

10. Tinoco J. Hypochromism in polynucleotides. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1960, vol. 82, pp. 4785-4790.
11. Rhodes W. Hypochromism and other spectral properties of helical polynucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, vol. 83, pp. 3609-3617.
12. *Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот* (ред.: Ю.С. Лазуркин). М.: Наука, 1967, 323 с. [*Physical methods of investigation of proteins and nucleic acids* (ed.: Yu.S. Lazurkin). Moscow: Nauka, 1967, 323 p. (In Russ.)]
13. Кантор Ч., Шиммель П. *Биофизическая химия*, т. 2. М.: Мир, 1984, 493 с. [Cantor C., Schimmel P. *Biophysical Chemistry*. Part 2. Moscow: Mir, 1984, 493 p. (In Russ.)]
14. Южаков В.И. Ассоциация молекул красителей и её спектроскопическое проявление. *Успехи химии*, 1979, № 11, с. 207-233. [Yuzhakov V. I. Association of Dye Molecules and Its Spectroscopic Manifestation. *Russ Chem Rev*, 1979, vol. 48, no. 11, pp. 207-233. (In Russ.)]
15. Patil K.J., Pawar R.B., Talap P.D. Self-aggregation of Methylene Blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu₄NBr and urea. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2000, vol. 2, pp. 4313-4317.

СТАТИСТИКО-ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ БАЗИС ТЕОРИИ ИНТЕРЦЕПТОРНО-ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ КОМБИНАЦИЙ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ ПРЕПАРАТОВ

Бучельников А.С.¹, Мосунов А.А.², Головченко И.В.², Евстигнеев В.П.²,
Костюков В.В.², Лантушенко А.О.², Пашкова И.С.², Евстигнеев М.П.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, РФ;

² ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ
e-mail: andrewmosunov@gmail.com

Аннотация. Биологический синергизм, возникающий при введении в биосистему комбинаций биологически активных соединений (БАС), составляет основу некоторых режимов современной химиотерапии онкологических заболеваний. В связи с этим управляемость и предсказуемость отклика биосистемы на комбинации БАС является чрезвычайно важным для стимулирования дальнейшего прогресса в данной области медицинских исследований.

Одними из наиболее изученных групп БАС, демонстрирующих биологический синергизм при совместном использовании, являются ароматические соединения ДНК-направленного действия, механизм биологического действия которых связывают с процессами нековалентного комплексообразования: гетероассоциации препаратов и/или конкуренции за места посадки на ДНК. Если молекулярное комплексообразование лежит в основе наблюдаемого в эксперименте биологического синергизма, то должна существовать количественная взаимосвязь биологических и физико-химических параметров. В явном или неявном виде поиск этой взаимосвязи проводился многими исследователями, что в итоге позволило обнаружить некоторые важные корреляции биологических и физико-химических параметров в различных частных системах, и заложить основы теории интерцепторно-протекторного действия (ИПД).

Целью настоящей работы является построение статистико-термодинамического базиса обобщенной теории интерцепторно-протекторного действия в многокомпонентных системах ДНК-связывающихся БАС.

Ключевые слова: теория интерцепторно-протекторного действия, биологически активные соединения.

STATISTICAL-THERMODYNAMIC BASIS OF INTERCEPTOR-PROTECTOR THEORY FOR COMBINATIONS OF DNA-BINDING DRUGS

Buchelnikov A. S.¹, Mosunov A. A.², Golovchenko I.V.², Evstigneev V. P.²,
Kostjukov V.V.², Lantushenko A. O.², Pashkova I.S.², Evstigneev M. P.^{1,2}

¹ Belgorod National Research University
Pobedy st., 85, Belgorod, 308015, Russia

² Sevastopol State University
Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia
e-mail: andrewmosunov@gmail.com

Abstract. The biological synergism arising when administered in biosystem combinations of biologically active compounds (BAC) is the basis of some modes of modern chemotherapy of cancer. In this regard, manageability and predictability of response of biological systems on a combination of BAC is extremely important to promote further progress in the field of medical research.

