = K_3 x_1 x_2 = K_2 K_3 x_1^3, \quad \dots, \quad x_i = K_i x_1 x_{i-1} = x_1^i \prod_{k=2}^i K_k, \quad (3)$$

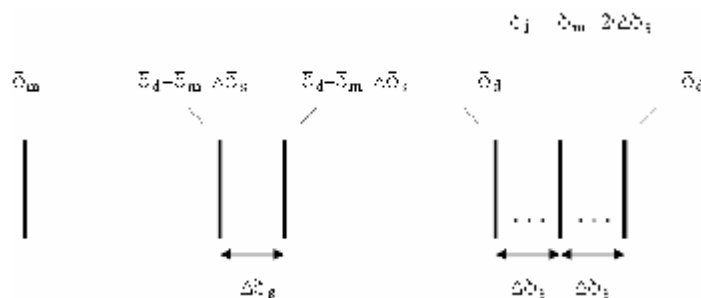


Рисунок 1 – Экранирование протонов молекул в агрегате

Выражения (2) и (3) позволяют полностью охарактеризовать динамическое равновесие молекул в растворе в рамках ограничений, накладываемых схемой реакций самоассоциации (1). Привлечение некоторого экспериментального метода для анализа процессов агрегации требует установления взаимосвязи измеряемого в данном эксперименте параметра с равновесным распределением агрегатов (3). В методе ЯМР как правило вводится два основных предположения вклад в экранирование протонов данной молекулы находящейся внутри агрегата, со стороны двух соседних молекул слева и справа одинаков (рисунок 1) [1,2]:

$$\delta_i - \delta_m = 2(\delta_d - \delta_m), \quad (4)$$

где δ_m , δ_d , δ_i – химические сдвиги протонов молекулы в мономерной форме, в димере или на краю агрегата и внутри агрегата соответственно. Второе предположение основано на допущении существования быстрого обмена между различными молекулярными ассоциатами в масштабе времени ЯМР:

$$\delta = \sum_{(k)} f_k \delta_k, \quad (5)$$

где k – тип ассоциата, f_k – мольная доля данного типа комплекса в растворе. Окончательно уравнения (2) и (5) составляют основу анализа процессов самоассоциации ароматических молекул методом ЯМР. Под экспериментально измеренную концентрационную зависимость протонного химического сдвига $\delta(x_0)$ по методу наименьших квадратов подгоняется модельная кривая (5) с тремя подгоночными параметрами (K , δ_m , δ_d) в моделях НК и четырьмя параметрами (K , δ_m , δ_d , σ) в моделях КП [2].

С учетом (4) выражение (5) может быть переписано в форме

$$\delta = \delta_m \frac{x_1}{x_0} + \delta_d \frac{1}{x_0} \sum_{i=2}^{\infty} 2x_i + \delta_i \frac{1}{x_0} \sum_{i=2}^{\infty} (i-2)x_i,$$

откуда следует упрощенная запись (5) в виде

$$\delta = \delta_m + 2(\delta_d - \delta_m) \left(1 - \frac{x_1}{x_0} - \frac{1}{x_0} \sum_{i=2}^{\infty} x_i \right). \quad (6)$$

Уравнения некооперативной 3Т и ВЗ самоассоциации. В модели 3Т предполагается гиперболический характер затухания равновесной константы самоассоциации K_i в зависимости от размеров агрегата, $K_i = K/i$ [1]. С учетом закона действующих масс (3)

$$x_2 = K_2 x_1^2 = \frac{K}{2} x_1^2, \quad x_3 = K_2 K_3 x_1^3 = \frac{K^2}{2 \times 3} x_1^3, \quad x_i = x_1^i \prod_{k=2}^i K_k = \frac{K^{i-1}}{i!} x_1^i,$$

выражение закона сохранения массы (2) в модели 3Т переписывается в виде

$$x_0 = x_1 + \frac{K}{2} \times 2x_1^2 + \frac{K^2}{2 \times 3} 3x_1^3 + K = x_1 \left(1 + Kx_1 + \frac{(Kx_1)^2}{2!} + K \right) = x_1 e^{Kx_1}. \quad (7)$$

