

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

УДК 577.113

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕОРИИ ИНТЕРЦЕПТОРНО-ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ
К ДАННЫМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА *IN VITRO*А.С. Бучельников¹, В.А. Рубакина², А.А. Мосунов², М.П. Евстигнеев^{1,2*}¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
ул. Победы, 85, Белгород 308015, Россия;² Севастопольский национальный технический университет,
ул. Университетская, 33, Севастополь 99053, Украина.

e-mail: max_evstigneev@mail.ru

Поступила в редакцию 26 ноября 2013 года

Принята 11 декабря 2013 года

Целью настоящей работы является выяснение возможности применения теории интерцепторно-протекторного действия (ИПД) к опубликованным к настоящему времени количественным данным биологического эксперимента *in vitro* при совместном использовании различных ДНК-связывающихся лигандов. Дана четкая формулировка основных допущений теории ИПД. Рассмотрены способы оценки биологического эффекта (точечная оценка и оценка по концентрационной зависимости фактора A_D). Обнаружено согласие теории ИПД в отношении данных мутагенного теста и данных эксперимента на пролиферирующих клеточных линиях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гетероассоциация, ДНК, интерцепторное действие, мутаген, протекторное действие.

ЗАСТОСУВАННЯ ТЕОРІЇ ІНТЕРЦЕПТОРНО-ПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ ДО ДАНИХ
БІОЛОГІЧНОГО ЕКСПЕРИМЕНТУ *IN VITRO*А.С. Бучельников¹, В.О. Рубакіна², А.О. Мосунов², М.П. Євстигнєєв^{1,2*}¹ Білгородський державний національний дослідницький університет, вул. Побіди, 85, Білгород 308015, Росія;² Севастопольський національний технічний університет, вул. Університетська, 33, Севастополь 99053, Україна

Метою цієї роботи є з'ясування можливості застосування теорії інтерцепторно-протекторної дії (ІПД) до опублікованих на теперішній час кількісним даними біологічного експерименту *in vitro* при спільному використанні різних ДНК-зв'язуючих лігандів. Дано чітке формулювання основних припущень теорії ІПД. Розглянуто способи оцінки біологічного ефекту (точкова оцінка та оцінка по концентраційній залежності фактора A_D). Виявлено погодження теорії ІПД з експериментом у відношенні даних мутагенного тесту і даних експерименту на клітинних лініях, що проліферують.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гетероасоціація, ДНК, інтерцепторна дія, мутаген, протекторна дія.

APPLICATION OF THE THEORY OF INTERCEPTOR-PROTECTOR ACTION TO *IN VITRO*
BIOLOGICAL EXPERIMENTA.S. Buchelnikov¹, V.A. Rubakina², A.A. Mosunov², M.P. Evstigneev^{1,2*}¹ Belgorod National Research University, 85 Pobedy street, Belgorod 308015, Russia;² Sevastopol National Technical University, 33 Universitetskaya street, Sevastopol 99053, Ukraine.

The purpose of this paper is to ascertain whether the theory of interceptor-protector action (IPA) can be applied to quantitation of the so far published data of biological experiments *in vitro* regarding the cases when different DNA-binding ligands are administered simultaneously. The basic assumptions of the IPA theory were clearly formulated. Two different ways for estimation of biological effect were considered (viz. point estimation and estimation using concentration dependence of the A_D factor). It was found that the IPA theory agrees with data from mutagenic test and the data from the experiment in proliferating cell lines.

KEYWORDS: hetero-association, DNA, interceptor action, mutagen, protector action.

Биологический синергизм, возникающий при совместном использовании различных биологически активных ароматических соединений (БАС), известен достаточно давно. Типичными и наиболее хорошо описанными в литературе комбинациями БАС являются смеси ДНК-связывающихся ароматических противоопухолевых антибиотиков с кофеином, ароматическим витамином рибофлавином или хлорофиллином (см. обзор [1]). Считается, что введение в биосистему некоторого ароматического препарата (например, антибиотика) одновременно с другим ароматическим соединением, называемым интерцептором (например, кофеином или витамином), может использоваться для оперативной регуляции уровня токсичности антибиотика при химиотерапии, либо, в отдельных случаях, приводить к усилению медико-биологического эффекта антибиотика [2,3].

Многочисленные исследования, проведенные к настоящему времени преимущественно на *in vitro* уровне различными научно-исследовательскими группами, указывают на то, что механизм синергизма в системах Препарат-Интерцептор-ДНК может быть интерпретирован на уровне образования невалентных комплексов в такой смеси, а именно, гетероассоциации Препарат-Интерцептор и комплексообразования Препарат-ДНК и Интерцептор-ДНК [1]. Эти взаимодействия лежат в основе двух фундаментальных молекулярных механизмов биологического синергизма при комбинированном использовании ДНК-связывающихся БАС: интерцепторного (гетероассоциация Препарат-Интерцептор) и протекторного (конкуренция Препарата и Интерцептора за места посадки на ДНК), впервые сформулированных в работе [4]. Следствием этого явилась серия физико-химических и биологических исследований различных комбинаций ароматических БАС, интенсивно проводимых и в настоящее время.