One of the most studied groups of BACs showing its biological synergies when used together, are aromatic compounds of DNA-directed action. Their mechanism of biological action is associated with the processes of non-covalent complexation: heteroassociation of drugs and/or competition for DNA landing site. If the molecular complexation is the basis for the observed in the experiment biological synergy, there must be a quantitative relationship between biological and physico-chemical parameters. In either explicitly or implicitly search of this relationship held by

many researchers that eventually allowed revealed some important correlation of biological and physic-chemical parameters in various private systems and to lay the foundations of the theory of interceptor-protector effect (IPE).

The purpose of this paper is to create statistical-thermodynamic basis of the theory of generalized interceptor-protector effect in multicomponent DNA-binding BAC systems.

Key words: interceptor-protector theory, biologically active compounds.

Основные положения обобщенной теории ИПД. Отправной точкой создания обобщенной теории ИПД является представление о гетероассоциации (интерцепторный механизм) и конкуренции за места посадки на ДНК (протекторный механизм) как о двух базовых молекулярных процессах, изменяющих эффективную концентрацию препарата при введении интерцепторов и модулирующих таким образом измеряемый биологический отклик. С учетом этого, разработка статистико-термодинамического базиса теории ИПД производилась на основании наиболее общей модели многокомпонентных взаимодействий в системах Лиганд1 – Лиганд2 – ... – ЛигандN – ДНК без ограничений на константы комплексообразования, концентрации и стехиометрию комплексов

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

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

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

В настоящей работе создана строгая статистико-термодинамическая модель гетероассоциации [1], учитывающая образование молекулярных комплексов произвольного состава и длины и лишенная отмеченных выше недостатков. Ключевым объектом модели является большая статистическая сумма, на основании которой далее могут быть записаны уравнения, связывающие параметры молекулярного равновесия с экспериментально наблюдаемым параметром. Рассматривались два способа вывода модели — с помощью метода трансфер-матриц и метода производящих последовательность функций. Здесь кратко опишем только метод трансфер-матриц, имея в виду, что в работе доказана полная эквивалентность двух подходов при описании молекулярной гетероассоциации в многокомпонентных системах БАС.

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

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

где K_{ij} – равновесная константа ассоциации молекул типа i и j, C_j — молярная концентрация молекул типа j.

Возведение матрицы M в степень $n-1$ позволяет перебрать все возможные комбинации n молекул N различных типов в n-мере. Далее, полученная степень матрицы M может быть использована для получения большой статистической суммы N-компонентной системы:

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

где $\vec{c} = (C_1 \ C_2 \ \cdots \ C_N)$, I – единичная матрица порядка N.

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

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

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

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

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

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

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

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

Если ввести вспомогательные матричные объекты:

$$\vec{K} = \begin{pmatrix} K_{11} & K_{12} & \dots & K_{1N} \\ K_{21} & K_{22} & \dots & K_{2N} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ K_{N1} & K_{N2} & \dots & K_{NN} \end{pmatrix}, \quad \vec{\Delta}_C = \begin{pmatrix} C_1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & C_2 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & C_N \end{pmatrix}, \quad \vec{K}_S = \begin{pmatrix} K_{11} & 0 & \dots & 0 \\ 0 & K_{22} & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & K_{NN} \end{pmatrix},$$

то выражение (5) принимает окончательный вид:

$$\Xi_{\text{corr}} = \frac{1}{2} \vec{I} \left[(\vec{\Delta}_C^{-1} - \vec{K})^{-1} + (\vec{\Delta}_C^{-1} + \vec{K}_S) (\vec{\Delta}_C^{-2} - \vec{K}_d)^{-1} \right] \vec{I}^T. \quad (6)$$

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

$$\vec{\Delta}_T = \frac{1}{2} \left[(\vec{I} - \vec{M})^{-1} \vec{I}^T \vec{I} \vec{\Delta}_C (\vec{I} - \vec{M})^{-1} + (\vec{I} - \vec{M}_d)^{-1} \vec{I}^T \vec{I} \vec{\Delta}_C (\vec{I} + 2\vec{M}_S + \vec{M}_d) (\vec{I} - \vec{M}_d)^{-1} \right]. \quad (7)$$

где $\vec{\Delta}_T$ – диагональная матрица размером $N \times N$, содержащая на главной диагонали общие концентрации соответствующих компонентов системы.