Преобразования для обобщенного химического сдвига (6) выполняются аналогично:

$$\begin{aligned} \delta &= \delta_m + 2(\delta_d - \delta_m) \left[1 - \frac{x_1}{x_0} - \frac{1}{x_0} \left(\frac{K}{2} x_1^2 + \frac{K^2}{2} \frac{1}{3} x_1^3 + K \right) \right] = \\ &= \delta_m + 2(\delta_d - \delta_m) \left[1 - \frac{x_1}{x_0} - \frac{1}{Kx_0} \left(\frac{(Kx_1)^2}{2!} + \frac{(Kx_1)^3}{3!} + L \right) \right] \end{aligned}$$

Окончательно

$$\delta = \delta_m + 2(\delta_d - \delta_m) \left(1 + \frac{1}{Kx_0} - \frac{e^{Kx_1}}{Kx_0} \right). \quad (8)$$

Уравнения (7), (8) составляют основу исследования самоассоциации методом ЯМР с использованием модели 3Т.

В некооперативной модели с возрастанием (ВЗ), зависимость константы от длины агрегата задается выражением $K_i = K(i-1)/i$. Закон действующих масс и сохранения массы записываются в виде

$$x_2 = K_2 x_1^2 = \frac{K}{2} x_1^2, \quad x_3 = K_2 K_3 x_1^3 = \frac{K}{2} \frac{2}{3} K x_1^3 \quad \mathbf{K} \quad x_i = x_1^i \prod_{k=2}^i K_k = K^{i-1} \frac{x_1^i}{i},$$

$$x_0 = x_1 + \frac{K}{2} \times 2 x_1^2 + \frac{K^2}{2} \frac{2}{3} x_1^3 + \mathbf{K} = x_1 + K x_1^2 + K^2 x_1^3 + K^3 x_1^4 + \mathbf{L} = x_1 \left(1 + \frac{K x_1}{1 - K x_1} \right).$$

Окончательно

$$x_0 = \frac{x_1}{1 - K x_1}. \quad (9)$$

Для химического сдвига из (6) получаем

$$\begin{aligned} \delta &= \delta_m + 2(\delta_d - \delta_m) \left[1 - \frac{x_1}{x_0} - \frac{1}{x_0} \left(\frac{K}{2} \times x_1^2 + \frac{K^2}{2} \frac{2}{3} x_1^3 + \frac{K^3}{2} \frac{2}{3} \frac{2}{4} x_1^4 + \mathbf{K} \right) \right] = \\ &= \delta_m + 2(\delta_d - \delta_m) \left[1 - \frac{x_1}{x_0} - \frac{1}{K x_0} \left(\frac{(K x_1)^2}{2} + \frac{(K x_1)^3}{3} + \frac{(K x_1)^4}{4} + \mathbf{L} \right) \right] = \\ &= \delta_m + 2(\delta_d - \delta_m) \left[1 - \frac{x_1}{x_0} - \frac{1}{K x_0} (-\ln(1 - K x_1) - K x_1) \right] \end{aligned}$$

Окончательно

$$\delta = \delta_m + 2(\delta_d - \delta_m) \left[1 + \frac{\ln(1 - K x_1)}{K x_0} \right]. \quad (10)$$

Уравнения (9), (10) составляют основу исследования самоассоциации методом ЯМР с использованием модели ВЗ.

Уравнения кооперативной самоассоциации с затуханием (КЗТ) и возрастанием (КВЗ). В модели КЗТ и КВЗ реакция димеризации протекает с константой $K_2 = \sigma K$ и далее затухание происходит по гиперболическому закону (КЗТ) или дробному возрастанию (КВЗ). Выражения для закона сохранения массы и наблюдаемого химического сдвига получаются точно так же, как и в рассмотренных выше преобразованиях.

