

Молекулярный механизм протекторного действия кофеина при комплексообразовании интеркалирующего лиганда с ДНК

Д. А. Веселков¹, Д. Б. Дэвис¹, Л. Н. Дымант, А. Н. Веселков

Севастопольский государственный технический университет
Студгородок, Севастополь, 99053, Украина

¹ Лондонский университет, Беркбек колледж

Лондон, WC1N 0OP, Великобритания

Рассмотрен молекулярный механизм действия кофеина (CF) как комплексообразователя — интерцептора ароматических лигандов, интеркалирующих в ДНК, на примере типичного интеркалятора — фенантридинового красителя бромистого этидия (EB). Изучены процессы само- и гетероассоциации CF и EB, а также их комплексообразования с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TrGrCrA) в одинаковых экспериментальных условиях методом одномерной и двухмерной ¹H-ЯМР спектроскопии (500 МГц). Измерены концентрационные (при температурах 298 и 308 К) и температурные зависимости протонных химических сдвигов молекул в водном растворе. Определены равновесные константы реакций само- и гетероассоциации CF и EB, образования различных типов комплексов между CF, EB и тетрануклеотидом d(TGCA) в мономерной и дуплексной формах, а также значения предельных химических сдвигов протонов ароматических лигандов в составе ассоциатов и комплексов. Рассчитаны наиболее вероятные структуры димера кофеина и 1:1 гетерокомплекса CF—EB в водном растворе. Проведен расчет относительного содержания ассоциатов и комплексов различного типа в смешанном растворе, содержащем CF, EB и d(TGCA). Выявлены особенности динамического равновесия гетероассоциатов CF—EB и гетерокомплексов CF—EB—d(TGCA) в зависимости от концентрации кофеина в смешанном растворе. Сделано заключение о том, что снижение эффективности действия лиганда, интеркалирующего в ДНК, при добавлении в раствор CF связано в значительной степени с блокированием молекулами кофеина мест посадки на олигонуклеотидной последовательности и в меньшей степени — с образованием гетероассоциатов CF—EB в смешанном растворе.

Введение. Кофеин (1,3,7-триметилксантин) обладает множественными эффектами на клеточном уровне, в частности, он является ингибитором процесса репарирования в бактериальных системах [1, 2]. Принято считать, что биологическая активность кофеина связана с его взаимодействием с биополимерами, включая белки и ДНК [2—4]. Вместе с тем экспериментальные данные свидетельствуют о том, что кофеин уменьшает цитотоксическое действие бромистого этидия [5] и ряда антиопухолевых препаратов, таких как доксорубин и его аналоги, эллиптицин и др. [6—10]. В работах

[9—11] сделан вывод о том, что кофеин образует комплексы с ароматическими лигандами, тем самым понижая эффективную концентрацию свободного лиганда в растворе и соответственно его фармакологическую активность. Таким образом, полагается, что кофеин выступает в роли комплексообразователя — интерцептора ароматических биологически активных веществ, связывающихся с ДНК путем интеркаляции [10].

Для подтверждения данного вывода были проведены исследования по гетероассоциации кофеина с ароматическими биологически активными молекулами в растворе и предложены различные модели для интерпретации экспериментальных данных. Статистическая термодинамическая модель ассоци-

ации двух различных ароматических веществ, образующих бесконечномерные агрегаты в растворе как при самоассоциации, так и при гетероассоциации молекул, была развита Веллером и соавт. [12]. Однако в этой работе не были получены аналитические выражения для анализа наблюдаемых параметров ЯМР-спектроскопии, в частности, для интерпретации экспериментальных концентрационных и температурных зависимостей протонных химических сдвигов молекул в смешанных растворах. Предлагаемая в [12] методика проведения ЯМР-экспериментов в смешанных растворах для изучения гетероассоциации молекул затруднительна для практического использования.

Достаточно строгая модель бесконечномерной гетероассоциации ароматических молекул предложена в работе [13], но использование приближенного выражения для определения концентрации мономеров одной из компонент в смешанном растворе ограничивает общность применения данной модели для изучения гетероассоциации в широком диапазоне концентраций взаимодействующих молекул.