Первое количественное физико-химическое исследование трехкомпонентных смесей Препарат-Интерцептор-ДНК было выполнено в работах [5-8] украинской группой исследователей с использованием тетрамерной модели ДНК (тетрануклеотидов в качестве модели ДНК) и полным учетом интерцепторного и протекторного механизмов. Чуть позже объединенной польско-американской группой аналогичный анализ был проведен уже на уровне полимерной ДНК, но без учета протекторного механизма [9-11]. Принципиальным недостатком этих исследований являлось отсутствие количественной связи с биологическим экспериментом, который впервые был устранен в работах украинской группы, сначала на тетрамерной модели ДНК [12-17], а затем и на полимерной ДНК [18] с полным учетом как интерцепторного, так и протекторного механизмов. Количественное описание биологического эффекта на основании параметров физико-химического взаимодействия в системе Препарат-Интерцептор-ДНК составляет основу теории интерцепторно-протекторного действия (ИПД), наиболее полно описанной в работах [1,15]. К настоящему времени апробация теории ИПД была успешно проведена на примере данных биологического эксперимента для антибиотиков доксорубина (DOX), митоксантрона (NOV) и топотекана (TPT) в присутствии кофеина (CAF) [15,17], а также позволила предсказать синергизм в системах TPT-Рибофлавин [19] и DOX-Фуллерен [20].

Следует отметить, что во всех процитированных работах использовались *in vitro* данные исключительно на пролиферирующих лейкемических клеточных линиях, однако к настоящему времени накоплен уже достаточный экспериментальный материал и на других клеточных системах, допускающий анализ в рамках теории ИПД. В связи с этим целью настоящей работы является изучение возможности распространения теории ИПД к описанию опубликованных к настоящему времени

количественных данных биологического эксперимента *in vitro* при совместном использовании различных ДНК-связывающихся ароматических БАС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общий подход к описанию данных биологического эксперимента в рамках теории ИПД

Пусть X — основной лиганд (Препарат), определяющий измеряемый *in vitro* биологический эффект, а Y — лиганд-интерцептор. Обобщение результатов развития теории ИПД и опыта ее применения позволяет сформулировать пять базовых допущений данной теории:

- 1) биологическая активность лиганда X преимущественно обусловлена комплексообразованием с ядерной ДНК, причем измеряемый *in vitro* биологический эффект пропорционален доле комплексов f_C^X X -ДНК;
- 2) биологический синергизм комбинации препаратов X - Y проявляется при одновременном введении в биосистему, т.е. в смеси, либо любым другим способом, при котором достигается одновременное присутствие X и Y в окрестности ДНК;
- 3) собственный биологический эффект лиганда-интерцептора Y отсутствует, либо не интерферирует с эффектом лиганда X ;
- 4) комплексообразование X - Y (гетероассоциация) и X -ДНК, Y -ДНК носит нековалентный характер, при этом интерцептор не демонстрирует выраженной специфичности к нуклеотидной последовательности ДНК;
- 5) равновесные константы комплексообразования X - Y , X -ДНК, Y -ДНК, измеренные в отдельных физико-химических экспериментах в условиях, близких к физиологическим, могут быть перенесены на условия *in vitro* эксперимента в биосистеме; концентрации компонент X , Y и сайтов связывания X на ДНК соответствуют так называемым квазифизиологическим условиям [15,17].

Следствием пяти описанных допущений является представление о гетероассоциации X - Y (интерцепторный механизм) и конкуренции X и Y за места посадки на ДНК (протекторный механизм) как базовых молекулярных процессах, изменяющих долю комплексов f_C^X при введении интерцептора, и, следовательно, модулирующих измеряемый биологический отклик.

Ключевой величиной в теории ИПД является так называемый фактор A_D , представляющий собой количественную меру изменения биологического эффекта лиганда X при добавлении интерцептора Y , и вычисляемый как изменение доли комплексов X -ДНК в присутствии Y :

$$A_D = \frac{f_{C(0)}^X - f_C^X}{f_{C(0)}^X}, \quad (1)$$

где $f_{C(0)}^X$ — мольная доля комплексов X -ДНК в отсутствии интерцептора. В такой формулировке фактор A_D оказывается тождественным измеряемому в биологическом эксперименте изменению некоторого параметра при добавлении интерцептора (например, доля подвергнувшихся апоптозу клеток, процент мутировавших клеток и пр.), нормированному к значению этого же параметра, но в отсутствии интерцептора (т.е. контроль в биологическом эксперименте). Примеры пересчета измеряемого биологического параметра в единицы A_D представлены в работах [15,17]. Расчет величины A_D с использованием выражения (1) требует знания мольных долей f_C^X

комплексов X-ДНК, которые могут быть найдены из решения системы уравнений баланса массы в трехкомпонентной смеси X-Y-ДНК, представленных в работах [15,18].

Обобщая опубликованный к настоящему времени экспериментальный материал, 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 лигандов X при фиксированной концентрации Y [15]. Точечная оценка возможна только в том случае, когда измерение A_D для разных лигандов произведено в идентичных экспериментальных условиях. Как правило, при таком подходе удобно пользоваться приближенным тождеством (2), отражающим эмпирически установленный факт того, что расположенные в порядке возрастания значения относительных изменений биологического эффекта набора лигандов X (которые экспериментально измерены при добавлении одного и того же интерцептора Y), совпадают с рядом чисел K_h^2/K_{XN} [15]:

$$A_D \equiv \frac{K_h^2}{K_{XN}}, \quad (2)$$

где K_h , K_{XN} — равновесные константы гетероассоциации X-Y и комплексообразования X-ДНК соответственно.

