

УДК 577.113

А.А. Мосунов, аспирант

М.П. Евстигнеев, д-р физ.-мат. наук, профессор

Севастопольский национальный технический университет

ул. Университетская 33, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: max_evstigneev@mail.ru

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА СВЯЗЫВАНИЕ АНТИБИОТИКА ТОПОТЕКАНА С ДНК

Проведен анализ протекторного и интерцепторного механизмов действия ароматического лиганда на связывание антибиотика топотекана с ДНК с учетом существования последнего при физиологических условиях в двух различных формах.

Ключевые слова: интерцепторный, протекторный механизм, топотекан, гетероассоциация.

Введение

Биологически активные ароматические соединения группы камптотецинов (CPT) (camptothecins) в настоящее время являются одними из наиболее перспективных препаратов для лечения различных видов раковых заболеваний. Цитотоксическая активность этих соединений обусловлена их способностью индуцировать односторонние разрывы в ядерной ДНК в присутствии топоизомеразы I [1]. Топотекан (TPT) и иринотекан являются производными камптотецина, нашедшие применение в клинической практике для лечения различных видов раковых заболеваний [2]. Основной физико-химической особенностью производных CPT является наличие лактонного кольца E, гидролизующегося при нейтральных pH в карбоксилатную форму (рисунок 1), причем в окрестности физиологического pH ~ 7 соотношение двух форм в водном растворе примерно 50:50, и именно лактонная форма обладает выраженным биологическим действием [3].

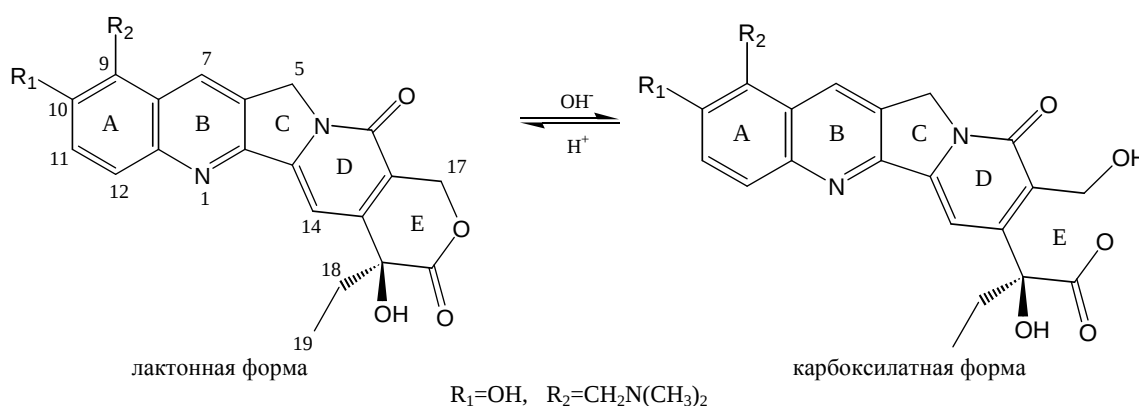


Рисунок 1 – Гидролиз топотекана из лактонной в открытую форму в зависимости от кислотности среды [4]

Помимо изучения собственной биологической активности производных CPT на уровнях *in vitro* и *in vivo*, было также показано, что эффективность камптотецинов может меняться при комбинировании с другими биологически активными соединениями [5]. В частности, введение кофеина [6] или витамина B₂ [7] одновременно с топотеканом снижает общую *in vitro* токсичность последнего. Механизмы этих синергетических эффектов на сегодняшний день до конца не выяснены, однако существует мнение, что непосредственное комплексообразование топотекана с ароматическими соединениями (гетероассоциация – интерцепторный механизм) и их конкуренция за места посадки на ДНК (протекторный механизм) лежат в основе наблюдаемых клеточных эффектов [6, 7].

Целью настоящей работы является количественная оценка вклада интерцепторного и протекторного механизмов действия ароматических лигандов: кофеина (CAF), витамина B₂ (флавиномононуклеотид, FMN), витамина B₃ (никотинамид, NMD), антибиотика дауномицина (DAU), мутагенов профлавина (PF) и бромистого этидия (EB) на связывание антибиотика топотекана с ДНК.