Теоретическая модель [11], использованная для интерпретации данных оптической спектроскопии по гетероассоциации ароматических молекул, не учитывает образования различных *n*-мерных агрегатов для всех компонент, присутствующих в смешанном растворе, поэтому в общем случае она недостаточно корректна. Аналогичный вывод можно сделать и относительно модели, использованной для анализа оптико-спектроскопических измерений по комплексообразованию кофеина с ароматическими молекулами антибиотиков [10], так как в этой модели рассматривается только образование 1:1 гетерокомплекса и не учитывается самоассоциация ароматических молекул в растворе.

Использование димерной модели самоассоциации молекул при анализе гетероассоциации ароматических соединений [14, 15] предполагает сравнительно низкие концентрации взаимодействующих молекул в растворе, что свидетельствует об ограниченных возможностях применения этой модели. Такое же заключение можно сделать и относительно графического метода определения параметров гетероассоциации молекул [16], в котором использованы реакции димеризации и 1:1 гетероассоциации взаимодействующих молекул в растворе.

Из всего вышеизложенного следует, что для анализа гетероассоциации молекул необходима достаточно строгая обобщенная модель, учитывающая образование бесконечномерных агрегатов как для реакций самоассоциации, так и гетероассоциации молекул. Такая модель была нами недавно

разработана [17] на основе данных ЯМР-спектроскопии и модели бесконечномерной самоассоциации ароматических молекул в растворе [18]. Важно отметить, что метод ЯМР-спектроскопии имеет определенные преимущества в сравнении с оптической спектроскопией, поскольку он позволяет определять как равновесные параметры ассоциации молекул, так и структурные особенности образующихся молекулярных комплексов в условиях многокомпонентного равновесия в растворе [19, 20]. В статистической термодинамической модели [17] получены аналитические выражения для интерпретации ЯМР-характеристик взаимодействующих молекул в смешанном растворе: анализ позволяет определить как структурные, так и термодинамические параметры гетероассоциатов на основе экспериментальных зависимостей химических сдвигов протонов молекул от концентрации и температуры раствора. Предложенная модель апробирована на примере гетероассоциации типичных интеркаляторов ДНК — фенантридиновых красителей бромистого этидия и йодистого пропидия.

В настоящей работе эта модель использована для определения структурных особенностей и термодинамических параметров гетероассоциации кофеина (CF) с фенантридиновым красителем бромистым этидием (EB) для выяснения молекулярного механизма протекторного действия CF как интерцептора («перехватчика») биологически активных веществ. Знание равновесных констант само- и гетероассоциации низкомолекулярных ароматических молекул CF и EB, а также их комплексообразования с дезоксиолигонуклеотидами заданных последовательностей оснований в цепи позволяет рассчитать относительное содержание комплексов «ДНК—лиганд» в присутствии CF в растворе и тем самым сделать вывод о молекулярной природе действия CF на фармакологическую активность ароматических антибиотиков. При этом важно отметить, что для проведения подобных расчетов исследования как само-, так и гетероассоциации ароматических лигандов, а также их комплексообразования с дезоксиолигонуклеотидами должны быть проведены в идентичных экспериментальных условиях.

В данной работе методом ¹H-ЯМР спектроскопии изучена самоассоциация CF и гетероассоциации CF с EB, а также комплексообразование CF с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TrGpCpA) в 0,1 М фосфатном буфере, рD 7,1, при температурах $T_1 = 298$ К и $T_2 = 308$ К. Ранее была исследована самоассоциация красителя EB [18], а также комплексообразование этого лиганда с 5'-d(TrGpCpA) [20] в аналогичных экспериментальных условиях.

Материалы и методы. CF и EB (рис. 1) фирмы

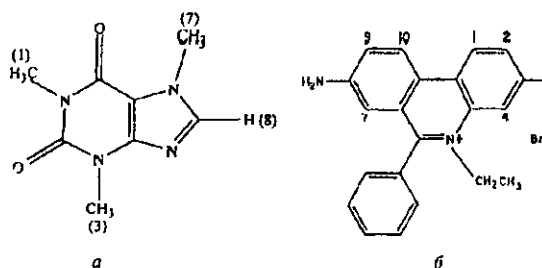


Рис. 1. Структурные формулы ароматических лигандов с указанием необмениваемых протонов: а — кофеин (1,3,7-триметил ксантин); б — катион этидия (3,8-диамино-6-фенил-5-этилфенантридин)

«Sigma» (США) растворяли в D₂O с изотопной чистотой 99,95 % D («Sigma») и лиофилизировали.