- 2) оценка по зависимости A_D от концентрации интерцептора y_0 [17]. Производится путем расчета функции $A_D(y_0)$ из решения системы уравнений баланса массы.

Рассмотрим далее конкретные применения теории ИПД к данным биологического эксперимента *in vitro*.

Вся совокупность известных нам опубликованных данных биологического эксперимента *in vitro*, в первом приближении удовлетворяющих пяти сформулированным выше допущениям и двум вариантам приложения теории ИПД к биосистеме, является достаточно ограниченной, и условно может быть разбита на две группы:

- 1) измерение цитостатического или цитотоксического эффекта действия лиганда X в присутствии Y на пролиферирующих клеточных линиях (например, [2,4]);
- 2) измерение мутагенной активности лиганда X в присутствии Y, как правило, в бактериальных системах (например, [21-24]).

Ниже проведен анализ экспериментальных данных, представленных в процитированных работах, в рамках теории ИПД.

Точечная оценка по данным мутагенного теста

Исходным биологическим основанием для разработки теории ИПД являлись эксперименты на лейкемических клеточных линиях по регистрации цитотоксического эффекта различных ароматических БАС [1,12,15]. Сравнительно недавно впервые был использован мутагенный тест на светящихся бактериях штамма *Vibrio harveyi* по регистрации биологического синергизма в системах Препарат-Ксантин [21-24], продемонстрировавший протекторный эффект ксантинов и качественно подобный такому же эффекту, зафиксированному ранее на клеточных линиях [2,4]. В качестве первичной оценки воспользуемся данными работы [23] на штамме *Vibrio harveyi* для систем DOX-CAF и NOV-CAF, допускающих качественное сравнение с результатами в этих же системах, но на клеточных линиях из работы [2] (точечная оценка). Согласно данным [23], пересчитанным в единицы A_D , введение CAF одновременно с DOX и NOV вызывает снижение мутагенной активности антибиотиков на

$$A_D^{\text{exp}}(\text{DOX}) = \frac{47.5 - 1.25}{47.5} \cdot 100\% = 97\% \quad \text{и} \quad A_D^{\text{exp}}(\text{NOV}) = \frac{52.5 - 12}{52.5} \cdot 100\% = 77\%$$

соответственно, т.е. DOX более чувствителен к добавлению CAF, чем NOV. Аналогичный расчет по данным клеточного эксперимента [2] дает

$$A_D^{\text{exp}}(\text{DOX}) = \frac{74 - 35}{74} \cdot 100\% = 53\% \quad \text{и} \quad A_D^{\text{exp}}(\text{NOV}) = \frac{52 - 17}{52} \cdot 100\% = 67\%, \quad \text{т.е. DOX}$$

оказывается менее чувствительным, чем NOV. Таким образом, имеет место качественное различие результатов мутагенного теста и эксперимента на клеточных линиях. При этом применение теории ИПД как для строгого (из решения уравнений баланса массы), так и эмпирического (из формулы (2)) расчета A_D с использованием данных [2] и [23] во всех случаях дает $A_D(\text{NOV}) > A_D(\text{DOX})$, т.е. полностью согласуется с данными клеточного эксперимента (расчет производился с использованием экспериментальных концентраций антибиотиков и интерцептора, а также констант комплексообразования, полученных ранее различными авторами в работах [15,23]). Из сказанного можно сделать вывод, что применение представлений об интерцепторно-протекторном механизме в отношении данных мутагенного теста *Vibrio harveyi*, по-видимому, не является вполне корректным. Выясним, в какой мере такое утверждение является однозначным.

Напомним, что теория ИПД основывается на допущении о действии лиганда X именно на уровне ДНК (см. выше — допущение 1), что практически можно считать общепризнанным в отношении цитотоксического действия DOX и NOV в клеточных линиях [2,4]. Достаточно низкие концентрации антибиотиков, используемые в мутагенном тесте, являются нетоксическими, а механизм мутаций до конца невыяснен. Если мутагенная активность не обусловлена невалентным комплексообразованием X с ДНК, то и представления об интерцепторно-протекторном действии на уровне ДНК формально неприменимы, что может объяснить несоответствие результатов теории ИПД и мутагенного теста. Однако, как будет показано ниже, при условии доминирования интерцепторного механизма роль допущения 4 в теории ИПД становится малозначимой, и данные мутагенного теста становятся вполне интерпретируемыми в рамках теории ИПД.

Очевидно, что интерцепторный механизм (гетероассоциация) не зависит от вида биорецептора и характера связывания лигандов с ним. Фактически данное представление неявно заложено в высказываемую авторами работ [21-24] гипотезу о том, что именно гетероассоциация ответственна за наблюдаемое снижение мутагенной активности X в присутствии Y . Эта ситуация является частным случаем теории ИПД, при котором в системе действует только интерцепторный механизм, а протекторный отсутствует (т.е. константа связывания интерцептора с ДНК K_{YN} в системе уравнений баланса массы обнуляется). Остановимся на этом случае более подробно.