Модель КЗТ

$$\begin{aligned} x_0 &= x_1 + 2\sigma x_1 (e^{K x_1} - 1) \\ \delta &= \delta_m + 2(\delta_d - \delta_m) \left[1 - \frac{x_1}{x_0} - \frac{2\sigma}{K x_0} (e^{K x_1} - 1 - K x_1) \right]. \end{aligned} \quad (11)$$

Модель КВЗ

$$\begin{aligned} x_0 &= x_1 + \frac{2\sigma K x_1^2}{1 - K x_1} \\ \delta &= \delta_m + 2(\delta_d - \delta_m) \left[1 - \frac{x_1}{x_0} + \frac{2\sigma}{K x_0} (\ln(1 - K x_1) + K x_1) \right]. \end{aligned} \quad (12)$$

Анализ расчетных параметров самоассоциации.

На основании полученных выражений для расчета химического сдвига по кооперативной и некооперативной моделям ЗТ и ВЗ (7)-(12) в настоящей работе были проведены расчеты параметров самоассоциации различных ароматических соединений акридиновых красителей акридинового оранжевого (АО) и профлавина (PF); фенантридиновых красителей бромистого этидия (ЕВ) и йодистого пропидия (PI); антибиотиков дауномицина (DAU) и митоксантрона (NOV); витаминов флавина-моноклеотида (FMN) и никотинамида (NMD); и кофеина (CAF). В качестве критерия оценки эффективности модели для описания экспериментальных данных использовалась величина невязки – сумма квадратов отклонений расчетного и экспериментального химических сдвигов протонов исследованных молекул. Дополнительно для выполнения сравнительного анализа были проведены расчеты невязки по базовой модели НК [2]. Получены следующие соотношения между некооперативными моделями (вещества расположены по возрастанию фактора кооперативности σ из модели КП) (таблица 1).

Анализ соотношения невязок позволяет заключить, что модель ЗТ хуже описывает экспериментальные данные для сугубо кооперативных систем (PF, АО), а модель ВЗ наименее применима для анализа некооперативных и антикооперативных систем (PI, NOV, NMD, CAF, DAU, FMN). Полученный результат является вполне ожидаемым, следовательно модели ВЗ и ЗТ в принципе могут быть использованы для оценки характера кооперативности самоассоциации исследуемого ароматического соединения наравне с кооперативной моделью. Важно отметить, что недостатком модели КП является наличие четырех подгоночных параметров в сравнении с тремя параметрами в некооперативных моделях НК, ЗТ и ВЗ, что накладывает большие требования к качеству исходных экспериментальных данных и в некоторых случаях создает сложности нахождения глобального минимума функции невязки. Вместе с тем базовая модель НК в

подавляющем большинстве случаев дает лучшую невязку, чем модели ЗТ и ВЗ (см. таблицу 1). Таким образом, расчет параметров некооперативнойсамоассоциации рекомендуетсяпроводить по модели НК.

Таблица 1 – Соотношение невязок для некооперативных моделей

Вещество	Параметры кооперативности	Соотношения невязок
PF	$\sigma = 0.42$ [2]	НК < ЗТ $\geq$ ВЗ
AO	$\sigma = 0.45$ [2]	НК < ЗТ $\approx$ ВЗ
EB	$\sigma = 0.89$ [2]	НК $\leq$ ЗТ $\approx$ ВЗ
PI	$\sigma = 0.98$ [7]	НК $\leq$ ЗТ < ВЗ
NOV	$\sigma = 0.98$ [8]	НК < ЗТ > ВЗ
NMD	$\sigma = 0.99$ [9]	НК $\approx$ ЗТ < ВЗ
CAF	$\sigma = 1.08$ [7]	НК < ЗТ < ВЗ
DAU	$\sigma = 1.34$ [7]	НК $\approx$ ЗТ < ВЗ
FMN	$\sigma = 1.90$ [9]	НК > ЗТ < ВЗ

Анализ расчетных значений предельного химического сдвига (δ_m) практически не зависит от типа используемой модели, а индуцированный химический сдвиг (δ_d) зависит от используемой модели. В таблице 2 представлены значения среднего экранирования ($\delta_m - \delta_d$) протонов исследованных молекул и соответствующий разброс для различных моделей.