Дезокситетрарибонуклеозидтрифосфат 5'-d(TpGpCpA) синтезирован компанией «Oswel DNA Service» (Великобритания). Тетрануклеотид также лиофилизировали из D₂O и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере. Растворы готовили, добавляя взвешенное количество образца в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере (pD 7,1), содержащем 10⁻⁴ моль/л ЭДТА. Концентрацию ароматических молекул в водном растворе определяли спектрофотометрически — для CF коэффициент экстинкции $\epsilon = 9740 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ($\lambda = 273 \text{ нм}$) [21], для EB — $\epsilon = 5860 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ($\lambda = 480 \text{ нм}$) [22].

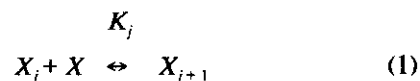
1М- и 2М-¹H-ЯМР спектры измерены на спектрометре «Bruker DRX» с резонансной частотой 500 МГц. Остаточный сигнал HOD насыщался в период детектирования, Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул выполнены при двух температурах (298 и 308 К), температурные зависимости химических сдвигов протонов ароматических лигандов измерены в диапазоне температур от 273 до 353 К. Все ЯМР-измерения выполнены в условиях быстрого химического обмена взаимодействующих молекул во временном масштабе ЯМР. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоукислота), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония (ТМА).

Методика приготовления образцов и проведения экспериментов описана в [19, 23]. Отнесение сигналов в спектрах ¹H-ЯМР, отождествление химических и пространственных связей проводили соответственно с помощью двухмерных гомоядер-

ных TOCSY- и ROESY-экспериментов. Спектры 2М-ROESY регистрировали при фиксированной температуре $T = 298 \text{ К}$ с использованием стандартной последовательности импульсов при ширине спектров $\text{SW} = 5400 \text{ Гц}$, 4096 точек в период детектирования (t_2), 512 приращений времени эволюции (t_1) и при времени смешивания $\tau_m = 200 \text{ мс}$. Спектры 2М-TOCSY измеряли при той же температуре, используя 2048 точек в t_2 , 256 приращений в t_1 и при времени смешивания $\tau_m = 60 \text{ мс}$. Период восстановления составлял 1,5 с для 2М-TOCSY и 3 с для 2М-ROESY. Для увеличения чувствительности импульсную последовательность при каждом t_i повторяли 16 и 32 раза для 2М-TOCSY и 2М-ROESY экспериментов соответственно. Температуру в процессе измерений стабилизировали терморегулятором BVT-3000.

Результаты и обсуждение. Самоассоциация ароматических лигандов в водном растворе. Отнесения сигналов в спектре ПМР CF, полученные путем анализа двухмерных спектров 2М-TOCSY- и 2М-ROESY-экспериментов, находятся в хорошем согласии с опубликованными данными [24—26]. CF подобно многим ароматическим молекулам красителей и антибиотиков образует стопочные ассоциаты за счет стэкинг-взаимодействия молекул в водном растворе, что проявляется в довольно сильной концентрационной зависимости химических сдвигов протонов CF [24].

Для интерпретации экспериментальных данных использовали модель бесконечномерной некооперативной самоассоциации молекул [18, 27], в которой все константы равновесия K_j для реакций



предполагаются одинаковыми при всех j : $K_1 = K_2 = \dots = K$. В такой модели зависимость химического сдвига δ от концентрации x имеет вид [18, 31]:

$$\delta = \delta_m + (\delta_i - \delta_m) \left[\frac{(2Kx + 1) - \sqrt{(4Kx + 1)^2}}{2Kx} \right], \quad (2)$$

где δ_i — протонный химический сдвиг для молекулы CF внутри ассоциата, δ_m — протонный химический сдвиг в мономере, т. е. при бесконечном разбавлении. Экспериментальные данные обрабатывали на основе вариационного метода, описанного в [28]. Параметры δ_m , δ_i и K модели (2) находили из условия минимизации квадратичной функции невязки [28], численная процедура минимизации функции невязки описана в [18, 28]. Результаты расчетов параметров для протонов CF

Таблица 1

Рассчитанные значения параметров самоассоциации ароматических лигандов в 0,1 М фосфатном буфере, рD 7,1