Допущение о доминировании интерцепторного механизма в регистрируемых в мутагенном тесте биологических эффектах [21-24] дает основание предположить наличие корреляции относительного снижения мутагенной активности X в присутствии Y (т.е. экспериментально измеряемый фактор A_D^{exp}) с константой гетероассоциации K_h для различных комбинаций X - Y . Отметим, что существование подобной корреляции давно выявлено в системах Мутаген (X) — Хлорофиллин (Y), для которых интерцепторный механизм снижения мутагенной активности вещества X является общепризнанным [25]. Судя по данным мутагенного теста [21], такая корреляция на качественном уровне действительно может иметь место в отношении лигандов ICR170 и ICR191, а именно: полное подавление мутагенной активности ICR191 наблюдается

при меньшей концентрации CAF (0.5 mM), чем в случае ICR170 (2.5 mM) (при примерно одинаковых концентрациях обоих мутагенов), что согласуется с рядом констант K_h (ICR191-CAF) $>$ K_h (ICR170-CAF). Если формально положить значение константы K_{XN} одинаковой для ICR191 и ICR170, то аналогичная корреляция фактора A_D с K_h напрямую вытекает и из выражения (2) теории ИПД. Все сказанное выше указывает на существование фундаментальной взаимосвязи величины измеряемого в мутагенном тесте биологического параметра и величины константы гетероассоциации.

Наиболее значимой, на наш взгляд, проверкой адекватности теории ИПД мутагенному тесту являются данные по большому числу ароматических мутагенов имидазо-хинолинового (IQ) типа в присутствии молекулы-интерцептора хлорофиллина (CHL), представленные в работе Дэшвуда [25] в форме зависимости концентрации CHL I_{50} , необходимой для 50%-ного подавления мутагенной активности вводимого препарата (т.е. $A_D^{exp} = 1/2$), от константы гетероассоциации K_h (рис. 1), и допускающие точечную оценку в рамках теории ИПД. Механизм мутагенного действия ароматических аминов IQ-типа, как правило, интерпретируется как следствие образования ковалентных комплексов с ДНК [26,27], что противоречит допущению 4 теории ИПД. Вместе с тем, ковалентное связывание X-ДНК также подразумевает отсутствие конкуренции Y и X за ДНК (т.е. отсутствие протекторного механизма). Именно эта ситуация может быть формально промоделирована в рамках теории ИПД, если в уравнениях баланса массы положить $K_{YN} = 0$ (т.е. исключить протекторный механизм). Соответствующее упрощение исходных уравнений баланса массы теории ИПД, приведенных в работе [15], дает следующую систему уравнений:

$$\begin{cases} x_1 + K_h x_1 y_1 + \frac{K_{XN} x_1}{1 + K_{XN} x_1} N_0 = x_0, \\ y_1 + K_h x_1 y_1 = y_0 \end{cases}, \quad (3)$$

где x_1 , y_1 — мономерные концентрации мутагена (X) и хлорофиллина (Y); x_0 , y_0 , N_0 — соответственно общие концентрации веществ X, Y и ДНК. Система (3) может быть переписана в виде алгебраического уравнения третьей степени:

$$\begin{aligned} & K_h K_{XN} x_1^3 + (K_h + K_{XN} + K_h K_{XN} (y_0 + N_0 - x_0)) x_1^2 + \\ & + (1 + K_h (y_0 - x_0) + K_{XN} (N_0 - x_0)) x_1 - x_0 = 0 \end{aligned} \quad (4)$$

Поскольку типичные нетоксические концентрации препаратов IQ-типа в мутагенном тесте имеют порядок нМ-µМ [24,25], а мономерные концентрации еще меньше исходных, в уравнении (4) можно пренебречь членами второго и третьего порядков. Это позволяет в явном виде выразить x_1 и записать выражения для мольных долей $f_C^X = \frac{K_{XN} x_1}{1 + K_{XN} x_1} \frac{N_0}{x_0}$, необходимых для расчета фактора A_D в виде (1):

$$f_C^X = \frac{K_{XN} N_0}{1 + K_h (y_0 - x_0) + K_{XN} N_0}.$$

Примем $K_h = 0$ и рассчитаем мольную долю f_0^X :

$$f_0^X = \frac{-1 - K_{XN} (N_0 - x_0) + \sqrt{(1 + K_{XN} (N_0 - x_0))^2 + 4K_{XN} x_0}}{1 - K_{XN} (N_0 - x_0) + \sqrt{(1 + K_{XN} (N_0 - x_0))^2 + 4K_{XN} x_0}}.$$

Применяя далее квазифизиологические условия ($N_0 = x_0$, $y_0 \ll x_0$ [15]), получаем приближенное выражение для фактора A_D :

$$\begin{aligned} A_D &= 1 - \frac{f_C^X}{f_0^X} = 1 - \frac{K_{XN}x_0}{1 + K_h(y_0 - x_0) + K_{XN}x_0} \frac{\sqrt{1 + 4K_{XN}x_0} + 1}{\sqrt{1 + 4K_{XN}x_0} - 1} = \\ &= 1 - \frac{1}{1 + K_h(y_0 - x_0) + K_{XN}x_0} \frac{\sqrt{1 + 4K_{XN}x_0} + 2K_{XN}x_0 + 1}{2}. \end{aligned}$$

