

УДК 577.113:541.49

СТОХАСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ЯМР АНАЛИЗА МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ РАСТВОРОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ АРОМАТИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

М.П. Евстигнеев¹, В.П. Евстигнеев¹, М.В. Шокуров²

¹ Кафедра физики Севастопольского национального технического университета
Севастополь-99053, Украина; e-mail: max_evstigneev@mail.ru

² Морской гидрофизический институт НАН Украины, Севастополь, Украина
Поступила в редакцию 16 февраля 2006 г.

Предложено формализованное описание N -компонентной смеси взаимодействующих ароматических молекул в водном растворе с возможностью расчета наблюдаемого в ЯМР эксперименте протонного химического сдвига каждой из растворенных компонент (N -STOCH модель). На основании N -STOCH модели разработан компьютерный алгоритм расчета динамического равновесия многокомпонентной смеси, адекватность которого эксперименту была протестирована на примере трехкомпонентной смеси антибиотика дауномицина, витамина B_2 и кофеина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гетероассоциация, многокомпонентный раствор, ЯМР, динамическое равновесие.

Ароматические молекулы представляют важный класс фармацевтических препаратов, нашедших широкое применение в медицинской практике. Многие ароматические соединения оказывают свое действие главным образом путем комплексообразования с ядерной ДНК [1]. Взаимодействуя с ДНК, эти вещества нарушают матричный синтез и, как следствие, приводят к изменениям роста и деления клеток. В то же время существуют многочисленные свидетельства того, что присутствие другого ароматического соединения в клетке совместно с данным, может существенно изменять медико-биологический эффект последнего. Так, кофеин и некоторые его производные снижают токсичность ароматических антибиотиков и красителей *in vitro* [2,3]; аналогичный эффект наблюдается для хлорофиллина [4], витамина B_2 [5,6] и некоторых других ароматических соединений.

Помимо описанных выше двухкомпонентных взаимодействий, в последнее время особый интерес приобретают многокомпонентные системы. Примером может служить комбинированная химиотерапия, основу которой составляет смесь более двух типов различных соединений, или фармацевтические препараты, также зачастую изготавливаемые на основе смеси различных соединений [7].

Необходимо отметить, что ароматические молекулы представляют собой плоские гетероциклические структуры, хромофор которых содержит системы сопряженных двойных $C=C$ связей с делокализованными на них π -электронами. Многочисленные исследования поведения ароматических молекул в водном растворе [8-10] указывают на то, что для таких соединений наиболее предпочтительными являются вертикальные стэкинг-взаимодействия хромофоров, приводящие к формированию стопок или агрегатов с числом мономеров в агрегате в общем случае больше двух (ассоциация). Это дает основание предположить, что различные ароматические молекулы могут взаимодействовать друг с другом в клетке (гетероассоциация). Одно из возможных последствий образования гетерокомплексов состоит в снижении концентрации активных мономерных единиц растворенного вещества, способных связываться с ДНК, и тем самым приводить к изменению биологического действия введенного препарата [8,9]. Эффект гетероассоциации предполагается в качестве основного для объяснения синергетических эффектов также и в многокомпонентных смесях биологически активных молекул [11,12]. Таким образом, гетероассоциация ароматических молекул в настоящее время рассматривается как возможный физический механизм изменения биологической активности различных ароматических лекарственных соединений в присутствии других ароматических молекул. Наличие количественной информации о равновесных параметрах такого взаимодействия позволяет рассчитать эффективность гетероассоциации и, соответственно, оценить ожидаемое изменение биологической активности [13,14].

В настоящее время анализ двухкомпонентных смесей ароматических молекул может быть выполнен достаточно строго методом ЯМР с учетом фактически бесконечномерной само- и гетероассоциации на основании Стохастической модели двухкомпонентной гетероассоциации (2-STOCH) [15,16]. Вместе с тем на сегодняшний день не существует метода анализа многокомпонентной смеси с учетом наиболее вероятных реакций само- и гетероассоциации растворенных ароматических компонент. В настоящей работе предлагается обобщенная Стохастическая модель, предоставляющая алгоритм и метод анализа данных ЯМР многокомпонентных смесей ароматических молекул (N -STOCH). Адекватность модели

