

УДК 577.32

В.П. Евстигнеев, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник**А.С. Бучельников, магистрант****Д.С. Лохова, магистрант***Севастопольский национальный технический университет**ул. Университетская 33, г. Севастополь, Украина, 99053**E-mail: vald_e@rambler.ru***ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕРЦЕПТОРНО-ПРОТЕКТОРНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ АРОМАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В КОМБИНАЦИИ ПРИ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ЛИГАНДА-ПЕРЕХВАТЧИКА**

В работе представлены результаты теоретического исследования интерцепторно-протекторного действия в трехкомпонентных смесях ароматических БАС и ДНК. Для факторов R_D и A_D впервые получены соотношения в аналитическом виде при низких концентрациях лиганда-перехватчика Y . Проведена верификация полученных выражений. Дана оценка граничных концентраций молекул-интерцепторов, начиная с которых можно ожидать биологический эффект взаимовлияния лигандов X , Y при совместном связывании с ДНК.

Ключевые слова: *интерцепторно-протекторное действие, комплексообразование с ДНК, биологический эффект, гетероассоциация.*

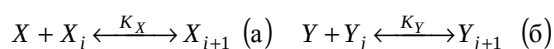
Введение

Межмолекулярные взаимодействия биологически важных молекул являются ключевым моментом протекания большинства клеточных процессов и составляют один из важнейших объектов исследования молекулярной биофизики. Ароматические биологически активные соединения (БАС) образуют широко используемую в медицине группу лекарственных препаратов, механизм действия которых в большинстве случаев объясняется на уровне нековалентного взаимодействия с биополимерами в клетке. Другая особенность ароматических БАС проявляется при совместном использовании различных лекарственных препаратов на их основе и приводит к выраженным синергетическим медико-биологическим эффектам: детоксификации или интоксификации клеточной системы, не равных сумме эффектов при использовании препаратов по отдельности. Предыдущие исследования подтвердили идею о том, что именно межмолекулярные взаимодействия различных БАС между собой (гетероассоциация) и биорецептором способны модулировать биологическую активность. Это позволило сформулировать представление о существовании двух фундаментальных механизмов регуляции активности ароматических БАС: интерцепторного и протекторного.

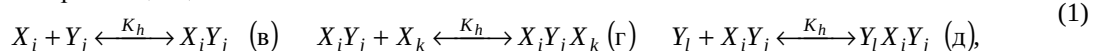
В основе интерцепторного механизма лежит гетероассоциация X - Y (или «перехватывание» лигандом Y базового препарата X , согласно англоязычной литературе [1, 2]), приводящее к снижению концентрации свободных лигандов X , способных связываться с биорецептором и оказывать биологическое действие. В основе протекторного механизма лежит свойство интерцептора Y неспецифично связываться с биорецептором и блокировать сайты, доступные для посадки базового лиганда X , что также неизбежно приводит к изменению биологической активности X .

Физическая модель совместного связывания лигандов X и Y с ДНК [3, 4] базируется на представлении клеточной ДНК в виде совокупности коротких олигомерных участков (тетрануклеотидов), в свою очередь, являющихся самостоятельными сайтами конкуренции X и Y . Недостатком такого подхода является фактическое исключение из рассмотрения кооперативных эффектов связывания лигандов с ДНК. Однако достоинством является резкое упрощение задачи анализа трехкомпонентного равновесия ввиду исключения статистических эффектов распределения двух разных типов связанных лигандов на полимерной матрице [3-7]. В работах [3, 5, 6] была представлена эквивалентная физической модели схема реакций, в общем случае включающей в себя бесконечномерную само- и гетероассоциацию в соответствии с обобщенной моделью двухкомпонентной гетероассоциации:

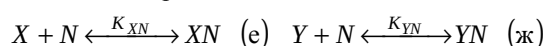
Самоассоциация



Гетероассоциация



Комплексообразование с ДНК



где K_X , K_Y – равновесные константы самоассоциации компонент X и Y , соответственно; K_h – равновесная константа гетероассоциации X - Y ; K_{XN} , K_{YN} – константы комплексообразования молекул X и Y с дуплексной формой тетрамера ДНК (N), соответственно. Математическое представление закона сохранения масс в соответствии с законом действующих масс для схемы (1) выражается следующей системой уравнений [3]:

$$\begin{cases} \frac{X}{(1-K_X X)^2} \left(1 + \frac{K_h Y}{1-K_Y Y} + \frac{K_h^2 Y^2}{2(1-K_Y Y)^2} + \frac{K_h^2 XY}{(1-K_X X)(1-K_Y Y)} \right) + K_{XN} XN = X_0 \\ \frac{Y}{(1-K_Y Y)^2} \left(1 + \frac{K_h X}{1-K_X X} + \frac{K_h^2 X^2}{2(1-K_X X)^2} + \frac{K_h^2 XY}{(1-K_X X)(1-K_Y Y)} \right) + K_{YN} YN = Y_0 \\ N(1 + K_{XN} X + K_{YN} Y) = N_0 \end{cases} \quad (2)$$

где X , Y , N – концентрация мономерных (несвязанных) форм молекул веществ X , Y и дуплекса тетрамера, соответственно; X_0 , Y_0 – исходные концентрации веществ X и Y , соответственно; N_0 – исходная концентрация тетрамерных участков, моделирующих совокупность свободных от гистонов участков ядерной ДНК.

Для количественной оценки влияния процессов гетероассоциации (интерцепторное действие Y) и комплексообразования с ДНК (протекторное действие Y) на способность исследуемых ароматических соединений X образовывать комплексы с ДНК в присутствии Y , теми же авторами было предложено произвести расчет так называемого фактора R_D :

$$R_D = \frac{F_X^0 - F_X^C}{F_X^0 - F_X^h}, \quad (3)$$

где F_X обозначают мольные доли комплексов X -ДНК в случаях, когда в системе действует только протекторный механизм (F_X^C); только интерцепторный (F_X^h) и в случае, когда в трехкомпонентной системе оба процесса неактивны (F_X^0). Область $R_D > 1$ соответствует преобладанию процесса комплексообразования Y -ДНК над процессом гетероассоциации X - Y (протекторное действие Y), а в области $R_D < 1$ главный вклад в уменьшение доли комплексов лиганд-ДНК вносит процесс гетероассоциации (интерцепторное действие Y).