Закон сохранения массы в N-компонентной ДНК-содержащей системе [2] записывается в виде системы N уравнений вида

$$C_i^{(0)} = \frac{\partial \Xi_{\text{corr}}}{\partial \ln C_i} + \theta_i N_0, \quad (8)$$

где $C_i^{(0)}$, C_i – соответственно общая и мономерная концентрации лиганда i-го типа; Ξ_{corr} – большая статистическая сумма N-компонентной системы без ДНК; θ_i – доля сайтов ДНК, занятая молекулами лиганда i-го типа; N_0 – общая концентрация ДНК, выражаемая в моль пар оснований на литр. Для определения долей θ_i система уравнений типа (8) дополняется системой N уравнений МакГи-фон Хиппеля:

$$\theta_i = K_{iN} C_i \left(1 - \sum_{k=1}^N n_k \theta_k \right) \left(\frac{1 - \sum_{k=1}^N n_k \theta_k}{1 - \sum_{k=1}^N (n_k - 1) \theta_k} \right)^{n_i - 1}, \quad (9)$$

где n_i – количество пар оснований в сайте ДНК, занимаемом одной молекулой i-го типа; K_{iN} – равновесная микроскопическая константа комплексообразования лиганда i-го типа с ДНК. Использование уравнений МакГи-фон Хиппеля (9) отражает ключевую особенность обобщенной теории ИПД – учет взаимодействия лигандов с полимерной ДНК.

Расчет факторов R_D и A_D [2,3]. Основу количественной теории ИПД составляет анализ значений так называемых факторов R_D и A_D , вводимых для оценки вкладов протекторного и интерцепторного механизмов в общее взаимодействие интерцепторов с ДНК и вычисляемых по формулам:

$$R_D = \frac{\theta_X^{(0)} - \theta_X^{(C)}}{\theta_X^{(0)} - \theta_X^{(H)}}, \quad A_D = \frac{\theta_X^{(0)} - \theta_X}{\theta_X^{(0)}}, \quad (10)$$

где $\theta_X^{(C)}$ – мольная доля комплексов X-ДНК (под X понимается основной, действующий препарат) при «отключенной» гетероассоциации и «включенном» комплексообразовании всех интерцепторов с ДНК; $\theta_X^{(H)}$ – мольная доля комплексов X-ДНК при «включенной» гетероассоциации и «отключенном» комплексообразовании

всех интерцепторов с ДНК; $\theta_X^{(0)}$ – мольная доля комплексов X-ДНК при «отключенных» гетероассоциации и комплексообразовании всех интерцепторов с ДНК; θ_X – мольная доля молекул препарата X, связанных с ДНК в присутствии молекул интерцепторов при «включенных» гетероассоциации и комплексообразовании. Фактор A_D тождественен измеряемому в биологическом эксперименте изменению некоторого параметра при добавлении интерцепторов (например, доля подвергнувшихся апоптозу клеток, процент мутировавших клеток и пр.), нормированному к значению этого же параметра, но в отсутствии интерцепторов.

Применение теории ИПД к данным биологического эксперимента [4, 5]. Можно выделить два варианта приложения теории ИПД к данным биологического эксперимента *in vitro*:

- 1) точечная оценка A_D , т.е. сравнение фактора A_D для различных препаратов X при фиксированной концентрации интерцепторов Y.
- 2) оценка по зависимости A_D от концентрации интерцептора y_0 .