Таблица 2 – Среднее экранирование протонов молекул в различных моделях

	НК	КП	ЗТ	ВЗ
PF	0.68 $\pm$ 0.13	1.12 $\pm$ 0.27	1.12 $\pm$ 0.22	0.95 $\pm$ 0.18
AO	0.57 $\pm$ 0.06	1.03 $\pm$ 0.15	0.89 $\pm$ 0.12	0.47 $\pm$ 0.06
EB	0.43 $\pm$ 0.14	0.86 $\pm$ 0.30	0.60 $\pm$ 0.20	0.36 $\pm$ 0.12
PI	0.45 $\pm$ 0.15	0.83 $\pm$ 0.31	0.62 $\pm$ 0.21	0.55 $\pm$ 0.20
NOV	0.39 $\pm$ 0.08	0.78 $\pm$ 0.16	0.58 $\pm$ 0.11	0.32 $\pm$ 0.06
NMD	0.34 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.15	0.44 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.03
CAF	0.16 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.07	0.21 $\pm$ 0.07	0.12 $\pm$ 0.04
DAU	0.24 $\pm$ 0.09	0.53 $\pm$ 0.20	0.37 $\pm$ 0.14	0.21 $\pm$ 0.08
FMN	0.15 $\pm$ 0.08	0.41 $\pm$ 0.13	0.20 $\pm$ 0.11	0.12 $\pm$ 0.06

Из таблицы 2 следует, что среднее экранирование протонов при переходе от одной модели к другой в большинстве случаев претерпевает систематические изменения, превышающие средний разброс по протонам. Полученный результат важен при построении пространственной структуры димера ароматических молекул с использованием индуцированного химического сдвига [2]. Если используемая модель приводит к систематическому экранированию или дезэкранированию протонов молекул в агрегате, то фиксирование расстояния между хромофорами на стандартном уровне 0.34 нм фактически нивелирует различие моделей при построении структуры с использованием указанного метода. Таким образом, некооперативные модели ЗТ и ВЗ могут быть использованы для оценки характера кооперативности агрегации исследуемой молекулярной системы и построения пространственной структуры димера молекул в растворе.

Расчет по кооперативным моделям КЗТ и КВЗ проводился путем фиксации параметра σ , что уравнивает число подгоночных параметров в кооперативных и некооперативных моделях и тем самым дает возможность проводить сравнение невязки. Результаты расчета по моделям КЗТ и КВЗ могут быть объединены с результатами, представленными в таблице 1, в форме рисунка 2.

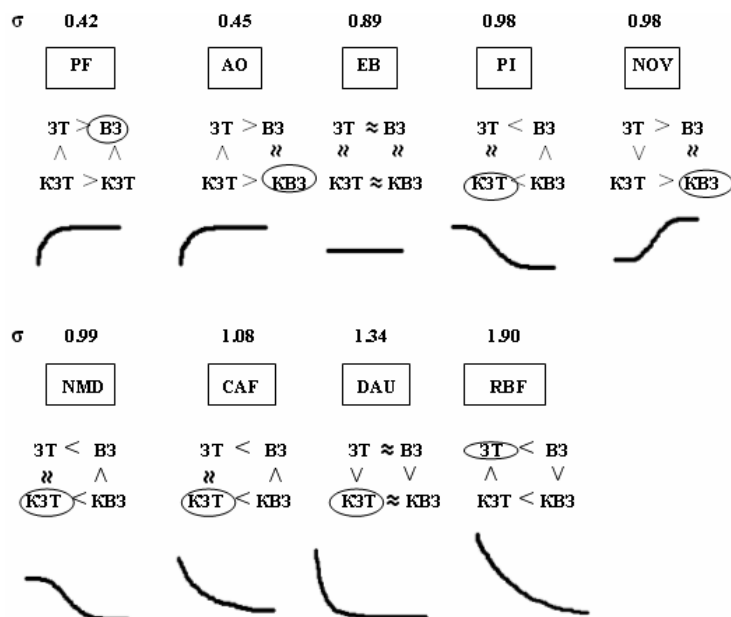


Рисунок 2 – Соотношение невязок по моделям 3Т, ВЗ, КЗТ, КВЗ и предположительный профиль изменения константы в зависимости от длины агрегата. Модель с наименьшей невязкой выделена кружком