Для оценки доли вытесненного из ДНК лиганда X при добавлении интерцептора Y был предложен критерий A_D [3, 5, 6]:

$$A_D = \frac{F_X^0 - F_X^{hC}}{F_X^0}, \quad (4)$$

где F_X^{hC} – мольная доля комплексов X -ДНК при одновременном действии процессов гетероассоциации и комплексообразования Y с ДНК. Расчет мольных долей F_X^C , F_X^h , F_X^0 осуществляется путем решения системы (2), в которой предварительно обнулены константы, соответствующие «отключенным» механизмам ($K_{YN} = 0$; $K_h = 0$; $K_{XN} = 0$ и $K_h = 0$).

Численный анализ, проведенный в работах [3, 5, 6] для множества различных комбинаций ароматических БАС, позволил получить эмпирические выражения для факторов R_D и A_D :

$$R_D \approx \frac{C}{K_h} \quad (a), \quad A_D \equiv \frac{K_h^2}{K_{XN}} \quad (b), \quad (5)$$

где C – некоторая константа, зависящая от типа молекулы Y . При этом формула (5б) дает не абсолютное значение A_D , а лишь числовой ряд, находящийся в полном соответствии с последовательностью кривых $A_D(Y_0)$, рассчитанных для различных веществ X при одном и том же интерцепторе Y . Данный результат был получен для т.н. «квазифизиологических условий» ($X_0 = 0.01$ mM, Y_0 – var, $N_0 = 0.01$ mM), при которых факторы являются биологически адекватными (т.е. соответствует опубликованным *in vitro* экспериментам).

Несмотря на простоту выражений (5) результаты исследований обладают исключительно эмпирическим характером. В свою очередь, полноценный анализ протекторно-интерцепторного действия как функции констант комплексообразования и концентраций компонент возможен только в результате аналитического рассмотрения решения системы уравнений (2). К сожалению, решение системы (2) в общем случае относительно факторов R_D и A_D , по-видимому, невозможно в аналитическом виде без введения в систему определенных ограничений. В работе [7] были получены строгие аналитические выражения для факторов R_D и A_D в условиях, близких к «квазифизиологическим». В частности, была подтверждена эмпирически полученная зависимость (5 а), и показано, что коэффициент C обладает конкретным физическим смыслом, а именно, является равновесной константой комплексообразования перехватчика Y с ДНК (K_{YN}). Однако совокупность ограничений, наложенных в [7] на систему (2), являются достаточно жесткими и значительно сужают условия применимости уравнений. Предварительный анализ показал, что аналитическое решение системы (2) относительно факторов R_D и A_D системы Y – X –ДНК также оказывается возможным при единственном условии достаточно низкого диапазона концентрации лиганда-интерцептора ($Y_0 \approx 0$). Целью настоящей работы является исследование поведения факторов R_D и A_D при единственном требовании низкого диапазона концентрации перехватчика.

Результаты и обсуждение

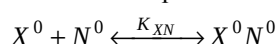
Базовое состояние

Биологическое действие исследуемого лиганда X осуществляется за счет комплексообразования со свободными участками ДНК. Максимальный биологический эффект от ароматического БАС (X) достигается при отсутствии в системе X –ДНК каких-либо лигандов-интерцепторов. Любое добавление примеси в виде ароматического лиганда Y вызывает снижение концентрации мономерных форм вещества X и числа свободных тетрамерных сайтов (N) вследствие гетероассоциации Y с X и комплексообразования Y с N , соответственно. Это приводит к тому, что процесс комплексообразования X с ДНК будет менее выраженным, что, очевидно, повлечет за собой отклонение «полезного» биологического эффекта от своего максимального уровня. Введем понятие «базового» состояния трехкомпонентной системы Y – X –ДНК, при котором ароматический лиганд X проявляет свою максимальную биологическую активность. Очевидно, «базовое» состояние соответствует параметрам системы X –ДНК. Путем редукции схемы (2) можно получить модель «базового» состояния системы Y – X –ДНК, в общем случае, с учетом бесконечномерной самоассоциации:

Самоассоциация



Комплексообразование с ДНК



где X^0 , N^0 – концентрация мономерных форм молекул веществ X и ДНК, соответственно, при условии отсутствия в системе примеси Y . Соответствующее выражение закона сохранения массы для «базового» состояния системы примет вид:

$$\begin{cases} \frac{X^0}{(1 - K_X X^0)^2} + K_{XN} X^0 N^0 = X_0 \\ N^0 (1 + K_{XN} X^0) = N_0 \end{cases} \quad (7)$$

Решение системы (7) сводится, вообще говоря, к решению кубического уравнения (вследствие громоздкости выражений аналитическое решение системы (7) не приведено). Как было показано выше, отклонение трехкомпонентной системы Y – X –ДНК от «базового» состояния может служить основной мерой количественной оценки соотношения интерцепторного/протекторного действия, поэтому все последующие выводы будут сделаны в терминах параметров «базового» состояния, которые могут быть найдены из решения системы (7) относительно мономерных концентраций лиганда X^0 и ДНК (N^0).

Преобразование систем уравнений для закона сохранения массы

Введем следующую систему обозначений:

$$S_i^j = K_{XN} i^{(j)}, \quad \alpha = \frac{K_h}{K_{XN}}, \quad \beta = \frac{K_{YN}}{K_{XN}}, \quad \gamma = \frac{K_Y}{K_{XN}}, \quad \delta = \frac{K_X}{K_{XN}}, \quad (8)$$