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

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

Точечная оценка фактора A_D по данным мутагенного теста [5]. Анализ литературных данных указывает на существование фундаментальной взаимосвязи величины измеряемого в мутагенном тесте биологического параметра и величины константы гетероассоциации. В целях проверки адекватности теории ИПД мутагенному тесту были взяты данные по большому числу ароматических мутагенов имидазо-хинолинового типа (IQ) в присутствии молекулы-интерцептора хлорофиллина (CHL), представленные в работе Дэшвуда и Гуо. Согласно современным представлениям, мутагены IQ-типа действуют путем ковалентного связывания с ДНК, что исключает роль протекторного механизма со стороны CHL. Эта ситуация может быть промоделирована в рамках теории ИПД без протекторного механизма. С учетом микромолярных концентраций CHL, использованных в работе Дэшвуда, получена связь измеряемого в биологическом эксперименте параметра I_{50} с константой гетероассоциации K_h в виде:

$$I_{50} = B/K_h \cdot \quad (11)$$

где B – некоторый постоянный множитель. Аппроксимация выражением (10) данных Дэшвуда дает значительно лучшее соответствие эксперименту ($R^2 = 0.94$), чем исходная аппроксимация линейной зависимостью ($R^2 = 0.82$), представленная в цитируемой работе (см. рис. 1).

Полученные результаты указывают на возможность применения теории ИПД к данным мутагенного теста при условии доминирования интерцепторного механизма действия. Выявление фундаментального эффекта действия интерцепторного механизма в форме (10) для мутагенного теста является одним из важных достижений теории ИПД вообще и результатов настоящей работы в частности.

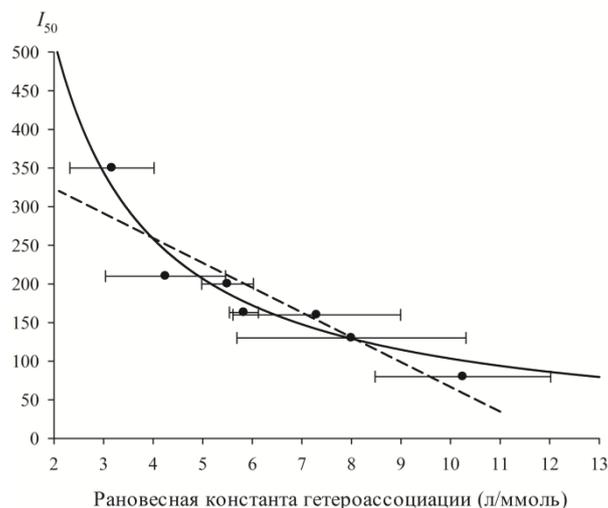


Рисунок 1 – Корреляция значений I_{50} со значениями констант гетероассоциации IQ-CHL: пунктирная прямая – линия регрессии из работы Дэшвуда и Гуо; сплошная кривая – зависимость, рассчитанная по уравнению (10)

Точечная оценка фактора A_D по данным эксперимента на пролифелирующих клеточных линиях [5]. Анализ литературы показал, что практически во всех известных случаях (точечная оценка для систем доксорубин-кофеин, новатрон-кофеин и оценка по концентрационной зависимости в системе топотекан-кофеин) теория ИПД дает хорошее согласие с данными эксперимента на пролифелирующих клеточных линиях в отношении измеряемого биологического параметра, характеризующего изменение цитотоксической активности основного препарата при введении интерцептора. Таким образом, пролифелирующие клеточные линии остаются объектом, наиболее однозначно описываемым в рамках теории ИПД.