Протон	Модель ассоциации молекул							Термодинамические параметры	
	Бесконечномерная некооперативная			Кооперативная				$-\Delta H^0$, кДж/моль	$-\Delta S^0$, Дж/(моль К)
	δ_m , м. д.	δ_i , м. д.	K , л/моль	δ_m , м. д.	δ_i , м. д.	K , л/моль	σ		
<i>Самоассоциация кофеина (T = 298 K)</i>									
H8	7,89	7,76	—	7,89	7,75	—	—	—	—
H7	3,95	3,68	—	3,95	3,68	—	—	—	—
H3	3,54	3,12	11,8±0,3	3,54	3,10	10,5±0,6	1,08±0,02	21,0±0,4	49,8±1,1
H1	3,35	2,96	—	3,35	2,94	—	—	—	—
<i>Самоассоциация кофеина (T = 308 K)</i>									
H8	7,89	7,74	—	7,89	7,73	—	—	—	—
H7	3,95	3,67	—	3,95	3,69	—	—	—	—
H3	3,54	3,11	8,9±0,4	3,54	3,10	9,0±0,9	1,00±0,07	21,0±0,4	50,0±1,1
H1	3,35	2,97	—	3,35	2,94	—	—	—	—
<i>Самоассоциация бромистого этидия (T = 298 K)</i>									
H1	8,69	7,46	—	8,68	7,59	—	—	—	—
H10	8,63	7,30	—	8,62	7,29	—	—	—	—
H9	7,66	6,91	—	7,66	6,96	—	—	—	—
H4	7,55	6,94	352±16	7,55	6,95	401±21	0,89±0,06	23,4±3,5	30,9±4,6
H2	7,48	6,92	—	7,48	6,93	—	—	—	—
H7	6,67	6,02	—	6,67	6,05	—	—	—	—

приведены в табл. 1. Среднее по всем протонам значение $K = (11,8 \pm 0,3)$ л/моль при $T = 298$ К хорошо согласуется с величинами равновесных констант самоассоциации CF, определенных ранее [4, 11, 12, 14, 21, 29]. Вместе с тем результаты исследования самоассоциации CF методом инфракрасной спектроскопии [30] предполагают, что константа димеризации молекул (K_1) существенно выше равновесных констант образования агрегатов более высокого порядка (K_2 , K_3 и т. д.). Для того чтобы определить вероятность образования агрегатов CF более высокого порядка, чем димеры, экспериментальные результаты были проанализированы с помощью бесконечномерной кооперативной модели самоассоциации, в которой равновесные константы реакций (1) предполагаются равными для всех $j \geq 2$ ($K_2 = K_3 = \dots = K_j = K$) и $K_1 = \sigma K$ [18,

31]. Случай $\sigma = 1$ соответствует некооперативной модели. Система является кооперативной при $\sigma < 1$, когда образование димеров создает энергетически выгодные условия для последующей ассоциации молекул. Если $\sigma > 1$, то можно говорить об антикооперативном процессе самоассоциации. Такая модель приводит к следующей зависимости химического сдвига δ от концентрации [18, 31]:

$$\begin{aligned} & (\delta - \delta_m) / (\delta_i - \delta_m) = \\ & = 1 - x_1 / x_0 - \sigma K x_1^2 / (x_0 (1 - K x_1)), \end{aligned} \quad (3)$$

где x_0 , — исходная молярная концентрация молекул, x_1 — молярная концентрация мономеров CF в растворе. В уравнение (3) входят четыре неизвестных параметра: δ_m , δ_i , σ и K , подлежащих определению по экспериментальным концентрационным

зависимостям химического сдвига. Процедура расчетов параметров подробно описана в [18, 31]. Значения параметров, полученных в результате расчетов по кооперативной модели при различных температурах, представлены в табл. 1. Величина параметра σ , близкая к единице, свидетельствует о том, что процесс самоассоциации молекул CF некооперативен. Этот результат находится в противоречии с выводами работы [30] и подтверждает правомерность использования бесконечномерной некооперативной модели для интерпретации экспериментальных данных по самоассоциации молекул CF в водном растворе [4, 12, 13]. В табл. 1 приведены и параметры самоассоциации EB, определенные ранее [18] в тех же экспериментальных условиях: для EB кооперативность при агрегации молекул также фактически отсутствует ($\sigma = 0,89 \pm 0,06$). Анализ показывает [18], что параметр кооперативности σ существенно зависит от вида хромофора, размера и характера боковых групп и цепей в ароматических молекулах лигандов. Так, при ассоциации акридиновых красителей $\sigma < 0,5$, в то время как процесс самоассоциации антибиотика актиномицина D антикооперативен — $\sigma \geq 1,5$. Отметим, что характер боковых групп в хромофоре ароматических молекул может оказывать существенное влияние и на геометрию образующегося молекулярного комплекса в растворе.