Пренебрегая в последнем выражении произведением $K_{XN}x_0$, окончательно получим:

$$A_D \approx \frac{K_h y_0}{1 + K_h y_0}. \quad (5)$$

Учитывая типичные концентрации СНЛ в мутагенном тесте $y_0 \sim \mu\text{M}$, и типичные константы гетероассоциации IQ-СНЛ $K_h \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ [25], получаем произведение в знаменателе (5) $K_h y_0 \ll 1$. Это приводит к дальнейшему упрощению (5) к виду $A_D \approx K_h y_0$. Возможность описания данных биологического эксперимента из работы [25] осуществляется путем перехода $y_0 \equiv I_{50}$ и $A_D \equiv 1/2$. Таким образом, с точностью до некоторого постоянного множителя B получаем связь измеряемого в биологическом эксперименте параметра I_{50} с константой гетероассоциации K_h в виде:

$$I_{50} = \frac{B}{K_h}. \quad (6)$$

Аппроксимация выражением (6) данных Дэшвуда [25] дает значительно лучшее соответствие эксперименту ($R^2 = 0.94$), чем исходная аппроксимация линейной зависимостью ($R^2 = 0.82$), представленная в цитируемой работе (рис. 1). Это означает, что вытекающая из теории ИПД в частном случае гиперболическая взаимосвязь (6) биологического эффекта и K_h отражает фундаментальный эффект действия интерцепторного механизма и доказывает существование корреляции биологического эффекта с константой гетероассоциации K_h в условиях отсутствия протекторного механизма в системах Мутаген-Интерцептор-ДНК. Отметим, что этот результат находится в согласии с недавно установленным фактом того, что именно константы комплексообразования в таких системах оказывают наибольшее влияние на величину A_D по сравнению с другими параметрами, входящими в систему уравнений баланса массы [28].

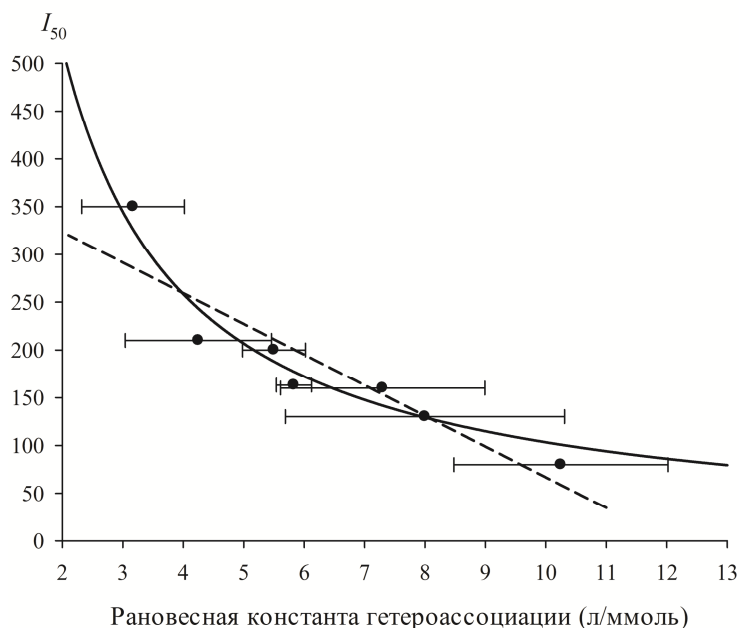


Рис. 1. Корреляция значений I_{50} (концентрация хлорофиллина, при которой мутагенная активность IQ-лигандов падает в два раза [25]) со значениями констант гетероассоциации IQ-Хлорофиллин: пунктирная прямая — линия регрессии из работы [25], $R^2 = 0.82$; сплошная кривая — зависимость, рассчитанная по уравнению (6), $R^2 = 0.94$.

Таким образом, полученные результаты указывают на возможность применения теории ИПД к данным мутагенного теста при условии доминирования интерцепторного механизма действия. При таких условиях роль допущения 4 становится малозначимой. Однако описанный выше подход в общем случае необходимо использовать с осторожностью, и только для однотипных мутагенов, поскольку доля ковалентно связанных комплексов Мутаген-ДНК остается за рамками проведенного анализа и, возможно, послужит направлением дальнейшего расширения теории ИПД. Тем не менее, выявление фундаментального эффекта действия интерцепторного механизма в форме (6) для мутагенного теста является одним из важных достижений теории ИПД вообще и результатов настоящей работы в частности.