где K_i — соответствующие константы самоассоциации лигандов X , Y ; индексы $j = \{0, C, h, hC\}$ и $i = \{X, Y, N, X_0, Y_0, N_0\}$. Индексы $\{0, C, h, hC\}$ введены для того, чтобы отличить между собой наборы мономерных концентраций, соответствующих разным вариантам сочетаний действующих и недействующих механизмов. В рамках принятых обозначений перепишем систему уравнений (2):

$$\begin{cases} S_{X_0}^{hC} = \left[1 + \frac{\alpha S_Y^{hC}}{1 - \gamma S_Y^{hC}} + \frac{\alpha^2 (S_Y^{hC})^2}{2(1 - \gamma S_Y^{hC})^2} + \frac{\alpha^2 S_X^{hC} S_Y^{hC}}{(1 - \delta S_X^{hC})(1 - \gamma S_Y^{hC})} \right] \frac{S_X^{hC}}{(1 - \delta S_X^{hC})^2} + S_X^{hC} S_N^{hC} \\ S_{Y_0}^{hC} = \left[1 + \frac{\alpha S_X^{hC}}{1 - \delta S_X^{hC}} + \frac{\alpha^2 (S_X^{hC})^2}{2(1 - \delta S_X^{hC})^2} + \frac{\alpha^2 S_X^{hC} S_Y^{hC}}{(1 - \delta S_X^{hC})(1 - \gamma S_Y^{hC})} \right] \frac{S_Y^{hC}}{(1 - \gamma S_Y^{hC})^2} + \beta S_Y^{hC} S_N^{hC} \\ S_{N_0}^{hC} = S_N^{hC} + \beta S_Y^{hC} S_N^{hC} + S_X^{hC} S_N^{hC} \end{cases} \quad (9)$$

Предположим, что исходные концентрации полезного лиганда X_0 и ДНК (N_0) являются константами. Тогда единственным изменяемым параметром системы Y – X –ДНК является исходная концентрация Y_0 . Однако в условиях выбранного концентрационного диапазона лиганда-интерцептора ($Y_0 \approx 0$ или, что то же самое, $S_{Y_0}^0 \approx 0$) функция факторов A_D и R_D фактически является линейной. Определим вид факторов A_D и R_D в окрестности точки $Y_0 = 0$ ($S_{Y_0}^0 = 0$), пренебрегая членами высокого порядка:

$$A_D(Y_0) \approx A_{D0} + \left. \frac{dA_D}{dY_0} \right|_{Y_0=0} \times Y_0 \quad \text{или} \quad A_D(S_{Y_0}^0) \approx A_{D0} + \left. \frac{dA_D}{dS_{Y_0}^0} \right|_{S_{Y_0}^0=0} \times S_{Y_0}^0; \quad (10)$$

$$R_D(Y_0) \approx R_{D0} + \left. \frac{dR_D}{dY_0} \right|_{Y_0=0} \times Y_0 \quad \text{или} \quad R_D(S_{Y_0}^0) \approx R_{D0} + \left. \frac{dR_D}{dS_{Y_0}^0} \right|_{S_{Y_0}^0=0} \times S_{Y_0}^0, \quad (11)$$

где A_{D0} и R_{D0} — значения соответствующих факторов в точке $Y_0 = 0$ ($S_{Y_0}^0 = 0$).

Таким образом, задача сводится к нахождению функций факторов и их первых производных в точке $Y_0 = 0$ ($S_{Y_0}^0 = 0$). При этом следует отметить, что при стремлении $S_{Y_0}^0$ к нулю справедлива следующая система, в соответствии с введенным понятием «базового» состояния:

$$\begin{cases} S_X^h \rightarrow S_X^0 & S_N^h \rightarrow S_N^0 & S_Y^h \rightarrow 0 \\ S_X^C \rightarrow S_X^0 & S_N^C \rightarrow S_N^0 & S_Y^C \rightarrow 0 \\ S_X^{hC} \rightarrow S_X^0 & S_N^{hC} \rightarrow S_N^0 & S_Y^{hC} \rightarrow 0 \end{cases} \quad (12)$$

Анализ фактора A_D

Исходя из определения (4) и введенных обозначений (8), фактор A_D принимает вид:

$$A_D = \frac{F^0 - F^{hC}}{F^0} = \frac{S_N^{hC}(1 + \beta S_Y^{hC}) - S_N^0}{S_X^0 S_N^0}. \quad (13)$$

С физической точки зрения, при уменьшении содержания примеси в растворе ее влияние на «базовое» состояние системы X – N становятся незначительными, что фактически означает

$\lim_{S_{Y_0}^0 \rightarrow 0} F^{hC} = F^0$. Тогда получаем:

$$A_{D0} = \lim_{S_{Y_0}^0 \rightarrow 0} A_D(Y_0) = \lim_{F^{hC} \rightarrow F^0} \frac{F^0 - F^{hC}}{F^0} = 0. \quad (14)$$

Учитывая условия (12), найдем производную фактора A_D при $S_{Y_0}^0 \rightarrow 0$:

$$\left. \frac{dA_D}{dS_{Y_0}^0} \right|_{S_{Y_0}^0=0} = \lim_{S_{Y_0}^0 \rightarrow 0} \left[\frac{d}{dS_{Y_0}^0} \left(\frac{S_N^{hC}(1 + \beta S_Y^{hC}) - S_N^0}{S_X^0 S_N^0} \right) \right] = \frac{\left[\frac{dS_N^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] + \beta S_N^0 \left[\frac{dS_Y^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right]}{S_X^0 S_N^0}, \quad (15)$$

где $\left[\frac{dS_N^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right]$ и $\left[\frac{dS_Y^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right]$ — пределы производных функций мономерных концентраций N и Y при $S_{Y_0}^0 \rightarrow 0$, которые могут быть найдены из (9).