Анализ структур димеров CF в водном растворе сделан на основании рассчитанных значений индуцированных химических сдвигов протонов молекул $\Delta\delta = \delta_m - \delta_a$, (табл. 1). Взаимное расположение молекул в димере определяли, устанавливая соответствие величин $\Delta\delta$ теоретическим кривым экранирования, рассчитанным квантово-механически для CF [28, 37]. Найденная в результате расчетов наиболее вероятная структура димера CF в водном растворе представлена в различных проекциях на рис. 2. Пространственное изображение структуры получено с помощью программы «Mathematica 2.2» (Wolfram Res. Inc.). Плоскости молекул в димере параллельны, расположены на расстоянии 0,34 нм и повернуты друг относительно друга на угол $\psi \approx 90^\circ$. В силу симметрии кривых экранирования молекулы CF [24, 32] можно полагать, что практически с той же вероятностью в водном растворе формируются димеры с углом закручивания плоскостей ароматических молекул $\psi \approx 270^\circ$. Рассчитанные наиболее вероятные структуры димеров CF хорошо согласуются со структурами, полученными ранее методом ЯМР-спектроскопии [4, 24], а также с теоретическими расчетами методом Монте-Карло [33, 34]. Авторы [33, 34] высказывают предположение, что при таком взаимном распо-

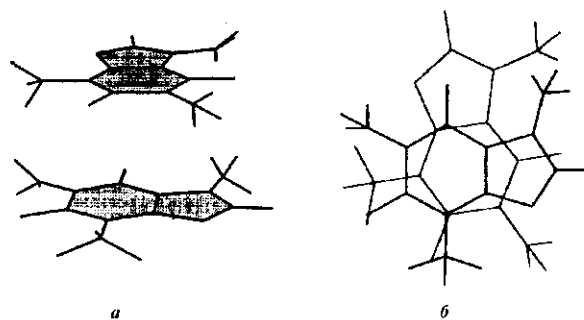


Рис. 2. Расчетная структура димера кофеина: а — вид на комплекс сбоку (плоскости молекул заштрихованы); б — вид сверху, показывающий взаимное расположение молекул в димерном комплексе. Связи в нижней молекуле кофеина выделены

ложением плоскостей молекул в димерном комплексе происходит сближение метильных групп двух мономеров, и тем самым в стабилизации димера CF существенную роль играют гидрофобные взаимодействия. Вместе с тем в недавно опубликованной работе [35] на основании данных по межмолекулярным контактам NOE, измеренным в растворе CF с помощью одномерного эффекта Оверхаузера, и молекулярного моделирования сделан вывод о существовании примерно девяти сравнимых по энергии конформаций димеров CF. Безусловно, в растворе низкомолекулярных ароматических соединений, таких как CF, существует динамическое равновесие различных ассоциатов, отличающихся по структурной организации. Структура димера CF, приведенная на рис. 2, представляет собой наиболее вероятный димерный комплекс, отвечающий ассоциату с наибольшим относительным содержанием в водном растворе.

Термодинамические параметры самоассоциации CF, представленные в табл. 1, определены, как и ранее [18, 32], на основе экспериментальных температурных зависимостей протонных химических сдвигов молекул с использованием аддитивной модели для наблюдаемого химического сдвига протонов и формализма Вант-Гоффа. Здесь приведены также термодинамические параметры самоассоциации EB, определенные нами ранее [18] в идентичных экспериментальных условиях. Следует отметить, что расчетные значения энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) реакции самоассоциации CF в водном растворе, представленные в табл. 1, несколько превышают величины ΔH и ΔS агрегации этих молекул, опубликованные в работах [23, 25], что,

по-видимому, связано с различными условиями проведения экспериментов.