Точечная оценка по данным эксперимента на пролиферирующих клеточных линиях

К сожалению, прямое сравнение цитотоксического эффекта действия различных лигандов, измеренного в идентичных условиях в пролиферирующих клеточных линиях, условно возможно только по данным работы [2]. Эффект действия трех ароматических антибиотиков, DOX, NOV и эллиптицина (ELP), исследованный в данной работе в присутствии CAF, в единицах фактора A_D может быть охарактеризован рядом $A_D^{\text{exp}}(\text{NOV}) = 67\% > A_D^{\text{exp}}(\text{DOX}) = 53\% > A_D^{\text{exp}}(\text{ELP}) = 27.5\%$. Аналогичный расчет в рамках теории ИПД с использованием константы связывания ELP с ДНК $K_{XN} = 6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ [29] и константы гетероассоциации с кофеином $K_h = 320 \text{ M}^{-1}$ [17], дает иную последовательность лигандов: $A_D(\text{NOV}) = 41.7\% > A_D(\text{ELP}) = 38.5\% > A_D(\text{DOX}) = 32.6\%$, причем эта последовательность остается неизменной при варьировании констант комплексообразования и концентраций, входящих в систему уравнений баланса массы. Как и ранее в работе [15], наблюдается согласие точечной

оценки по теории ИПД с данными эксперимента на антибиотиках DOX и NOV, однако ELP выпадает из приведенного выше ряда. Причина этому, по-видимому, достаточно тривиальна, и заключается в том, что DOX и NOV, согласно данным [2], проявляют синергизм с CAF преимущественно при одновременном введении комбинации лигандов в биосистему и слабо взаимодействуют с CAF при последовательном введении, в то время как ELP демонстрирует наибольший эффект именно при последовательном, а не одновременном введении с CAF. Это противоречит допущению 2 теории ИПД (см. выше) и означает, что в системе ELP-CAF могут действовать механизмы, отличные от интерцепторно-протекторного. За объективным исключением ELP, необходимо подчеркнуть, что во всех известных случаях (точечная оценка для систем DOX-CAF, NOV-CAF [15] и оценка по концентрационной зависимости в системе TPT-CAF [17]) теория ИПД дает хорошее согласие с данными эксперимента на пролиферирующих клеточных линиях в отношении измеряемого биологического параметра, характеризующего изменение цитотоксической активности лиганда X при введении интерцептора Y . Таким образом, пролиферирующие клеточные линии остаются объектом, наиболее однозначно описываемым в рамках теории ИПД.

Оценка по концентрационной зависимости фактора A_D

С использованием мутагенного теста на *Vibrio harveyi* авторы работ [22, 24] измерили зависимость изменения мутагенной активности имидазо-хинолиновых гетероциклических ароматических аминов (IQ) в присутствии различных ксантинов, включая CAF. На рисунке 2 представлены экспериментально и теоретически рассчитанные зависимости $A_D(y_0)$ с использованием параметров комплексообразования, взятых из процитированных работ, и оценочного значения константы $K_{XN} = 2970 \text{ M}^{-1}$ связывания с ДНК соединений, близких по структуре к аминам IQ-типа, из работы [30].

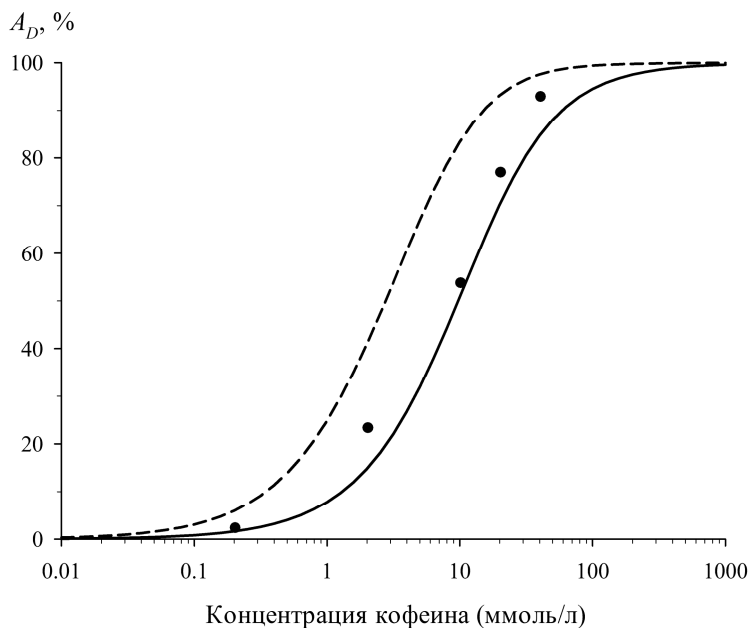


Рис. 2. Зависимости фактора A_D в системе IQ-CAF-ДНК от концентрации кофеина: экспериментально пересчитанный A_D , расчет A_D с учетом (пунктирная кривая, $R^2 = 0.72$) и без учета (сплошная кривая, $R^2 = 0.97$) протекторного механизма.

Полученная кривая (см. пунктирную линию на рис.2) демонстрирует ярко выраженное расхождение теории и эксперимента. Варьирование параметров комплексообразования, входящих в уравнения баланса массы в рамках допустимой погрешности по аналогии с проведенной ранее успешной (в смысле согласия с теорией ИПД) оценкой экспериментальной кривой $A_D(y_0)$ в системе ТРТ-CAF [17], не привело к согласию с экспериментом. Причина обнаруженного несоответствия теории ИПД эксперименту заключается в том, что (как уже отмечалось выше) механизм биологического действия ароматических аминов IQ-типа состоит в образовании ковалентных комплексов с ДНК [26,27], что противоречит допущению 4 теории ИПД и делает бессмысленным введение константы K_{XN} с последующим расчетом мольных долей f^X из уравнений баланса массы. Однако, как также уже отмечалось выше, ковалентное связывание X-ДНК подразумевает отсутствие протекторного механизма, и эта ситуация формально может быть описана в рамках теории ИПД. Если в уравнениях баланса массы положить $K_{YN} = 0$, то теоретическая кривая $A_D(y_0)$ практически совпадет с экспериментальной (рис. 2). Этот важный результат полностью согласуется с приведенной выше точечной оценкой A_D для систем ICR191-CAF, ICR170-CAF и Мутаген-Хлорофиллин (рис. 1) при аналогичном условии $K_{YN} = 0$ и свидетельствуют в пользу справедливости теории ИПД. Полученные совпадения, однако, необходимо рассматривать лишь как условный успех теории ИПД, поскольку, как отмечалось выше, полноценный учет ковалентно связанных комплексов пока не представляется возможным.