Продифференцировав уравнения системы (9) и найдя предел при $S_{Y_0}^0 \rightarrow 0$, получим систему дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} 0 = (S_N^0 + \Delta_2) \left[\frac{dS_X^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] + \Delta_1^2 \alpha S_X^0 (1 + \Delta_1 \alpha S_X^0) \left[\frac{dS_Y^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] + S_X^0 \left[\frac{dS_N^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] \\ 1 = \left(1 + \beta S_N^0 + \Delta_1 \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \Delta_1 \alpha S_X^0 \right) \right) \left[\frac{dS_Y^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] \\ 0 = S_N^0 \left[\frac{dS_X^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] + \beta S_N^0 \left[\frac{dS_Y^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] + (1 + S_X^0) \left[\frac{dS_N^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] \end{cases}, \quad (16)$$

где $\Delta_1 = \frac{1}{1 - \delta S_X^0}$, $\Delta_2 = \frac{1 + \delta S_X^0}{(1 - \delta S_X^0)^3}$ — вспомогательные величины, характеризующие вклад самоассоциации. Как видно из (16), уравнения системы заданы в терминах параметров «базового» состояния X-ДНК. Система (16) имеет решение, которое может быть получено методом Крамера:

$$\begin{cases} \left[\frac{dS_X^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] = \frac{S_X^0}{S_N^0 + \Delta_2 (1 + S_X^0)} \frac{\beta S_N^0 - \Delta_1^2 \alpha (1 + S_X^0) (1 + \Delta_1 \alpha S_X^0)}{1 + \beta S_N^0 + \Delta_1 \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \Delta_1 \alpha S_X^0 \right)} \\ \left[\frac{dS_Y^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] = \frac{1}{1 + \beta S_N^0 + \Delta_1 \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \Delta_1 \alpha S_X^0 \right)} \\ \left[\frac{dS_N^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] = \frac{S_N^0}{S_N^0 + \Delta_2 (1 + S_X^0)} \frac{\Delta_1^2 \alpha S_X^0 (1 + \Delta_1 \alpha S_X^0) - \beta (S_N^0 + \Delta_2)}{1 + \beta S_N^0 + \Delta_1 \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \Delta_1 \alpha S_X^0 \right)} \end{cases}. \quad (17)$$

Комбинируя уравнения (13), (14) и (17), можно окончательно определить зависимость фактора A_D в окрестности точки $Y_0 = 0$ ($S_{Y_0}^0 = 0$):

$$A_D \approx \frac{1}{S_N^0 + \Delta_2 (1 + S_X^0)} \frac{\beta \Delta_2 + \Delta_1^2 \alpha (1 + \Delta_1 \alpha S_X^0)}{1 + \beta S_N^0 + \Delta_1 \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \Delta_1 \alpha S_X^0 \right)} \times S_{Y_0}^0. \quad (18)$$

Аналитическая зависимость фактора A_D (7) была получена в условиях низкого диапазона концентраций лиганда-интерцептора Y_0 . Аналогичная методика может быть применена для поиска аналитической зависимости фактора R_D при низких концентрациях примеси Y_0 .

Анализ фактора R_D

Исходя из определения (3) и введенных обозначений (8), фактор R_D принимает вид:

$$R_D = \frac{F^0 - F^C}{F^0 - F^h} = \frac{\frac{S_X^C}{(1 - \delta S_X^C)^2} - \frac{S_X^0}{(1 - \delta S_X^0)^2}}{S_N^h - S_N^0}. \quad (19)$$

Фактор R_D является более информативной величиной, позволяющей судить об эффективности одного механизма по отношению к другому в процессе перераспределения молекул лиганда X . Однако анализ зависимости $R_D(Y_0)$ осложнен большими математическими преобразованиями, которые неизбежны при прямом поиске аналитического решения. По определению (3) фактор R_D содержит переменные, являющиеся решением системы уравнений (9), предварительно модифицированной (путем обнуления соответствующих констант) для выделения конкретного механизма в «чистом» виде, т.е. без учета вклада альтернативного механизма. Такой подход порождает необходимость решения двух независимых систем уравнений и представления решения через «базовые» характеристики. Однако задача облегчается в связи с решением в окрестности точки $Y_0 = 0$ системы дифференциальных уравнений (17), соответствующей общей схеме реакций, протекающих по обоим механизмам одновременно.

Представим решения систем, соответствующих механизмам, действующих в «чистом» виде:

— при «включенной» гетероассоциации и «отключенном» комплексообразовании молекулы-интерцептора Y с ДНК ($K_{YN} = 0$ или $\beta = 0$):

$$\begin{cases} \left[\frac{dS_X^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] = - \frac{1 + S_X^0}{S_N^0 + \Delta_2(1 + S_X^0)} \frac{\Delta_1^2 \alpha S_X^0 (1 + \Delta_1 \alpha S_X^0)}{1 + \Delta_1 \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \Delta_1 \alpha S_X^0 \right)} \\ \left[\frac{dS_Y^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] = \frac{1}{1 + \Delta_1 \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \Delta_1 \alpha S_X^0 \right)} \\ \left[\frac{dS_N^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] = \frac{S_N^0}{S_N^0 + \Delta_2(1 + S_X^0)} \frac{\Delta_1^2 \alpha S_X^0 (1 + \Delta_1 \alpha S_X^0)}{1 + \Delta_1 \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \Delta_1 \alpha S_X^0 \right)} \end{cases}; \quad (20)$$

— при «отключенной» гетероассоциации и «включенном» комплексообразовании молекулы-интерцептора Y с ДНК ($K_h = 0$ или $\alpha = 0$):

$$\begin{cases} \left[\frac{dS_X^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] = - \frac{S_X^0}{S_N^0 + \Delta_2(1 + S_X^0)} \frac{\beta S_N^0}{1 + \beta S_N^0} \\ \left[\frac{dS_Y^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] = \frac{1}{1 + \beta S_N^0} \\ \left[\frac{dS_N^{hC}}{dS_{Y_0}^0} \right] = - \frac{S_N^0}{S_N^0 + \Delta_2(1 + S_X^0)} \frac{\beta (\Delta_2 + S_N^0)}{1 + \beta S_N^0} \end{cases}. \quad (21)$$

Как показали предыдущее исследования (см. (5 а)), при $Y_0 \rightarrow 0$ ($S_{Y_0}^0 \rightarrow 0$) фактор R_D в отличие от A_D принимает ненулевое значение. При уменьшении содержания примеси в растворе ее влияние на характеристики системы $X-N$ становится незначительным и мало отличающимся от «базовых». Тогда с учетом (3) получаем:

$$R_{D0} = \lim_{\substack{Y_0 \rightarrow 0 \\ S_{Y_0}^0 \rightarrow 0}} R_D(Y_0) = \lim_{\substack{F^C \rightarrow F^0 \\ F^h \rightarrow F^0}} \frac{F^0 - F^C}{F^0 - F^h} = \left[\frac{0}{0} \right]. \quad (22)$$