Гетероассоциация ароматических лигандов в водном растворе. Структурные и термодинамические параметры комплексообразования между ЕВ и СФ определяли с помощью анализа зависимостей протонных химических сдвигов обоих ароматических соединений в смешанных растворах от концентрации и температуры. В 2М-ROESY-спектрах смешанных растворов даже при максимальных исследованных концентрациях молекул ($A_0 = 3,6$ мМ (ЕВ); $P_0 = 2,2$ мМ (СФ)) не наблюдались межмолекулярные кросс-пики. Отсутствие последних может быть связано со смещением молекулярного равновесия при добавлении СФ и образованием различных гетероассоциатов между ЕВ и СФ с относительно малым содержанием каждого типа комплекса в растворе.

В процессе измерений концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов изучаемых ароматических молекул концентрацию СФ поддерживали постоянной ($P_0 = 2,2$ мМ) при изменении процентного содержания ЕВ в растворе (рис. 3, а). Это связано с тем, что равновесная константа

самоассоциации молекул ЕВ более чем на порядок превышает такую для СФ (см. табл. 1) и, следовательно, изменение концентрации красителя оказывает большее влияние на равновесное распределение агрегатов, чем вариация содержания СФ в растворе.

В рассматриваемой модели гетероассоциации молекул [17] предполагается, что в растворе имеет место динамическое равновесие взаимодействующих молекул, в котором учитывается образование бесконечномерных самоассоциатов, а также гетероассоциатов различного типа. При анализе экспериментальных данных использована следующая схема взаимодействия ароматических молекул в растворе:

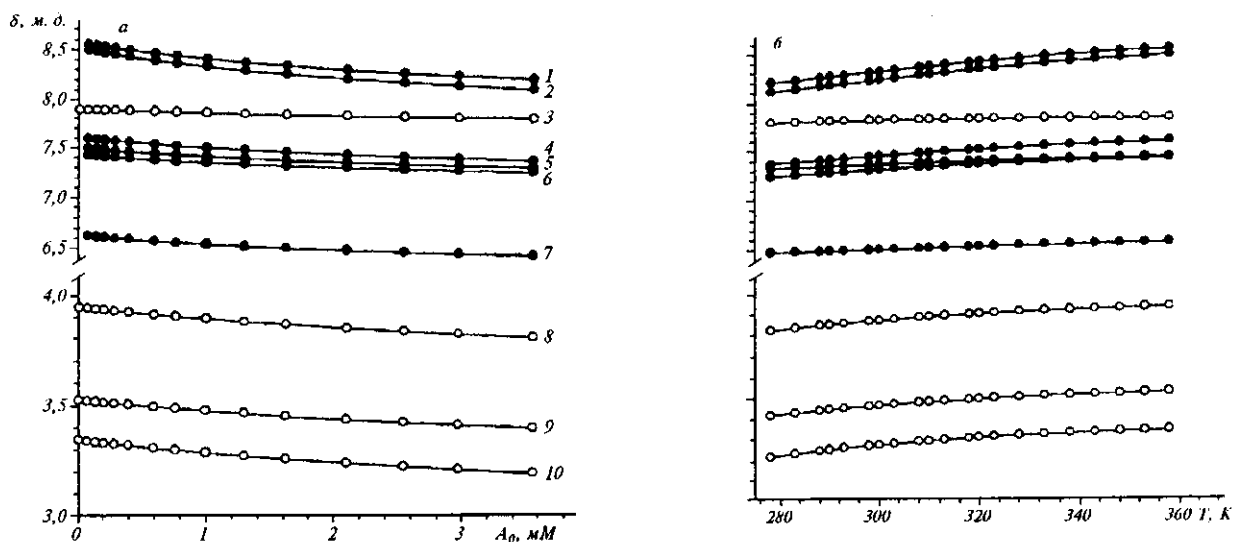
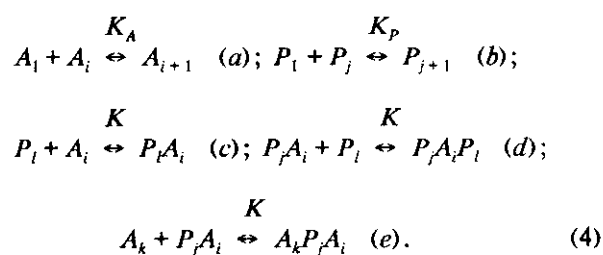