Таким образом, информация о характере связывания с ДНК играет принципиально важную роль для правильного применения теории ИПД к данным биологического эксперимента. Детальное знание механизма индуцированного мутагенеза при комбинированном использовании ароматических БАС позволит в будущем полноценно расширить теорию ИПД и на этот тип биологического отклика.

ВЫВОДЫ

Теория интерцепторно-протекторного действия при совместном использовании ДНК-связывающихся ароматических БАС является одной из немногих современных теорий, устанавливающих количественную взаимосвязь между наблюдаемым биологическим синергизмом *in vitro* и физико-химическими параметрами межмолекулярного взаимодействия. Осуществленная в настоящей работе попытка применения теории ИПД к опубликованным данным биологического эксперимента завершилась условно успешным результатом в отношении мутагенного теста в бактериальных системах, и полноценно успешным результатом в отношении измерения цитотоксической активности в пролиферирующих клеточных линиях. Показано, что установленная экспериментально в работе [25] эмпирическая корреляция биологического эффекта с константой K_h в системах Мутаген-Хлорофиллин для ряда мутагенов имидазо-хинолинового типа вытекает как частный случай теории ИПД при отсутствии протекторного механизма и отражает фундаментальный эффект действия интерцепторного механизма в «чистом» виде.

В целом полученные результаты выявили важность соответствия исследуемой комбинации БАС базовым допущениям теории ИПД.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Evstigneev M. P. DNA-binding aromatic drug molecules: Physico-chemical interactions and their biological roles / M. P. Evstigneev. — Saarbrücken: Lambert Academic Publishing. — 2010. — 96 p.
2. Traganos F. Caffeine modulates the effects of DNA-intercalating drugs in vitro: A flow cytometric and spectrophotometric analysis of caffeine interaction with novantrone, doxorubicin, ellipticine, and the doxorubicin analogue AD198 / F. Traganos, J. Kapuściński, Z. Darzynkiewicz // *Cancer Res.* — 1991. — V. 51, № 14. — P. 3682–3689.
3. Piosik J. The modulation by xanthines of the DNA-damaging effect of polycyclic aromatic agents: Part II. The stacking complexes of caffeine with doxorubicin and mitoxantrone / J. Piosik, M. Zdunek, J. Kapuściński // *Biochem. Pharmacol.* — 2002. — V. 63, № 4. — P. 635–646.
4. Traganos F. Caffeine reverses the cytotoxic and cell kinetic effects of novantrone (mitoxantrone) / F. Traganos, B. Kaminska-Eddy, Z. Darzynkiewicz // *Cell Prolif.* — 1991. — V. 24, № 3. — P. 305–319.
5. Veselkov D.A. Molecular basis of the protective action of caffeine on the complexation of intercalating ligands with DNA / D.A. Veselkov, D.B. Davies, L.N. Djimant, A.N. Veselkov // *Biopolym. Cell.* — 2000. — V. 16, № 6. — P. 468–481.
6. Hetero-association of caffeine and aromatic drugs and their competitive binding with a DNA oligomer / D. B. Davies, D. A. Veselkov, L. N. Djimant, A. N. Veselkov // *Eur. Biophys. J.* — 2001. — V. 30, № 5. — P. 354–366.
7. ¹H NMR analysis of the interaction of antibiotic mitoxantrone with DNA in the presence of caffeine in aqueous solution / A. N. Veselkov, S. A. Vysotsky, M. P. Evstigneev [et al.] // *Biopolym. Cell.* — 2002. — V. 18, № 4. — P. 287–296.
8. Davies D. B. NMR determination of the hetero-association of phenanthridines with daunomycin and their competitive binding to a DNA oligomer / D. B. Davies, D. A. Veselkov, A. N. Veselkov // *Eur. Biophys. J.* — 2002. — V. 31, № 2. — P. 153–162.
9. Pietrzak M. The “interceptor” properties of chlorophyllin measured within the three-component system: Intercalator-DNA-chlorophyllin / M. Pietrzak, Z. Wieczorek, J. Wieczorek, Z. Darzynkiewicz // *Biophys. Chem.* — 2006. — V. 123, № 1. — P. 11–19.
10. Attenuation of acridine mutagen ICR-191 — DNA interactions and DNA damage by the mutagen interceptor chlorophyllin / M. Pietrzak, H.D. Halicka, Z. Wieczorek [et al.] // *Biophys. Chem.* — 2008. — V. 135, № 1-3. — P. 69–75.
11. De-intercalation of ethidium bromide and propidium iodine from DNA in the presence of caffeine / J. Piosik, K. Wasielewski, A. Woziwodzka [et al.] // *Cent. Eur. J. Biol.* — 2010. — V. 5, № 1. — P. 59–66.
12. Evstigneev M. P. Complexation of daunomycin with a DNA oligomer in the presence of an aromatic vitamin (B₂) determined by NMR spectroscopy / M. P. Evstigneev, Yu. V. Mykhina, D. B. Davies // *Biophys. Chem.* — 2005. — V. 118, № 2-3. — P. 118–127.
13. 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. — V. 121, № 2. — P. 84–95.
14. 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. — V. 36, № 1. — P. 1–11.
15. Quantitation of the molecular mechanisms of biological synergism in a mixture of DNA-acting aromatic drugs / M. P. Evstigneev, A. O. Lantushenko, V. P. Evstigneev [et al.] // *Biophys. Chem.* — 2008. — V. 132, № 2-3. — P. 148–158.
16. Complexation of biologically active aromatic compounds with DNA in the presence of theophylline / A. A. Hernandez Santiago, D. D. Andrejuk, A.-M. Cervantes Tavera [et al.] // *J. Biol. Phys.* — 2009. — V. 35, № 2. — P. 115–126.
17. Quantification of the interceptor action of caffeine on the in vitro biological effect of the anti-tumour agent topotecan / M. P. Evstigneev, A. A. Mosunov, V. P. Evstigneev [et al.] // *Eur. Biophys. J.* — 2011. — V. 40, № 8. — P. 969–980.
18. General analysis of competitive binding in drug-interceptor-DNA systems / A. S. Buchelnikov, A. A. Hernandez Santiago, M. Gonzalez Flores [et al.] // *Eur. Biophys. J.* — 2012. — V. 41, № 3. — P. 273–283.
19. Протекторное действие витамина B₂ по отношению к антибиотику топотекану in vitro / А. О. Лантушенко, А. А. Мосунов, З. Даржинкевич, М. П. Евстигнеев // *Физика живого.* — 2007. — Т. 15, № 2. — С. 18–23.
20. Antitumor effect of C₆₀ fullerene in combination with doxorubicin / S. V. Prylutska, Yu. M. Kichmarenko, M. P. Evstigneev [et al.] // *Cancer Nano* (submitted).
21. Alleviation of mutagenic effects of polycyclic aromatic agents (quinacrine mustard, ICR-191 and ICR-170) by caffeine and pentoxifylline / J. Piosik, K. Ulanowska, A. Gwizdek-Wisniewska [et al.] // *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* — 2003. — V. 530, № 1-2. — P. 47–57.