Анализ представленных на рисунке 2 взаимных соотношений невязок позволяет выделить модель или модели с наименьшей невязкой и, следовательно, качественно указать наиболее вероятный профиль изменения равновесной константы ассоциации в зависимости от длины агрегата. Как и следовало ожидать, для кооперативных систем профиль константы возрастающий, а для антикооперативных и некооперативных – убывающий. Единственная молекулярная система, которая выпадает из этой закономерности – антибиотик митоксантрон, демонстрирующий явный кооперативный характер агрегации высокого порядка ($i > 3$), при некооперативной в целом агрегации ($\sigma \approx 1$). Следует отметить, что антибиотик NOV характеризуется наиболее высокой равновесной константой самоассоциации из всех исследованных в настоящей работе систем ($K = 28900 \pm 9300 \text{ M}^{-1}$, $T = 298\text{K}$ [8]), что связывают с интенсивными гидрофобными взаимодействиями и образованием межмолекулярной водородной связи при образовании димеров и i -меров антибиотика в растворе [8]. Водородная связь является тем уникальным свойством, которое отличает данную систему от других и, по-видимому, обуславливает кооперативность агрегации NOV при $i > 3$.

Необходимо подчеркнуть, что кооперативные модели КЗТ и КВЗ содержат информацию как о кооперативности реакции тримеризации (σ), так и дополнительно задают профиль изменения константы при $i > 3$. Таким образом, модели КЗТ и КВЗ более полно характеризуют агрегацию ароматических молекул, что особенно важно при работе в диапазоне высоких концентраций.

Библиографический список

1. Martin R.B. Comparisons of indefinite self-association models / R.B. Martin // Chem. Rev. — 1996. — V. 96. — № 8. — P. 3043–3064.
2. Davies D.B. ^1H NMR investigation of self-association of aromatic drug molecules in aqueous solution / D.B. Davies, L.N. Djimant, A.N. Veselkov // J. Chem. Soc. Faraday Trans. — 1996. — V. 92. — P. 383–390.
3. Chaires J.B. Self-association of daunomycin / J.B. Chaires, N. Dattagupta, D.M. Crothers // Biochemistry. — 1982. — V. 21. — P. 3927–3932.
4. Ts'o P.O.P. Fine structure of proteins and nucleic acids / P.O.P. Ts'o; Eds. C.D. Fasman, S.M. Timasheff — N.Y.: Mereel Dekker, 1970. — 49 p.
5. Garland F. Thermodynamic and kinetic model of sequential nucleoside base aggregation in aqueous solution / F. Garland, S. Christian // J. Phys. Chem. — 1975. — V. 79. — P. 1247–1252.
6. Beckerdite J.M. Analysis of various indefinite self-associations of the AK type / J.M. Beckerdite, C.C. Wan, E.T. Adams // Biophys. Chem. — 1980. — V. 12. — P. 199–214.
7. 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.
8. Структурный и термодинамический анализ самоассоциации антибиотика митоксантрона (новатрона) в водном растворе методом ^1H -ЯМР-спектроскопии / Д.А. Веселков, М.П. Евстигнеев, Л.Н. Дымант и др. // Хим. физика. — 2001. — Т. 20. — С. 27–32.

9. ^1H ЯМР анализ самоассоциации рибофлавин-мононуклеотида и его комплексообразования с никотинамидом в водном растворе / А.Н. Веселков, А.О. Лантушенко, А.С. Чубаров и др. // Физ. химия. — 2002. — Т. 76. — С. 1313–1320.

Поступила в редакцию 14.06.2005 г.