Рис. 3. Экспериментальные зависимости химических сдвигов протонов кофеина (СФ) и бромистого этидия (ЕВ) в смешанном растворе: а — от концентрации ЕВ при $T = 298$ К, $P_0 = 2,2$ мМ; б — от температуры при $P_0 = 2,2$ мМ, $A_0 = 1,6$ мМ (1 — Н1 (ЕВ); 2 — Н10 (ЕВ); 3 — Н8 (СФ); 4 — Н9 (ЕВ); 5 — Н4 (ЕВ); 6 — Н2 (ЕВ); 7 — Н7 (ЕВ); 8 — Н7 (СФ); 9 — Н3 (СФ); 10 — Н1 (СФ))

Константы равновесия для реакций самоассоциации ЕВ (K_A), CF (K_P) и гетероассоциации молекул (K) полагаются не зависящими от числа молекул в агрегатах и комплексах. В схеме (4) A_i и P_l соответствуют мономерам ЕВ и CF, A_i, A_k, P_j, P_l — самоассоциатам, содержащим i, k мономеров красителя и j, l мономеров CF соответственно. Так как равновесная константа самоассоциации CF K_P существенно меньше, чем K_A для ЕВ ($K_P \ll K_A$) (табл. 1), то вероятность образования гетерокомплексов $A_k P_j A_i$, где P_j -ассоциаты фланкированы ассоциатами красителя (A_k и A_i), как показывают расчеты [17], очень мала и, следовательно, реакцией (4, е) в этом случае можно пренебречь.

В общем случае бесконечномерной ассоциации молекул, учитывая законы действующих масс для реакций (4), закон сохранения массы, аддитивную модель для наблюдаемого протонного химического сдвига и эффекта ближнего порядка на экранирование ядер (только ближайшие соседние молекулы дают вклад в экранирование ядер в стопочном ассоциате), зависимость наблюдаемого химического сдвига протона ЕВ от концентрации молекул в смешанном растворе может быть записана в виде

$$\delta_A = \frac{a_1}{a_0} \left\{ \delta_{m_A} \left(2(1 + K_A a_1) - \frac{1}{(1 - K_A a_1)^2} \right) + 2\delta_{d_A} \left(\frac{1}{(1 - K_A a_1)^2} - 1 - K_A a_1 \right) + \frac{\delta_{c_A} K_P p_1}{(1 - K_A a_1)^2 (1 - K_P p_1)} \left(1 + \frac{K_P p_1}{1 - K_P p_1} \right) \right\} \quad (5)$$

и соответствующее выражение для протонов CF будет таким:

$$\delta_P = \frac{p_1}{p_0} \left\{ \delta_{m_P} \left(2(1 + K_P p_1) - \frac{1}{(1 - K_P p_1)^2} \right) + 2\delta_{d_P} \left(\frac{1}{(1 - K_P p_1)^2} \right) + \frac{\delta_{c_P} K_A a_1}{(1 - K_P p_1)^2 (1 - K_A a_1)} \left(1 + \frac{K_P p_1}{(1 - K_P p_1)} \right) \right\}. \quad (6)$$

Здесь $\delta_{m_A}, \delta_{d_A}, \delta_{c_A}$ и $\delta_{m_P}, \delta_{d_P}, \delta_{c_P}$ — протонные химические сдвиги ЕВ и CF в мономерной, димерной и в гетероассоциатах соответственно. Значения протонных химических сдвигов $\delta_{m_A}, \delta_{d_A}, \delta_{m_P}, \delta_{d_P}$ и равновесных констант K_A, K_P для взаимодействующих молекул определены при исследовании самоассоциации молекул в идентичных экспериментальных условиях растворителя (см. табл. 1). Тогда из (5) и (6) следует, что наблюдаемые протонные химические сдвиги молекул красителя и CF в

растворе являются функциями неизвестных δ_c и K , которые можно найти, используя экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов различных протонов ароматических молекул в смешанном растворе (рис. 3, а). Вычислительная процедура расчета параметров подробно описана в [17]. Значения полученных в результате расчетов параметров гетероассоциации CF с ЕВ при температурах 298 и 308 К представлены в табл. 2. Прежде всего следует отметить, что величины констант гетероассоциации CF и ЕВ принимают промежуточные значения между равновесными константами самоассоциации CF и красителя (ср. табл. 1 и 2). Вместе с тем равновесная константа гетероассоциации CF с ЕВ несколько отличается от подобной константы $K_c = 84,5 \pm 3,5$ л/моль, определенной для этой системы в достаточно близких экспериментальных условиях [10]. Наблюдаемые различия, очевидно, связаны с использованием в [10] весьма приближенной модели гетероассоциации молекул, в которой предполагается лишь образование 1:1 гетерокомплекса в растворе без учета самоассоциации взаимодействующих ароматических молекул.