Результаты и обсуждение

Общее представление о молекулярных механизмах действия ароматического лиганда на связывание ТРТ с ДНК.

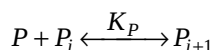
В работе [8] было показано, что для класса ароматических биологически активных соединений существуют два фундаментальных молекулярных механизма изменения биологической активности базового лиганда X в системе X -Биорецептор при введении в систему лиганда-интерцептора Y : интерцепторный и протекторный механизмы. В основе интерцепторного механизма лежит гетероассоциация X - Y , приводящая 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 . В обоих случаях совместное действие интерцепторного и протекторного механизмов приводит к изменению биологического эффекта лиганда X в присутствии интерцептора Y .

Ситуация с антибиотиком топотеканом является более сложной, чем в описанной выше базовой модели трехкомпонентной системы X - Y -ДНК. Длительное время считалось, что механизм биологического действия ТРТ проявляется на этапе связывания с комплексом ДНК-Топоизомеразы, и не обусловлен непосредственным действием на ядерную ДНК [9]. Этот факт послужил основанием для авторов работы [6] исключить вообще протекторный механизм из рассмотрения, и интерпретировать снижение токсичности ТРТ при введении в клеточную систему кофеина как результат действия только интерцепторного механизма. Вместе с тем, сравнительно недавно было показано, что ТРТ связывается с дуплексной ДНК и в отсутствие фермента [9]. Это стимулировало серию исследований комплексообразования ТРТ с ДНК как в контексте структуры и типов формируемых комплексов, так и с точки зрения термодинамики процесса связывания [10]. В частности, было показано, что связывание с ДНК карбоксилатной формы ничтожно мало по сравнению с лактонной [9], что объяснило факт высокой биологической активности именно лактонной формы (см. выше). Эти результаты означают, что исключение протекторного механизма из анализа совместного действия комбинации Лиганд-ТРТ на ДНК не является корректным. Более того, одновременное сосуществование лактонной и карбоксилатной форм при физиологическом pH также требует учета в модели совместного связывания, поскольку гетероассоциация карбоксилатной формы с лигандом может косвенно влиять на долю молекул лактонной формы, присутствующих в растворе и связывающихся с ДНК.

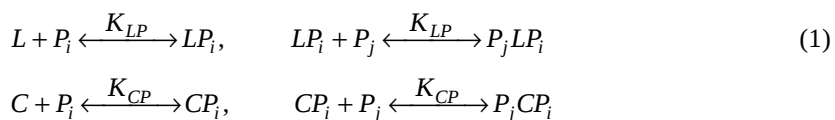
Модель для описания динамического равновесия в системе ТРТ-Лиганд-ДНК.

Пусть в растворе присутствуют четыре различные компоненты: лактонная форма топотекана (L), карбоксилатная форма (C), лиганд-интерцептор (P) и ДНК (N). Согласно результатам работы [9], карбоксилатная форма не связывается с ДНК и не оказывает биологического действия, однако, также как и лактонная, образует гетерокомплексы с интерцептором. Как указывалось выше, в качестве модели ДНК достаточно рассмотреть короткий фрагмент, связывание с которым L формы ТРТ происходит в стехиометрии 1:1. Учет также тот факт, что типичные физиологические концентрации антибиотика ТРТ по порядку величины не превышают μM , что предполагает отсутствие какой-либо самоассоциации L и C форм, либо взаимодействия между ними в растворе; в то же время концентрации интерцептора могут достигать диапазона mM , что требует учета его самоассоциации (P_i). Эти особенности накладывают ограничение на типы гетерокомплексов, образуемых в растворе: лишь мономеры L и C форм могут присутствовать в составе гетерокомплексов, фланкированные с одной, либо с двух сторон, агрегатами интерцептора (LP_i , CP_i или P_jLP_i , P_jCP_i). С учетом сказанного, полная система взаимодействий в такой системе описывается схемой реакций

самоассоциация



гетероассоциация



комплексообразование с ДНК



где i, j – число молекул интерцептора в агрегате; K_P , K_{LP} , K_{CP} , K_{LN} , K_{PN} – соответственно, равновесные константы самоассоциации интерцептора, гетероассоциации лактонной и карбоксилатной форм с интерцептором, и комплексообразования лактонной формы и интерцептора с ДНК.