эксперименту протестирована на примере данных ЯМР трехкомпонентного раствора антибиотика дауномицина, витамина В₂ и кофеина.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Антибиотик дауномицин (DAU, Fluka), витамин В₂ (флавин-мононуклеотид, FMN, Sigma) и кофеин (CAF, Sigma) растворяли в D₂O с изотопной чистотой 99.95% (Sigma) и лиофилизировали. Растворы готовили путем добавления взвешенного количества образца в дейтерированном 0.1 М фосфатном буфере (pD 7.1), содержащем 10⁻⁴ моль/л EDTA. 1М-¹H ЯМР спектры измерены на спектрометре "Bruker DRX" с резонансной частотой 500 МГц. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул в смешанном растворе выполнены при фиксированной концентрации DAU (C_{DAU} = 1.1 mM) и FMN (C_{FMN} = 0.95 mM) и варьируемой концентрации CAF при температуре T=298K (рис.1). Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2 диметил-2-силапентан-5-сульфоуксусной кислоты), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония (ТМА). Методика приготовления образцов и проведения экспериментов описана в [10].

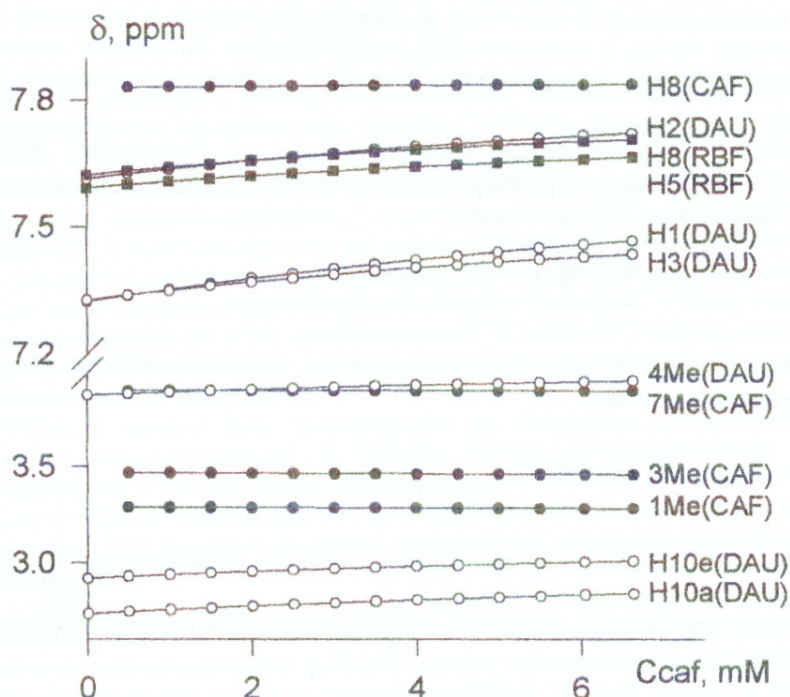


Рис.1 Концентрационные зависимости химических сдвигов протонов DAU, FMN и CAF в 0.1M Na-фосфатном буфере, pD 7.1, T=298K

СТОХАСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ЯМР АНАЛИЗА МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ СМЕСИ

Базовая идея Стохастической модели двухкомпонентных взаимодействий [15,16] (2-STOCH) заключалась в рассмотрении произвольного гетерокомплекса из L молекул, образованного агрегатами двух типов ароматических веществ X и Y , в качестве двоичного числа, в котором каждый бит может принимать значение 0 или 1, соответственно типу вещества X или Y . При таком подходе цикл от 0 до 2^L-1 фактически означает генерирование всех возможных типов комплексов длиной L в растворе. Далее для каждого сгенерированного комплекса на основании закона действия масс рассчитывается его концентрация и химический сдвиг, которые затем суммируются по всем комплексам, позволяя рассчитать результирующий химический сдвиг и концентрацию обоих растворенных веществ X и Y .