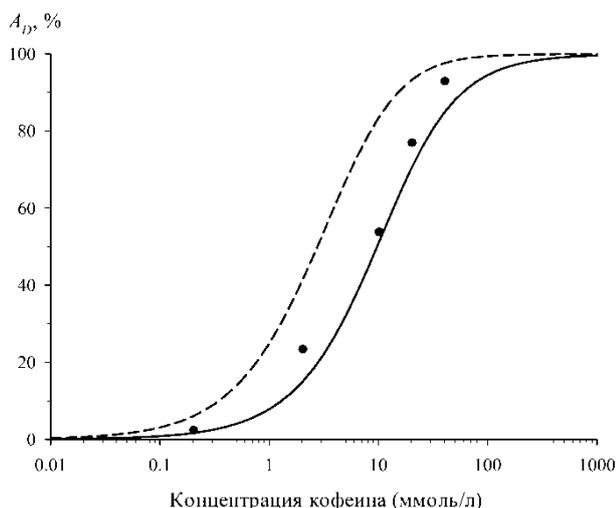


Рисунок 2 – Зависимости фактора A_D в системе IQ-CAF-ДНК от концентрации кофеина: экспериментально пересчитанный A_D , расчет A_D с учетом (пунктирная кривая) и без учета (сплошная кривая) протекторного механизма

Оценка по концентрационной зависимости фактора A_D . С использованием мутагенного теста группа исследователей из Университета Гданьска (Польша) измерили зависимость изменения мутагенной активности ароматических аминов типа IQ в присутствии различных ксантинов, включая кофеин (CAF). На рисунке 2 точками представлены эти данные в пересчете на единицы A_D . Отсутствие учета протекторного механизма приводит к более качественной аппроксимации экспериментальной зависимости $A_D(y_0)$, что согласуется с имеющимися представлениями о механизме действия лигандов IQ-класса.

Заключение.

В настоящей работе дано развитие обобщенной теории интерцепторно-протекторного действия для комбинаций ДНК-связывающихся ароматических БАС в системах Препарат – Интерцептор1 – Интерцептор2 – ... – ДНК. На основании методов трансфер-матриц и производящих последовательность функций получена новая матричная формулировка уравнений закона сохранения массы и наблюдаемого экспериментального параметра в модели многокомпонентной некооперативной гетероассоциации Лиганд1 – Лиганд2 – ... – ЛигандN. Записаны уравнения баланса массы с использованием модели полимерной ДНК в качестве биорецептора. Доказана применимость теории ИПД к количественному описанию данных измерения апоптоза в пролифелирующих клеточных линиях и мутагенности в бактериальных системах, индуцированных комбинациями ароматических БАС. Выявлена функциональная взаимосвязь константы гетероассоциации и наблюдаемого в биологическом эксперименте параметра при условии доминирования интерцепторного механизма действия.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект 15-33-20284).

Список литературы / References:

1. Buchelnikov A.S., Evstigneev V.P., Evstigneev M.P. General statistical-thermodynamical treatment of one-dimensional multicomponent molecular hetero-assembly in solution. *Chem. Phys.*, 2013, vol. 421, pp. 77-83.
2. Buchelnikov A.S., Hernandez Santiago A.A., Gonzalez Flores M., Vazquez Ramirez R., Davies D.B., Evstigneev M.P. General analysis of competitive binding in drug-interceptor-DNA systems. *Eur. Biophys. J.*, 2012, vol. 41, no. 3, pp. 273-283.
3. Buchelnikov A.S., Evstigneev V.P., Rodríguez Oropeza L.E., Evstigneev M.P. On the reliability of quantitation of biological effect in drug-interceptor-DNA systems. *Eur. Biophys. J.*, 2013, vol. 42, no. 4, pp. 315-319.
4. Evstigneev M.P. Quantification of the interceptor action of caffeine on the in vitro biological effect of the anti-tumour agent topotecan. *Eur. Biophys. J.*, 2011, vol. 40, no. 8, pp. 969-980.
5. Buchelnikov A.S., Evstigneev M.P. Quantitative correlation of the in vitro biological effect with parameters of molecular complexation in mutagen-interceptor systems. *J. Theor. Biol.*, 2014, vol. 357, pp. 268-271.