Закон сохранения массы в четырехкомпонентной системе в общем виде может быть записан как

$$\begin{cases} C_0 = C_1 + \sum_{i=1}^{\infty} [CP_i] + \sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} [P_j CP_i] \\ L_0 = L_1 + \sum_{i=1}^{\infty} [LP_i] + \sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} [P_j LP_i] + [LN] \\ P_0 = \sum_{i=1}^{\infty} i[P_i] + \sum_{i=1}^{\infty} i[CP_i] + \sum_{i=1}^{\infty} i[LP_i] + \sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} (i+j)[P_j CP_i] + \sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} (i+j)[P_j LP_i] + [PN] \\ N_0 = N_1 + [LN] + [PN] \end{cases}, \quad (2)$$

где квадратными скобками [...] обозначены концентрации соответствующих типов комплексов; нижний индекс «0» или «1» обозначает общую или мономерную концентрацию соответственно. Суммы, фигурирующие в выражениях (2), сводятся к бесконечным геометрическим прогрессиям, в связи с чем их раскрытие может быть произведено аналитически:

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^{\infty} [P_i] &= \sum_{i=1}^{\infty} K_P^{i-1} P_1^i = \frac{P_1}{1 - K_P \cdot P_1}, & \sum_{i=1}^{\infty} i[P_i] &= \sum_{i=1}^{\infty} i K_P^{i-1} P_1^i = \frac{P_1}{(1 - K_P \cdot P_1)^2} \\ \sum_{i=1}^{\infty} [CP_i] &= K_{CP} \cdot C_1 \cdot \sum_{i=1}^{\infty} [P_i] = \frac{K_{CP} \cdot C_1 \cdot P_1}{1 - K_P \cdot P_1}, & \text{по аналогии: } [LP_i] &= \frac{K_{LP} \cdot L_1 \cdot P_1}{1 - K_P \cdot P_1} \\ \sum_{i=1}^{\infty} i[CP_i] &= K_{CP} \cdot C_1 \cdot \sum_{i=1}^{\infty} i[P_i] = \frac{K_{CP} \cdot C_1 \cdot P_1}{(1 - K_P \cdot P_1)^2}, & \text{по аналогии: } \sum_{i=1}^{\infty} i[LP_i] &= \frac{K_{LP} \cdot L_1 \cdot P_1}{(1 - K_P \cdot P_1)^2} \end{aligned} \quad (3)$$

Преобразование комплексов с двумя гетеростыками ($P_j LP_i$, $P_j CP_i$) представляет собой более сложную задачу. В работе [11] нами было показано, что двойное суммирование по таким типам комплексов, как в выражениях (2), приводит к завышению их вклада в динамическое равновесие вследствие двойного учета так называемых «зеркальных» комплексов, физически неразличимых в растворе (например, комплексы $P_j LP_i$ и его «отраженный» аналог $P_i LP_j$ идентичны). Там же [11] был предложен способ корректировки выражений двойного суммирования на «зеркальные» комплексы:

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} [P_j CP_i]_{\text{некорр}} &= \sum_{i=1}^{\infty} [P_i] \cdot C_1 \cdot \sum_{j=1}^{\infty} [P_j] = \frac{K_{CP}^2 \cdot C_1 \cdot P_1^2}{(1 - K_P \cdot P_1)^2} \\ \sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} [P_j CP_i]_{\text{корр}} &= \frac{1}{2} \cdot \left(\sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} [P_j CP_i]_{\text{некорр}} + \sum_{i=1}^{\infty} [P_i CP_i] \right) \\ \sum_{i=1}^{\infty} [P_i CP_i] &= C_1 \cdot K_{CP}^2 \cdot (P_1^2 + K_P^2 \cdot P_1^4 + K_P^4 \cdot P_1^6 + \dots) = \frac{C_1 \cdot K_{CP}^2 \cdot P_1^2}{1 - K_P^2 \cdot P_1^2} \end{aligned}$$

Окончательно выражения для скорректированных сумм вида $\sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} [P_j CP_i]$ и $\sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} [P_j LP_i]$ принимают вид:

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} [P_j CP_i]_{\text{корр}} &= \frac{1}{2} \cdot \left[\frac{K_{CP}^2 \cdot C_1 \cdot P_1^2}{(1 - K_P \cdot P_1)^2} + \frac{K_{CP}^2 \cdot C_1 \cdot P_1^2}{1 - K_P^2 \cdot P_1^2} \right] = \frac{K_{CP}^2 \cdot C_1 \cdot P_1^2}{1 - K_P \cdot P_1 - K_P^2 \cdot P_1^2 + K_P^3 \cdot P_1^3} \\ \sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} [P_j LP_i]_{\text{корр}} &= \frac{K_{LP}^2 \cdot L_1 \cdot P_1^2}{1 - K_P \cdot P_1 - K_P^2 \cdot P_1^2 + K_P^3 \cdot P_1^3} \end{aligned} \quad (4)$$

Выражения для оставшихся в (2) сумм вида $\sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} (i+j)[P_j CP_i]$ и $\sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} (i+j)[P_j LP_i]$ удобнее получить методом статсумм:

$$\sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} (i+j) [P_j C P_i]_{\text{корр}} = \frac{\partial \sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} [P_j C P_i]_{\text{корр}}}{\partial \ln P_1} = \frac{K_{CP}^2 \cdot C_1 \cdot P_1^2 \cdot (K_P^2 \cdot P_1^2 + K_P \cdot P_1 + 2)}{(1 - K_P \cdot P_1)^3 (1 + K_P \cdot P_1)^2} \quad (5)$$

$$\sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} (i+j) [P_j L P_i]_{\text{корр}} = \frac{\partial \sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} [P_j L P_i]_{\text{корр}}}{\partial \ln P_1} = \frac{K_{LP}^2 \cdot L_1 \cdot P_1^2 \cdot (K_P^2 \cdot P_1^2 + K_P \cdot P_1 + 2)}{(1 - K_P \cdot P_1)^3 (1 + K_P \cdot P_1)^2}$$

В итоге, с учетом (3)-(5) закон сохранения массы (2) принимает следующий вид:

$$\begin{cases} C_0 = C_1 + \frac{K_{CP} C_1 P_1}{1 - K_P P_1} + \frac{K_{CP}^2 C_1 P_1^2}{1 - K_P P_1 - K_P^2 P_1^2 + K_P^3 P_1^3} \\ L_0 = L_1 + \frac{K_{LP} L_1 P_1}{1 - K_P P_1} + \frac{K_{LP}^2 L_1 P_1^2}{1 - K_P P_1 - K_P^2 P_1^2 + K_P^3 P_1^3} + K_{LN} L_1 N_1 \\ P_0 = \frac{P_1}{(1 - K_P P_1)^2} + \frac{K_{CP} C_1 P_1}{(1 - K_P P_1)^2} + \frac{K_{LP} L_1 P_1}{(1 - K_P P_1)^2} + \frac{K_{CP}^2 C_1 P_1^2 (K_P^2 P_1^2 + K_P P_1 + 2)}{(1 - K_P P_1)^3 (1 + K_P P_1)^2} + \\ + \frac{K_{LP}^2 L_1 P_1^2 (K_P^2 P_1^2 + K_P P_1 + 2)}{(1 - K_P P_1)^3 (1 + K_P P_1)^2} + K_{PN} P_1 N_1 \\ N_0 = N_1 + K_{LN} L_1 N_1 + K_{PN} P_1 N_1 \end{cases} \quad (6)$$

Система уравнений (6) лежит в основе метода анализа совместного действия комбинации Лиганд-Топотекан на ДНК. Ее решение относительно мономерных концентраций L_1 , C_1 , P_1 , N_1 позволяет рассчитать вклад в суммарное динамическое равновесие от любого типа комплекса в растворе.

Метод анализа протекторного и интерцепторного механизмов действия лиганда- интерцептора на связывание ТРТ с ДНК.

Метод анализа соотношения и эффективности действия протекторного и интерцепторного механизмов был разработан ранее в работе [8] для стандартного случая трехкомпонентной системы X-Y-ДНК. Существование антибиотика топотекана в двух формах формально преобразует систему в четырехкомпонентную, однако, как будет показано ниже, исключение из рассмотрения связывания карбоксилатной формы с ДНК позволяет анализировать систему L-C-P-N в рамках стандартной модели X-Y-ДНК с небольшими модификациями.