Описанный алгоритм оперирует двоичным числом как аналогом произвольного гетерокомплекса в растворе и по своей сути является двоичным. Переход к многокомпонентной системе, содержащей N взаимодействующих ароматических соединений, создает намного более сложное распределение типов гетерокомплексов в растворе. Очевидно, что в произвольной позиции случайно выбранного гетерокомплекса может находиться любое из N веществ, т.е. каждый «бит» гетерокомплекса в N -компонентной системе может принимать значения от 0 до $N-1$. Фактически это означает, что в N -компонентной системе произвольный гетерокомплекс эквивалентен числу в системе счисления с основанием N . В упрощенной формулировке это равносильно тому, что для реализации алгоритма N -

STOCH модели достаточно базовый алгоритм 2-STOCH модели [15,16] перевести в общем случае в систему счисления с основанием N . Дадим формализованное описание N -STOCH модели с возможностью дальнейшего построения на ее основе компьютерного алгоритма обработки данных ЯМР сложной N -компонентной смеси взаимодействующих ароматических молекул.

Рассмотрим многокомпонентный раствор, содержащий N типов ароматических молекул. Молекулы ассоциируют в водном растворе, образуя в общем случае комплексы с любым чередованием гетеро- и гомостыков. Рассмотрим произвольный комплекс, состоящий из L молекул. Поставим в соответствие этому комплексу вектор $\mathbf{H} = (I_L, I_{L-1}, K, I_1, K, I_1)$. Любая составляющая I_i вектора \mathbf{H} может принимать значения $I \in (0 \dots N-1)$ и обозначает тип i -й компоненты комплекса. Введем также понятие «отраженного» комплекса $\bar{\mathbf{H}} = (I_1, I_2, K, I_1, K, I_L)$ с инвертированной последовательностью элементов.

Введем в рассмотрение квадратную матрицу $\Delta\delta$ размерности $N \times N$, которая содержит индуцированные химические сдвиги протонов молекул по номеру строки, находящихся в комплексе с молекулами по номеру столбца. Значения индуцированных химических сдвигов, лежащих на главной диагонали, соответствуют экранированию в гомостыке, остальные – экранированию в гетеростыке. Аналогичным образом, введем матрицу \mathbf{K} вида $N \times N$, содержащую равновесные константы ассоциации между молекулами по номеру строки и молекулами по номеру столбца. На главной диагонали лежат константы самоассоциации молекул; недиагональные элементы матрицы соответствуют константам гетероассоциации.

Введем вектора $\mathbf{C}^m = (C_0^m, C_1^m \dots C_{N-1}^m)$ и $\mathbf{C}^t = (C_0^t, C_1^t \dots C_{N-1}^t)$, содержащие мономерные и общие концентрации всех типов молекул в растворе соответственно. С учетом этого закон сохранения массы для молекул типа I может быть записан в виде:

$$C_I^t = \sum_{L=1}^{\infty} \left(\sum_{I_1=0}^{N-1} K \sum_{I_L=0}^{N-1} \left(f^H C^H \sum_{i=1}^L f_I(i) \right) \right), \quad (1)$$

где функция $f_I(i)$ является функцией включения, позволяющая проводить выборку молекул только заданного типа I при выполнении условий

$$f_I(i) = \begin{cases} 1, & I_i = I \\ 0, & I_i \neq I \end{cases}$$

и соответственно рассчитать общее количество молекул типа I в данном комплексе как $\sum_{i=1}^L f_I(i)$;

C^H - концентрация текущего комплекса \mathbf{H} в растворе, которая может быть определена согласно закону действующих масс:

$$C^H = C_{I_1}^m \prod_{j=1}^{L-1} K_{I_j, I_{j+1}} C_{I_{j+1}}^m. \quad (2)$$

Записанная в выражении (1) функция f^H служит для исключения из результата суммирования слагаемых, соответствующих т.н. «отраженным» гетерокомплексам, которые являются физически неразличимыми в растворе (см. более подробное обсуждение в работе [17]). Ранее в двухкомпонентной стохастической модели [16] «отраженные» комплексы исключались алгоритмически путем применения специальной процедуры инвертирования к текущему гетерокомплексу и последующего сравнения числового эквивалента исходного и «отраженного» комплексов. В настоящей работе указанная процедура «отражения» может быть обобщена на случай N -компонентного гетерокомплекса следующим образом: для определения «отраженного» комплекса находится числовой эквивалент текущего \mathbf{H} и «отраженного» $\bar{\mathbf{H}}$ гетерокомплексов в десятичной системе счисления – H_{10} и \bar{H}_{10} соответственно – путем обычного перевода числа из системы счисления с основанием N в десятичную систему:

$$\begin{cases} H_{10} = \sum_{j=1}^L I_j N^{j-1} \\ \bar{H}_{10} = \sum_{j=1}^L I_{L-j+1} N^{j-1} \end{cases} \quad (3)$$