Разрешая возникшую неопределенность путем применения правила Лопиталя (22) по переменной $S_{Y_0}^0$, получаем:

$$R_{D0} = \lim_{\substack{Y_0 \rightarrow 0 \\ S_{Y_0}^0 \rightarrow 0}} \frac{d}{dS_{Y_0}^0} \left(\frac{\frac{S_X^C}{(1-\delta S_X^C)^2} - \frac{S_X^0}{(1-\delta S_X^0)^2}}{S_N^h - S_N^0} \right) = \Delta_2 \frac{\left[\frac{dS_X^C}{dS_{Y_0}^0} \right]}{\left[\frac{dS_N^h}{dS_{Y_0}^0} \right]}, \quad (23)$$

где $\left[\frac{dS_X^C}{dS_{Y_0}^0} \right]$ и $\left[\frac{dS_N^h}{dS_{Y_0}^0} \right]$ — пределы производных функций мономерных концентраций X и N при $S_{Y_0}^0 \rightarrow 0$,

которые могут быть найдены из (20) и (21). Тогда окончательно получим:

$$R_{D0} = \frac{\Delta_2}{\Delta_1^2} \frac{\beta}{\alpha} \frac{1 + \Delta_1 \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \Delta_1 \alpha S_X^0 \right)}{(1 + \beta S_N^0) (1 + \Delta_1 \alpha S_X^0)}. \quad (24)$$

Последним этапом в анализе линейной формы фактора R_D является поиск аналитического выражения для первой производной функции $R_D(S_{Y_0}^0)$ при $S_{Y_0}^0 \rightarrow 0$. Используя (24), получим:

$$\lim_{\substack{Y_0 \rightarrow 0 \\ S_{Y_0}^0 \rightarrow 0}} \frac{dR_D}{dS_{Y_0}^0} = \lim_{\substack{F^C \rightarrow F^0 \\ F^h \rightarrow F^0}} \frac{(F^0 - F^C) \frac{dF^h}{dS_{Y_0}^0} - (F^0 - F^h) \frac{dF^C}{dS_{Y_0}^0}}{(F^0 - F^h)^2} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \end{bmatrix},$$

или, разрешая неопределенность:

$$\begin{aligned} \lim_{\substack{Y_0 \rightarrow 0 \\ S_{Y_0}^0 \rightarrow 0}} \frac{dR_D}{dS_{Y_0}^0} &= \lim_{\substack{F^C \rightarrow F^0 \\ F^h \rightarrow F^0}} \frac{(F^0 - F^h) \frac{d^2 F^C}{d(S_{Y_0}^0)^2} - (F^0 - F^C) \frac{d^2 F^h}{d(S_{Y_0}^0)^2}}{2(F^0 - F^h) \frac{dF^h}{dS_{Y_0}^0}} = \\ &= \lim_{\substack{F^C \rightarrow F^0 \\ F^h \rightarrow F^0}} \frac{\frac{d^2 F^C}{d(S_{Y_0}^0)^2} - \frac{F^0 - F^C}{F^0 - F^h} \frac{d^2 F^h}{d(S_{Y_0}^0)^2}}{2 \frac{dF^h}{dS_{Y_0}^0}} = \frac{\left[\frac{d^2 F^C}{d(S_{Y_0}^0)^2} \right] - R_{D0} \left[\frac{d^2 F^h}{d(S_{Y_0}^0)^2} \right]}{2 \left[\frac{dF^h}{dS_{Y_0}^0} \right]}. \end{aligned} \quad (25)$$

В обозначениях $\{S, \Delta, \alpha, \beta\}$:

$$\lim_{\substack{Y_0 \rightarrow 0 \\ S_{Y_0}^0 \rightarrow 0}} \frac{dR_D}{dS_{Y_0}^0} = \frac{2 \frac{\Delta_3}{S_X^0} \left[\frac{dS_X^C}{dS_{Y_0}^0} \right]^2 + \Delta_2 \left[\frac{d^2 S_X^C}{d(S_{Y_0}^0)^2} \right] - R_{D0} \left[\frac{d^2 S_N^h}{d(S_{Y_0}^0)^2} \right]}{2 \left[\frac{dS_N^h}{dS_{Y_0}^0} \right]}, \quad (25)$$

где $\left[\frac{dS_X^C}{dS_{Y_0}^0} \right]$ и $\left[\frac{dS_N^h}{dS_{Y_0}^0} \right]$ уже известны из (20), (21), а $\Delta_3 = \frac{\delta S_X^0 (2 + \delta S_X^0)}{(1 - \delta S_X^0)^4}$ — величина, характеризующая

вклад самоассоциации лиганда X . Для нахождения $\left[\frac{dS_X^C}{dS_{Y_0}^0} \right]$ и $\left[\frac{dS_N^h}{dS_{Y_0}^0} \right]$ дважды продифференцируем (20) и

(21) в пределе при $S_{Y_0}^0 \rightarrow 0$, решим полученные системы уравнений, линейных относительно вторых

производных. Опуская громоздкие преобразования, запишем решение для первой производной фактора R_D при $S_{Y_0}^0 \rightarrow 0$:

$$\lim_{\substack{Y_0 \rightarrow 0 \\ S_{Y_0}^0 \rightarrow 0}} \frac{dR_D}{dS_{Y_0}^0} = R_{D0} \left(\frac{\alpha}{1 + \Delta_1 \alpha S_X^0} \frac{A - \tilde{A}}{1 + \Delta_1 \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \Delta_1 \alpha S_X^0\right)} + \frac{\beta}{1 + \beta S_N^0} \frac{B - \tilde{B}}{S_N^0 + \Delta_2 (1 + S_X^0)} \right), \quad (26)$$