Оценка влияния процессов гетероассоциации (интерцепторное действие лиганда- интерцептора P) и комплексообразования с ДНК (протекторное действие лиганда- интерцептора P) на способность лактонной формы ТРТ (L) образовывать комплексы с ДНК в присутствии P, производится путем расчета относительного снижения доли комплексов [LN] в двух случаях: при "отключенной" гетероассоциации и "включенном" комплексообразовании P с ДНК ($K_{CP}, K_{LP} = 0$, $K_{PN} \neq 0$) – $f_{C(0)}^L$, и, при "включенной" гетероассоциации и "отключенном" комплексообразовании P с ДНК ($K_{CP}, K_{LP} \neq 0$, $K_{PN} = 0$) – $f_{C(H)}^L$:

$$R_D = \frac{f_{C(0)}^L - f_{C(C)}^L}{f_{C(0)}^L - f_{C(H)}^L}, \quad (7)$$

где $f_{C(0)}^L$ – мольная доля комплексов [LN] при "отключенных" гетероассоциации и комплексообразовании ($K_{CP}, K_{LP} = 0$, $K_{PN} = 0$).

Область $R_D > 1$ соответствует преобладанию процесса комплексообразования P-ДНК над процессом гетероассоциации L-P и C-P (протекторное действие P), а в области $R_D < 1$ главный вклад в уменьшение доли комплексов [LN] вносит процесс гетероассоциации (интерцепторное действие P).

Для оценки процента вытесненного из ДНК антибиотика L при добавлении интерцептора P используется следующий критерий:

$$A_D = \frac{f_{C(0)}^L - f_C^L}{f_{C(0)}^L}, \quad (8)$$

где f_C^L – мольная доля комплексов [LN] при "включенной" гетероассоциации и "включенном" комплексообразовании P с ДНК ($K_{CP}, K_{LP} \neq 0$, $K_{PN} \neq 0$). Как было показано в работе [8], фактор A_D является мерой изменения биологического эффекта антибиотика L при добавлении ароматического лиганда P

вследствие действия двух механизмов: интерцепторного и протекторного. Все мольные доли f^L , фигурирующие в выражениях (7),(8), рассчитываются как $f^L = \frac{K_{LN} L_1 N_1}{L_0}$, где L_1 и N_1 известны из решения системы (6).

Анализ протекторного и интерцепторного механизмов действия лиганда-интерцептора на связывание ТРТ с ДНК.

Решение системы уравнений (6) относительно мономерных концентраций компонент смеси L - C - P - N требует определения полного набора равновесных констант комплексообразования и исходных концентраций компонент. Проведенные ранее методом ЯМР исследования гетероассоциации лактонной и карбоксилатной форм с рассматриваемыми в данной работе ароматическими лигандами-интерцепторами продемонстрировали отсутствие выраженной специфичности этих лигандов к той или иной форме топотекана. В связи с этим, в настоящей работе было принято $K_{CP} = K_{LP}$. В таблице 1 приведены все необходимые для расчета факторов R_D и A_D константы, определенные ранее в идентичных условиях растворителя. В качестве оценки константы комплексообразования лактонной формы с ДНК использовалась константа связывания с гексамером ДНК, определенная в работе [10] методом ЯМР (см. таблицу 1).