На основании выражения (3) и работы [16], функция f^H может быть записана в виде:

$$f_H = \begin{cases} 1, & H_{10} \leq \underline{H}_{10} \\ 0, & H_{10} > \underline{H}_{10} \end{cases}$$

С учетом введенных обозначений суммарный индуцированный химический сдвиг D_H^I молекулы типа I в комплексе H_i может быть определен путем последовательного вычитания из мономерного химического сдвига δ_{mi} величин индуцированного химического сдвига, создаваемого молекулой «справа» ($\Delta\delta_{I^i I^{i+1}}$) и «слева» ($\Delta\delta_{I^{i-1} I^i}$) от данной:

$$D_H^I = \delta_{mi} - \sum_{l=1}^{i-1} f_l(i) \Delta\delta_{I^l I^{l+1}} - \sum_{l=i+1}^L f_l(L+1-i) \Delta\delta_{I^{L+1-i} I^{L+1-i-2}} \quad (4)$$

С учетом (4) результирующий химический сдвиг молекулы типа I в растворе в условиях быстрого обмена в масштабе времени ЯМР запишется в виде

$$\delta_I^I = \frac{1}{\infty} \sum_{N=1}^{\infty} \sum_{N=1}^{\infty} C_I^{I=0} \sum_{N=1}^{\infty} K \sum_{N=1}^{\infty} f_H C_H D_H^I \quad (5)$$

Уравнения (1) и (5) составляют основу Стохастической модели N-STOCH многокомпонентного равновесия взаимодействующих ароматических веществ. Удобство предложенного формализованного описания заключается в возможности непосредственного программирования указанных уравнений с целью создания компьютерного алгоритма обработки данных ЯМР по аналогии с алгоритмом 2-STOCH модели [15,16]. При этом функции включения f^H и f^I программируются в виде операций сравнения, а суммы в выражениях (1),(5) программируются как циклы. Общий алгоритм обработки данных ЯМР по N-STOCH модели аналогичен описанным ранее моделям двухкомпонентной гетеросоциации [9,15-17] и включает в себя решение системы уравнений (1) относительно вектора C^m и далее подгонки расчетного химического сдвига по формуле (5) к экспериментальному. В качестве входных данных используются матрицы хим.сдвигов $\Delta\delta$ и констант K , вектор суммарных концентраций C^i и концентрационная зависимость протонного химического сдвига.

Алгоритм N-STOCH модели был протестирован на логическое соответствие и физическое соответствие гетеросоциации. В частном случае двухкомпонентной смеси N-STOCH алгоритм должен приводить к тем же самым результатам, что и 2-STOCH модель. Расчет параметров гетеросоциации по N-STOCH модели при $N=2$ для трех произвольно выбранных двухкомпонентных систем, представленных в [15], привел к абсолютно аналогичным результатам, полученным в этой работе по двухкомпонентной модели.

Физическое соответствие гетеросоциации в многокомпонентной системе было протестировано на примере данных ЯМР трехкомпонентной смеси дауномицина, витамина B₂ и кофеина (рис.1). В качестве критерия адекватности N-STOCH модели использовалось значение функции невязки Δ (сумма квадратов отклонений) между экспериментальными точками (рис.1) и этими же точками, рассчитанными по N-STOCH модели при $N=3$. По значению функции невязки может быть рассчитано среднее отклонение расчетной и экспериментальной кривой в пересчете на одну точку в единицах химического сдвига ($\Delta\delta = \sqrt{\Delta/n}$, где n – количество экспериментальных точек). В качестве входных данных 3-STOCH модели также используются значения равновесных констант самосоциации DAU/FMN/CAF, констант двухкомпонентной гетеросоциации DAU-FMN, DAU-CAF, FMN-CAF, предельных и индуцированных химических сдвигов в составе само- и гетерокомплексов. Все необходимые параметры были получены ранее в идентичных экспериментальных условиях в одно- и двухкомпонентных растворах [9,18-20].