где

$$\begin{aligned} A &= (1 + \Delta_1 \alpha S_X^0) \left(\frac{\gamma}{\alpha} + \frac{\Delta_1 \alpha S_X^0}{1 + \Delta_1 \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \Delta_1 \alpha S_X^0\right)} + \frac{(1 + S_X^0) (\Delta_2 + (\Delta_2 + \Delta_3) \Delta_1 \alpha S_X^0)}{S_N^0 + \Delta_2 (1 + S_X^0)} \right), \\ \tilde{A} &= \frac{1}{4} + \frac{\Delta_1^2 (1 + S_X^0) (1 + \Delta_1 \alpha S_X^0)}{S_N^0 + \Delta_2 (1 + S_X^0)} \left(\frac{\Delta_1^2 \alpha S_X^0 (1 + \Delta_1 \alpha S_X^0)}{1 + \Delta_1 \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \Delta_1 \alpha S_X^0\right)} + \frac{\Delta_3 + (\Delta_2 + \Delta_3) S_X^0}{S_N^0 + \Delta_2 (1 + S_X^0)} \right), \\ B &= \frac{S_N^0}{\Delta_2} \frac{\Delta_2^2 + (\Delta_2 + \Delta_3) S_N^0}{S_N^0 + \Delta_2 (1 + S_X^0)} \quad \tilde{B} = \frac{\Delta_2 + S_N^0}{1 + \beta S_N^0}. \end{aligned} \quad (27)$$

Уравнения (24) и (26), (27) полностью определяют линейную форму (11) фактора R_D в окрестности точки $Y_0 = 0$ ($S_{Y_0}^0 = 0$):

$$R_D \approx R_{D0} \left(1 + \left(\frac{\alpha}{1 + \Delta_1 \alpha S_X^0} \frac{A - \tilde{A}}{1 + \Delta_1 \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \Delta_1 \alpha S_X^0\right)} + \frac{\beta}{1 + \beta S_N^0} \frac{B - \tilde{B}}{S_N^0 + \Delta_2 (1 + S_X^0)} \right) \times S_{Y_0}^0 \right). \quad (28)$$

Верификация и анализ результатов

Вывод соотношений (18), (28) является достаточно громоздким, что требует обязательной проверки на корректность полученных формул. С целью определения достоверности вывода формул, соотношения (18), (28) были использованы для построения теоретических кривых для различных вариантов трехкомпонентных смесей ароматических лигандов и ДНК, и далее сравнивались с ходом расчетных кривых, полученных численным методом из системы (2). На рисунке 1 представлены теоретические и расчетные кривые для системы DAU (X) — FMN (Y) — ДНК, выбранной в качестве примера.

На графиках зависимости четко прослеживается область наложения теоретической и расчетной кривой, при концентрациях $Y_0 < 0,1$ мМ, что свидетельствует об адекватности формул (18) и (28). Поскольку вид функции факторов определенным образом зависит от констант взаимодействий и исходных концентраций реагирующих веществ, область применимости уравнений варьирует в зависимости от параметров трехкомпонентных смесей.

Выражения (18) и (28) позволяют также провести условную верификацию аналитического вида функции R_D на основании предыдущих исследований. Если применить к линейной функции факторов R_D и A_D условия квазифизиологического диапазона концентраций X и N ($\alpha S_{X_0}^0 \ll 1$, $\beta S_{N_0}^0 \ll 1$ и $X_0 = N_0$), функции R_D и A_D приобретают вид:

$$\lim_{\substack{Y_0 \rightarrow 0 \\ S_{Y_0}^0 \rightarrow 0}} R_D = R_{D0} = \frac{\beta}{\alpha} = \frac{K_{YN}}{K_h}, \quad \lim_{\substack{Y_0 \rightarrow 0 \\ S_{Y_0}^0 \rightarrow 0}} A_D = A_{D0} = 0,$$

что полностью совпадает с выводом (5 а).

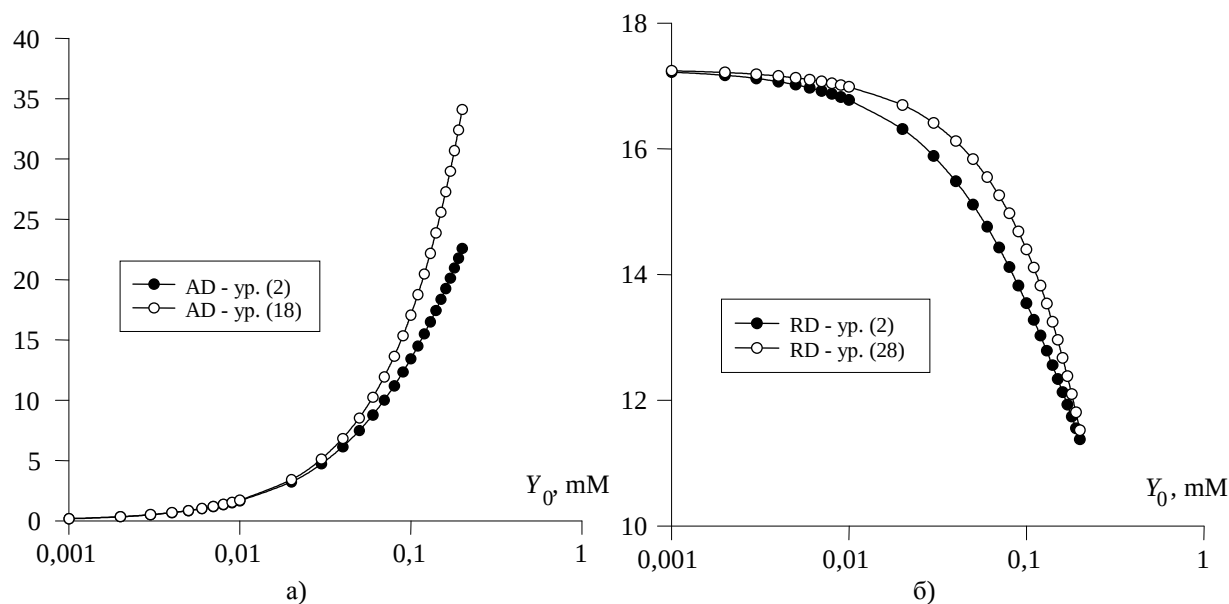


Рисунок 1 – Расчетная (2) и теоретическая зависимость (18) и (28) факторов A_D (а) и R_D (б) для системы DAU(X)-FMN(Y)-ДНК