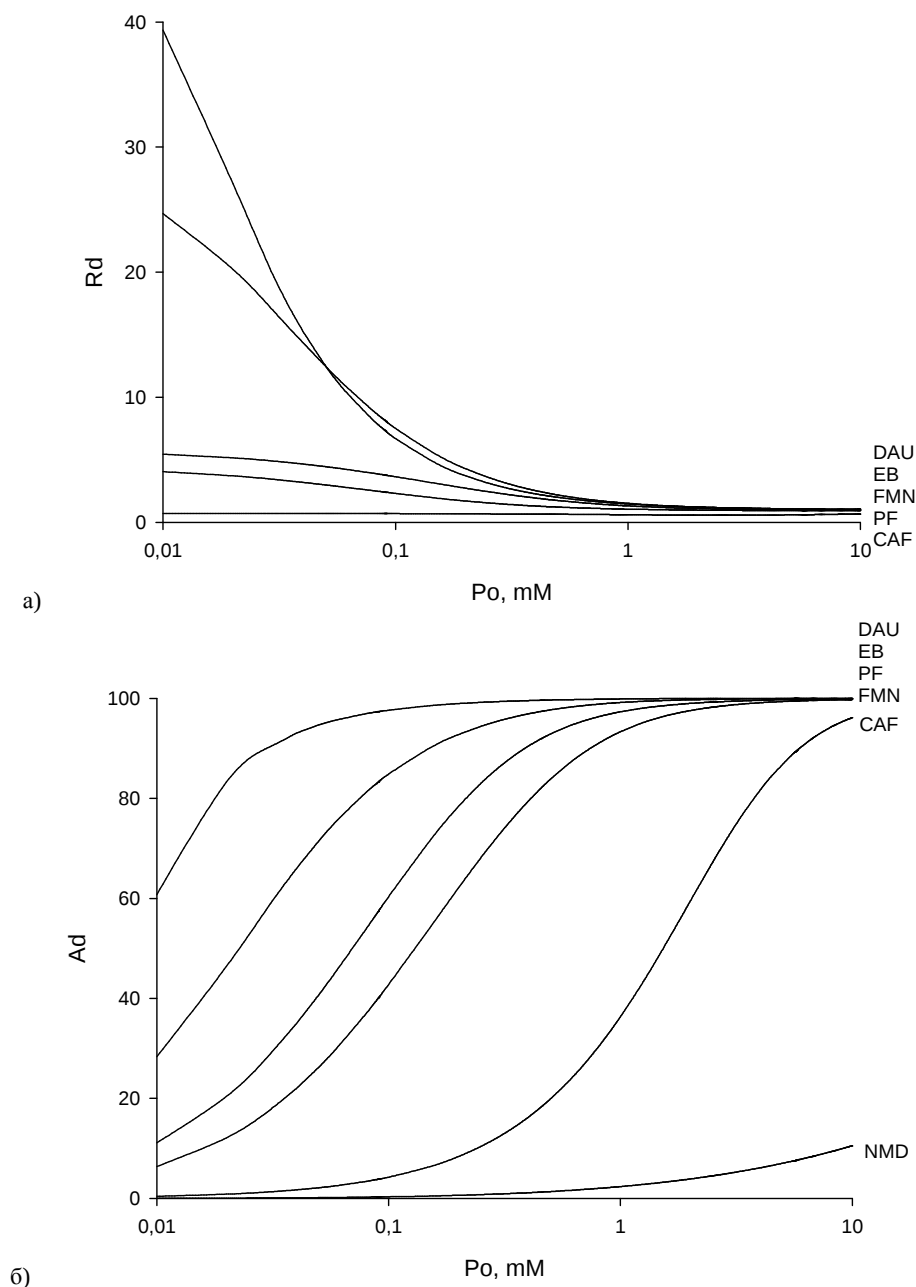
Таблица 1 – Равновесные константы самоассоциации, гетероассоциации и комплексообразования с ДНК (л/моль) для различных ароматических соединений, $T = 298$ К

Лиганд	самоассоциация	гетероассоциация с ТРТ	комплексообразование с ДНК
DAU	720	2000	560000
EB	305	1450	72000
FMN	265	1300	8000
PF	700	3000	15000
CAF	11,8	320	246
NMD	0	45	0
ТРТ	—	—	20000

В качестве полных концентраций компонент смеси L - C - P - N нами использовались квазифизиологические концентрации, определенные в работе [8]: $L_0 + C_0 = 0,01$ mM, $N_0 = 0,01$ mM. Справедливость выбранного значения внутриклеточной концентрации $L_0 + C_0 = 0,01$ mM для производных камптотецина также подтверждается независимым *in vitro* экспериментом [3]. Соотношение лактонной и карбоксилатной форм было установлено на уровне физиологического 1:1 [3].