В результате проведенных расчетов с учетом максимальной порешности констант само- и гетеросоциации (~20%), а также порешности индуцированного химического сдвига (~0.1ppm), было получено отклонение на точку не хуже чем 0.01ppm по протонам DAU и 0.005ppm по протонам FMN. Полученные значения ошибки соответствуют порешности ЯМР эксперимента для данных соединений, что свидетельствует, во-первых, об адекватности N-STOCH модели многокомпонентной системе взаимодействующих ароматических соединений, а во-вторых, о возможности использования параметров гетеросоциации, полученных из расчета одно- и двухкомпонентных растворов, для анализа многокомпонентной смеси ароматических веществ.

Выражаем благодарность Королевскому Обществу Великобритании (Royal Society) за предоставляемый грант (EMII) на проведение ЯМР исследований в Беркбек колледже.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gale E.F., Cundliffe E., Reynolds P.E., Richmond M.H., Waring M.J. The molecular basis of antibiotic action - 2nd ed. - L.: John Wiley, 1981. 500p.
2. Traganos F., Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z. // *Cancer Res.* 1991. V.51. P.3682.
3. Bedner E., Du L., Traganos F., Darzynkiewicz Z. // *Cytometry.* 2001. V.43. P.38.
4. Dashwood R., Negishi T., Hayatsu H., Breinholt V., Hendricks J., Bailey G. // *Mutat.Res.* 1998. V.399. P.245.
5. Wood A.W., Sayer J.M., Newmark H.L., Yagi H., Michaud D.P., Jerina D.M., Conney A.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V.79. P.5122.
6. Raiczuk G.B., Pinto J. // *Biochem. Pharm.* 1988. V.37. P.1741.
7. Chu E., DeVita V.T. *Physicians' cancer chemotherapy drug manual.* L.: Jones and Bartlett Publ., 2003. 512p.
8. Larsen R.W., Jasuja R., Hetzler R., Muraoka P.T., Andrada V.G., Jameson D.M. // *Biophys. J.* 1996. V.70. P.443.
9. Davies D.B., Veselkov D.A., Djimant L.N., Veselkov A.N. // *Eur. Biophys. J.* 2001. V.30. P.354.
10. Davies D.B., Djimant L.N., Veselkov A.N. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1996. V.92. P.383.
11. Ribeiro L., Carvalho R.A., Ferreira D.C., Veiga F.J.B. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005. V.24. P.1.
12. Evstigneev M.P., Evstigneev V.P., Hernandez Santiago A.A., Davies D.B. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006 (in proofs).
13. Evstigneev M.P., Mykhina Yu.V., Davies D.B. // *Biophys. Chem.* 2005. V.118. P.118.
14. Evstigneev M.P., Rybakova K.A., Davies D.B. // *Biophys. Chem.* 2006 (in proofs).
15. Веселков А.Н., Евстигнеев М.П., Рогова О.В., Чубаров А.С., Дэвис Д.Б. // *Биофизика.* 2004. Т.49. С.587.
16. Evstigneev M.P., Davies D.B., Veselkov A.N. // *Chem. Phys.* 2006. V.321. P.25.
17. Veselkov A.N., Evstigneev M.P., Veselkov D.A., Davies D.B. // *J.Chem.Phys.* 2001. V.115. P.2252.
18. Итон Р.Дж., Веселков Д.А., Барановский С.Ф., Осетров С.Г., Дымант Л.Н., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н. // *Хим.физика.* 2001. Т.9. С.98.
19. Евстигнеев М.П., Розвадовская А.О., Чубаров А.С., Эрнандес Сантьяго А.А., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н. // *Журн.структур.химии.* 2005. Т.46. С.70.
20. Евстигнеев М.П., Розвадовская А.О., Эрнандес Сантьяго А.А., Мухина Ю.В., Веселков К.А., Рогова О.В., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н. // *Физ.химия.* 2005. Т.79. С.673.