Соотношения (18), (28) являются достаточно громоздкими и неудобными для практического использования. Как неоднократно отмечалось выше, биологически активные вещества ароматической природы характеризуются способностью образовывать самоассоциированные комплексы, что учтено в (18), (28), однако для большинства БАС при низких концентрациях этот процесс зачастую оказывает пренебрежимо малое влияние на равновесное распределение комплексов в системе по сравнению с гетероассоциацией или комплексообразованием с ДНК. Это утверждение, однако, не общезначимо, поскольку для целого ряда систем X-Y константа самоассоциации соизмерима с константой гетероассоциации, а для некоторых систем, содержащих, например, новатрон, константа самоассоциации может значительно превосходить равновесную константу гетероассоциации. Кроме этого, для NOV существуют свидетельства об агрегации на внутриклеточном уровне [8], а на антибиотике DOX было показано, что агрегация может влиять на кинетику транспорта через мембрану [9]. Это значит, что при определенных условиях учет самоассоциации в анализе конкурентного связывания и полный вид уравнений (18), (28) может иметь смысл. Тем не менее, для практического использования целесообразно также получить выражения для факторов, не содержащие вклад от самоассоциации. В этом случае, можно пренебречь образованием самоассоциированных агрегатов, т.е. $\gamma \rightarrow 0$ и $\delta \rightarrow 0$. Преобразуем (18), (28):

$$\begin{cases} A_D \approx \frac{\beta + \alpha(1 + \alpha S_X^0)}{(1 + S_N^0 + S_X^0) \left(1 + \beta S_N^0 + \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \alpha S_X^0 \right) \right)} \times S_{Y_0}^0 \\ R_D \approx R_{D0} \left(1 + \left(\frac{\alpha}{1 + \alpha S_X^0} \frac{A - \tilde{A}}{1 + \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \alpha S_X^0 \right)} + \frac{\beta}{1 + \beta S_N^0} \frac{B - \tilde{B}}{(1 + S_N^0 + S_X^0)} \right) \times S_{Y_0}^0 \right) \end{cases}, \quad (29)$$

где

$$\begin{aligned} A &= (1 + \alpha S_X^0) \left(\frac{\alpha S_X^0}{1 + \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \alpha S_X^0 \right)} + \frac{(1 + S_X^0)(1 + 2\alpha S_X^0)}{1 + S_N^0 + S_X^0} \right) & B &= \frac{S_N^0(1 + S_N^0)}{1 + S_N^0 + S_X^0} \\ \tilde{A} &= \frac{1}{4} + \frac{S_X^0(1 + S_X^0)(1 + \alpha S_X^0)^2}{1 + S_N^0 + S_X^0} \left(\frac{\alpha(1 + \alpha S_X^0)}{1 + \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \alpha S_X^0 \right)} + \frac{1}{1 + S_N^0 + S_X^0} \right) & \tilde{B} &= \frac{1 + S_N^0}{1 + \beta S_N^0} \end{aligned}$$

$$R_{D0} = \frac{\beta}{\alpha} \frac{1 + \alpha S_X^0 \left(1 + \frac{1}{2} \alpha S_X^0\right)}{(1 + \beta S_N^0)(1 + \alpha S_X^0)}.$$

В предыдущем подразделе было показано, что для большинства систем при достаточно низких концентрациях X_0 и N_0 процессы гетероассоциации и комплексообразования лиганда-интерцептора с ДНК становятся также менее эффективными. Математически этот случай может быть задан достаточным условием: $\alpha S_{X_0}^0 \ll 1$ (или $X_0 \ll K_h^{-1}$) и $\beta S_{N_0}^0 \ll 1$ (или $N_0 \ll K_{YN}^{-1}$). В таком концентрационном диапазоне зависимость (18), (28) значительно упрощается:

$$\begin{cases} A_D \approx \frac{\alpha + \beta}{1 + S_N^0 + S_X^0} \times S_{Y_0}^0 \\ R_D \approx \frac{\beta}{\alpha} \left(1 + \left(\alpha - \beta \right) \frac{(1 + S_X^0)(1 + S_N^0)}{(1 + S_N^0 + S_X^0)^2} - \frac{\alpha}{4} \right) \times S_{Y_0}^0 \end{cases}. \quad (30)$$

Практические рекомендации к использованию выведенных соотношений для факторов R_D и A_D

Полученные выше теоретические формулы для расчета основных количественных параметров трехкомпонентной системы X-Y-ДНК — факторов R_D и A_D — позволяют оценить их значения на основании констант комплексообразования и концентраций компонент в смешанном растворе, измеряемых физико-химическими методами. Фактически это создает фундамент для направленной регуляции факторов R_D и A_D в модельной биологической системе путем варьирования параметров взаимодействия и концентраций, что может быть чрезвычайно важным при разработке протоколов введения препаратов и оптимизации компонентного состава смесей в комбинированной химиотерапии.

Следует отметить, что главным условием применимости к биологической системе результатов теоретического анализа являются четыре основных условия [7]:

- механизм биологического действия лиганда X проявляется через связывание с клеточной ДНК;
- собственная биологическая активность интерцептора Y либо мала, либо не интерферирует с активностью X ;
- лиганды X и Y не проявляют выраженной сиквенс-специфичности связывания с ДНК;
- основными механизмами совместного действия лигандов X и Y на ДНК являются интерцепторный и протекторный механизмы.

Необходимо также отметить, что концентрация тетрамерных участков на ДНК, доступных для посадки лигандов, едва ли будет известна в конкретном биологическом эксперименте, следовательно, при использовании формул рекомендуется принимать квазифизиологическую концентрацию $N_0 = 0,01$ mM.

Как подробно обсуждалось в работах [3, 5, 6], для многих представителей группы ароматических БАС в комбинациях с типичными интерцепторами — кофеином и витамином B_2 — эти условия являются справедливыми.

Оценка граничных концентраций молекул-интерцепторов

Одним из возможных практических следствий применения теоретических формул для расчета факторов R_D и A_D , полученных в предыдущих подразделах, является оценка граничных концентраций молекул-интерцепторов, начиная с которых можно ожидать биологический эффект взаимовлияния лигандов X , Y при совместном связывании с ДНК.