На рисунке 2 представлены расчетные значения факторов R_D , A_D для всех исследованных комбинаций ТРТ- P . Важно отметить, что варьирование полной концентрации ТРТ в диапазоне 0,001...0,1 mM практически мало сказывается на величине R_D и не превышает 10% в единицах A_D . Это означает, что ошибка в оценке концентрации топотекана, а также соотношения лактонной и карбоксилатной форм при физиологических условиях, не оказывает существенного влияния на оценку эффективности интерцепторного и протекторного механизмов в рамках использованной в данной работе модели, что согласуется с аналогичным заключением и для других ароматических лигандов [8]. Это особенно важно именно для топотекана, поскольку соотношение $L_0:C_0$ и физиологическое значение концентрации L_0 в реальных условиях организма предсказать достаточно сложно в связи с сильным связыванием L формы на белки крови. Влияние вариации N_0 на фактор R_D также незначительно, однако по отношению к A_D имеет двухфазный характер, соответствующий и другим известным комбинациям [8]. В пределах физиологически значимой фазы ($N_0 = 0,01$ mM) увеличение/уменьшение N_0 в несколько раз относительно 0,01 mM также сказывается на изменении A_D в рамках допустимых 10%.

Из анализа кривых на рисунке 2, а следует, что для всех лигандов-интерцепторов, кроме CAF, в физиологическом диапазоне их концентраций $P_0 < 0,1$ mM имеет место доминирование протекторного механизма действия ($R_D > 1$). Этот результат является вполне ожидаемым, поскольку при типичных физиологических концентрациях антибиотиков и мутагенов их межмолекулярное взаимодействие с топотеканом (гетероассоциация) маловероятно, что согласуется с выводами и по другим системам FMN-Лиганд и Антибиотик-Антибиотик, исследованным ранее [8]. Для кофеина наблюдается доминирование интерцепторного механизма $R_D \approx 0,6$ в области типичных mM концентраций CAF, используемых в клеточных экспериментах с ТРТ [6], что означает примерное соотношение протекторного и интерцепторного механизмов как 40:60. В целом, полученный результат согласуется с выводом работы [6]. Однако, как указывалось выше, авторы [6] изначально исключили конкуренцию лигандов за места посадки на ДНК, что равносильно исключению примерно 40% суммарного вытеснения топотекана из ДНК за счет конкуренции, индуцированного введением CAF, и недооценки общего биологического эффекта действия CAF на ТРТ.

Рисунок 2 – Расчетные значения факторов R_D (а) и A_D (б)

Из анализа кривых A_D на рисунке 2б следует, что по степени уменьшения эффективности биологического действия интерцептора на ТРТ все рассмотренные лиганды могут быть поставлены в ряд $DAU \rightarrow EB \rightarrow PF \rightarrow FMN \rightarrow CAF \rightarrow NMD$. Следует, однако, отметить, что такое расположение может иметь биологический смысл и, соответственно, предсказательную силу, только если выполняются следующие условия [8]: 1) проявление биологического эффекта комбинации ТРТ-Р на уровне связывания с ДНК, 2) неспецифическое связывание ТРТ и Р с ДНК, 3) отсутствие интерференции ТРТ и Р по биологической активности. По-видимому, в полной мере указанные три условия выполняются только для FMN, CAF и NMD, для двух из которых (CAF, FMN) существует подтвержденный *in vitro* протекторный эффект по отношению к ТРТ [6,7]. Для других лигандов: DAU, EB, PF расчетный фактор A_D отражает лишь долю общего биологического эффекта, обусловленного связыванием именно ТРТ с ДНК, выделение которого едва ли может быть произведено экспериментально. Важно отметить, что средние точки концентрационного диапазона варьирования FMN и CAF, в пределах которого эти интерцепторы могут оказывать выраженное ($A_D > 15\%$) протекторное действие по отношению к ТРТ, составляют, соответственно, $\sim 0,1$ mM и 1mM, что находится в полном согласии с концентрациями рибофлавина и кофеина, используемых в *in vitro* экспериментах по детектированию изменения биологического эффекта. К сожалению, более подробная «привязка» модели к клеточному эксперименту не представляется

возможной в связи с ограниченностью имеющихся биологических данных. Тем не менее, правильность предсказания активных концентраций интерцептора, при которых следует ожидать протекторный эффект для комбинаций FMN-TPT и CAF-TPT [настоящая работа], а также CAF-Доксорубин и CAF-Новантрон [8], свидетельствует об адекватности используемой модели протекторного/интерцепторного действия *in vitro* условиям.