22. Formation of stacking complexes between caffeine (1,2,3-trimethylxanthine) and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine may attenuate biological effects of this neurotoxin / K. Ulanowska, J. Piosik, A. Gwizdek-Wiśniewska, G. Węgrzyn // *Bioorg. Chem.* – 2005. – V. 33, № 5. – P. 402–413.
23. Methylxanthines (caffeine, pentoxifylline and theophylline) decrease the mutagenic effect of daunomycin, doxorubicin and mitoxantrone / J. Piosik, A. Gwizdek-Wiśniewska, K. Ulanowska [et al.] // *Acta Biochim. Pol.* – 2005. – V. 52, № 4. – P. 923–926.
24. Woziwodzka A. Caffeine, pentoxifylline and theophylline form stacking complexes with IQ-type heterocyclic aromatic amines / A. Woziwodzka, A. Gwizdek-Wiśniewska, J. Piosik // *Bioorg. Chem.* – 2011. – V. 39, № 1. – P. 10–17.
25. Dashwood R. Antimutagenic potency of chlorophyllin in the Salmonella assay and its correlation with binding constants of mutagen-inhibitor complexes / R. Dashwood, D. Guo // *Environ. Mol. Mutagen.* – 1993. – V. 22, № 3. – P. 164–171.
26. Characterization of DNA adducts formed in vitro by reaction of *N*-hydroxy-2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline and *N*-hydroxy-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline at the C-8 and N² atoms of guanine / R. J. Turesky, S. C. Rossi, D. H. Welti [et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* – 1992. – V. 5, № 4. – P. 479–490.
27. Heterocyclic amines: mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish / T. Sugimura, K. Wakabayashi, H. Nakagama, M. Nagao // *Cancer Sci.* – 2004. – V. 95, № 4. – P. 290–299.
28. On the reliability of quantitation of biological effect in drug-interceptor-DNA systems / A. S. Buchelnikov, V. P. Evstigneev, L. E. Rodríguez Oropeza, M. P. Evstigneev // *Eur. Biophys. J.* – 2013. – V. 42, № 4. – P. 315–319.
29. Binding of ellipticine base and ellipticinium cation to calf-thymus DNA / G. Dodin, M.-A. Schwaller, J. Aubard, C. Paoletti // *Eur. J. Biochem.* – 1988. – V. 176, N 2. – P. 371–376.
30. Sartorius J. Intercalation mechanisms with ds-DNA: binding modes and energy contributions with benzene, naphthalene, quinoline and indole derivatives including some antimalarials / J. Sartorius, H.-J. Schneider // *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2.* – 1997. – N 11. – P. 2319–2328.