Известно [2], что в клеточной популяции всегда существует 3-5 % клеток, подвергающихся спонтанному апоптозу вне зависимости от содержания БАС, и является своеобразным «шумом» при оценке протекторных свойств кофеина. Примем условный порог чувствительности биологического эксперимента на уровне $A_D = 15\%$, т.е. изменение активности лиганда X более чем на 15 % при добавлении интерцептора, считается надежным проявлением биологического синергизма в данной системе. В таблице 1 представлены концентрации лиганда-интерцептора Y_0 при условии снижения биологического действия БАС на $A_D = 15\%$, которые были рассчитаны с использованием формулы (18), (28) при квазифизиологических условиях, т.е. $X_0 = N_0 = 0,01$ mM.

Таблиця 1 — Концентрації ліганда-інтерцептора Y_0 (mM), що відповідають зниженню біологічної активності на $A_D = 15\%$ ($X_0 = N_0 = 0,01$ mM)

Ліганд Інтерцептор		Антибіотики						Мутагени			Вітаміни	
		DAU	DOX	NOV	AMD	NOG	NOR	PF	EB	CAF	FMN	NMD
Антибіотики	DAU		—	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002	0,002
	DOX	—		—	—	—	—	—	—	0,002	—	—
	NOV	0,003	—		0,004	0,004	—	—	—	0,002	0,002	0,002
	AMD	0,003	—	0,003		0,004	0,002	—	—	0,002	0,002	0,002
	NOG	0,003	—	0,003	0,003		—	—	—	0,002	0,002	—
	NOR	0,33	—	—	0,32	—		—	—	0,076	0,080	—
Мутагени	PF	0,050	—	—	—	—	—		0,020	0,011	0,012	—
	EB	0,010	—	—	—	—	—	0,004		0,004	0,004	—
	CAF	2,3	1,9	1,5	1,95	2,3	0,57	0,47	0,96		0,43	0,60
Вітаміни	FMN	0,090	—	0,015	0,11	0,12	0,020	0,020	0,040	0,020		0,02
	NMD	11,3	—	25,8	35,6	—	—	—	—	21,2	2,7	

Из таблицы 1 видно, что для большинства антибиотиков граничные концентрации CAF составляют единицы mM, что полностью соответствует результатам *in vitro* исследований на лейкемических клеточных линиях [1,2], в которых более или менее различное протекторное действие CAF (10-20%) было также связано с миллимолярным диапазоном содержания кофеина. Это косвенно свидетельствует об адекватности применимости формулы (18), (28) для оценки изменения биологического эффекта базового препарата X при введении в систему интерцептора Y. Этот вывод также подтверждается клеточным экспериментом по протекторному действию витамина FMN на антибиотик топотекан [10].

Бібліографічний список використаної літератури

1. Traganos F. Caffeine modulates the effects of DNA-intercalating drugs in vitro: A flow cytometric and spectrophotometric analysis of caffeine interaction with novatrone, doxorubicin, ellipticine, and the doxorubicin analogue AD198 / F. Traganos, J. Kapuscinsky, Z. Darzynkiewicz // Cancer Res. — 1991. — Vol. 51. — № 4. — P. 3682–3689.
2. Traganos F. Caffeine prevents apoptosis and cell cycle effects induced by camptothecin or topotecan in HL-60 cells / F. Traganos, J. Kapuscinsky, J. Gong [et al.] // Cancer Res. — 1993. — Vol. 53. — № 19. — P. 4613–4618.
3. 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. — Vol. 118. — № 2–3. — P. 118–127.
4. 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. — Vol. 36. — № 1. — P. 1–11.
5. 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. — Vol. 30. — № 5. — P. 354–366.
6. 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. — Vol. 121. — № 2. — P. 84–95.
7. Evstigneev M.P. Quantitation of the molecular mechanisms of biological synergism in a mixture of DNA-acting aromatic drugs / M.P. Evstigneev, V.P. Evstigneev, A.O. Lantushenko [и др.] // Biophys. Chem. — 2008. — Vol. 132. — № 2–3. — P. 148–158.

8. 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 [et al.] // Biophys. J. — 1997. — Vol. 73. — № 6. — P. 3328–3336.

9. Dalmark M. Molecular association between Doxorubicin (adriamycin) and DNA-derived bases, nucleosides, nucleotides, other aromatic compound and proteins in aqueous solution / M. Dalmark, P. Johansen // Mol. Pharmacol. — 1982. — Vol. 22. — № 1. — P. 158–165.

10. Лантушенко А.О. Протекторное действие витамина В₂ по отношению к антибиотику топотекану in vitro / А.О. Лантушенко, А.А. Мосунов, З. Даржинкевич [и др.] // Физ. живого. — 2007. — Т. 15. — № 2. — С. 18–23.

Поступила в редакцию 09.10.2010 г.

Євстігнєєв В.П., Бучельніков А.С., Лохова Д.С. Теоретичне дослідження інтерцепторно-протекторного механізму дії ДНК-зв'язуючихся ароматичних препаратів у комбінації при низьких концентраціях ліганду-інтерцептору

Проведено теоретичний аналіз інтерцепторно-протекторної дії в трикомпонентних сумішах ароматичних БАС і ДНК. Вперше отримано аналітичні вирази для розрахунку факторів R_D і A_D при низьких концентраціях ліганду-інтерцептору Y . Проведено чисельну верифікацію отриманих формул. Було проведено оцінку граничних концентрацій молекул-інтерцепторів, при яких слід очікувати біологічного ефекту взаємодії лігандів X , Y при їх сумісному зв'язуванні з ДНК.

Ключові слова: інтерцепторно-протекторна дія, комплексоутворення з ДНК, біологічний ефект, гетероасоціація.

Evstigneev V.P., Buchelnikov A.S., Lohova D.S. Theoretical analysis of interceptor/protector mechanism of action for aromatic drugs on the DNA in mixtures under condition of low concentrations of the interceptor ligand

The results of theoretical analysis of interceptor/protector action of aromatic biologically active compounds on DNA in three-component mixtures are presented in the paper. Analytical relations for R_D and A_D factors under limiting condition of low concentrations of interceptor ligand Y are derived. Quantitative verification of all obtained equations are made. With respect to various combinations of aromatic drugs the magnitudes of concentration threshold for the interceptor ligand are evaluated, under which an alteration of biological response of the main drug can be predicted.

Keywords: interceptor-protector action, complexation with DNA, biological effect, hetero-association.