Заключение

В настоящей работе впервые рассмотрена эффективность механизмов протекторного и интерцепторного действия различных ароматических лигандов на связывание антибиотика топотекана с ДНК. В анализе было учтено существование ТРТ в физиологической среде в двух различных формах: лактонной и карбоксилатной, что потребовало модификации стандартной модели конкурентного связывания лигандов с ДНК. Получены основные уравнения динамического равновесия, позволяющие оценить соотношение интерцепторного и протекторного механизмов (фактор R_D), а также оценить относительно изменение биологического эффекта антибиотика ТРТ (процент вытеснения интерцептором – фактор A_D) при добавлении в систему другого ароматического препарата. Показано, что для всех исследованных систем, за исключением CAF, доминирующим механизмом действия является протекторный, в то время как его вклад в системе CAF-TPT-ДНК составляет лишь 40 % по отношению к интерцепторному механизму. Проведенные расчеты свидетельствуют об адекватности оценок концентраций интерцепторов реальным клеточным условиям, при которых наблюдается протекторный эффект. Полученные результаты могут быть в дальнейшем использованы при планировании биологического эксперимента по совместному действию комбинаций Топотекан-Лиганд на *in vitro* уровне.

Библиографический список использованной литературы

1. Mechanism of action of camptothecin / F.F. Liu [et al] // Ann. N. Y. Acad. Sci. — P. 1–10.
2. Takimoto C.H. Clinical applications of the camptothecins / C.H. Takimoto, J. Wright, S.G. Arbuck // Biochim. Biophys. Acta. — 1998. — Vol. 1400. — P. 107–119.
3. Gabr A. Cellular pharmacokinetics and cytotoxicity of camptothecin and topotecan at normal and acidic pH / A. Gabr, A. Kuin, M. Aalders // Cancer Res. — 1997. — Vol. 57. — P. 4811–4816.
4. Мосунов А.А. Исследование самоассоциации антибиотика топотекана / А.А. Мосунов, С.Н. Си-монова, А.О. Розвадовская // Вестник СевГТУ. Сер. Фізика і математика. — 2007. — Вип. 85. — С. 54–58.
5. In vitro antitumour activity of 9-Nitro-camptothecin as a single agent and in combination with other antitumour drugs / R.J. Bernacki, P. Pera, P. Gambacorta [et al] // Ann. N.Y. Acad. Sci. — P. 293–297.
6. Caffeine prevents apoptosis and cell cycle effects induced by camptothecin or topotecan in HL-60 cells / F. Traganos, J. Kapuscinski, J. Gong [et al] // Cancer Res. — 1993. — Vol. 53. — P. 4613–4618.
7. Протекторное действие витамина B₂ по отношению к антибиотiku топотекану *in vitro* / А.О. Лантушенко [и др.] // Фізика живого. — 2007. — Т. 15. — С. 18–23.
8. Quantitation of the molecular mechanisms of biological synergism in a mixture of DNA-acting aromatic drugs / M.P. Evstigneev [et al] // Biophys. Chem. — 2008. — Vol. 132. — P. 148–158.
9. Topotecan lactone selectively binds to double- and single-stranded DNA in the absence of Topoisomerase I / S. Yao, D. Murali [et al] // Cancer Res. — 1998. — Vol. 58. — P. 3782–3786.
10. Mode of binding of camptothecins to double helix oligonucleotides / S. Mazzini, M.C. Bellucci, S. Dallavalle [et al] // Org. Biomol. Chem. — 2004. — Vol. 2. — P. 505–513.
11. Veselkov A.N. 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. — Vol. 115. — N 5. — P. 2252–2266.

Поступила в редакцию 21.09.2010 г.

Мосунов А.А., Євстигнєєв М.П. Молекулярний механізм дії ароматичних біологічно активних сполук на зв'язування антибіотика топотекана з ДНК

Проведено аналіз протекторного і інтерцепторного механізмів дії ароматичного ліганда на зв'язування антибіотика топотекану з ДНК з урахуванням існування останнього за фізіологічних умов у двох різних формах.

Ключові слова: інтерцепторний, протекторний механізм, топотекан, гетеро асоціація.

Mosynov A.A., Evstigneev M.P. Molecular mechanisms of the action of aromatic biologically active compounds on antibiotic topotecan binding with the DNA

Analysis of protector and interceptor mechanisms of action of aromatic ligand on antibiotic topotecan binding with the DNA is taking into account the existence of the latter one in two forms under physiological conditions.

Keywords: interceptor, protector mechanism, topotecan, hetero-association.