Полученные значения химических сдвигов δ_c для протонов CF и ЕВ были использованы для расчета наиболее вероятных структур 1:1 комплексов CF с красителем в водном растворе, который проводили аналогично описанному выше для димерных самоассоциатов CF. При этом структуру гетерокомплекса получали, устанавливая соответствие между значениями индуцированных протонных химических сдвигов ($\Delta\delta = \delta_m - \delta_c$), полученных из экспериментальных концентрационных зависимостей как для CF, так и для ЕВ (табл. 2), и теоретическими кривыми экранирования, рассчитанными квантово-механически для ароматических молекул [24, 32], что позволяет существенно повысить точность в определении структуры комплекса.

На рис. 4 представлена найденная в результате расчетов наиболее вероятная пространственная структура 1:1 гетерокомплекса CF с ЕВ в водном растворе. Пространственное изображение гетерокомплекса, как и димерных ассоциатов при агрегации молекул, получено с помощью программы «Mathematica 2.2» (Wolfram Res. Inc.). Плоскости молекулы CF и хромофора ЕВ в 1:1 гетерокомплексе параллельны друг другу и расположены на расстоянии 0,34 нм; в таком комплексе имеет место довольно сильное перекрывание ароматических колец взаимодействующих молекул (стэкинг-взаимодействие). Структура рассчитанного 1:1 комплекса находится в хорошем согласии со структурой гете-

Таблица 2

 Расчетные значения параметров гетероассоциации кофеина и бромистого этидия в 0,1 М фосфатном буфере, рD 7,1, P₀ = 2,2 мМ

Протон ЕВ	$\delta_{сЕВ}$, м. д.	Протон СF	$\delta_{сСF}$, м. д.	$K_{гет}$, М ⁻¹	$\Delta H_{гет}^0$, кДж/моль	$\Delta S_{гет}^0$, Дж/(моль К)
<i>T</i> = 298 К						
Н1	7,64	Н8	7,09	—	—	—
Н10	3,69	Н7	2,79	—	—	—
Н9	3,28	Н3	2,44	62±4	22,7±3,0	41,9±10,6
Н4	6,17	Н1	2,07	—	—	—
Н2	5,22	—	—	—	—	—
Н7	3,14	—	—	—	—	—
<i>T</i> = 308 К						
Н1	7,94	Н8	6,99	—	—	—
Н10	7,61	Н7	2,70	—	—	—
Н9	7,17	Н3	2,35	—	—	—
Н4	6,27	Н1	1,98	43±4	22,7±3,0	42,4±10,7
Н2	6,17	—	—	—	—	—
Н7	5,22	—	—	—	—	—

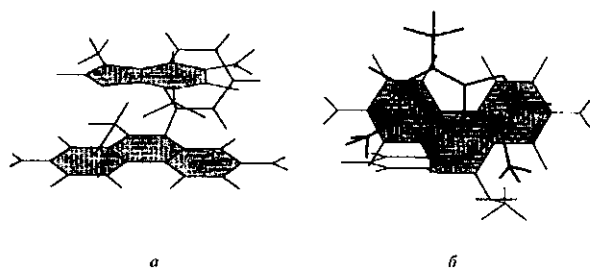


Рис. 4. Расчетная структура 1:1 гетерокомплекса кофеина и бромистого этидия: а — вид на комплекс сбоку (плоскости молекул кофеина и хромофора красителя заштрихованы); б — вид сверху, показывающий взаимное расположение плоскостей молекулы кофеина и хромофора красителя в гетерокомплексе

рокомплекса для аналогичной молекулярной системы, определенной теоретически методом молекулярного моделирования [10].

Термодинамические параметры $\Delta H_{гет}^0$ и $\Delta S_{гет}^0$ гетероассоциации СF и ЕВ определены исходя из

температурных зависимостей протонных химических сдвигов молекул (рис. 3, б) по методике, описанной в [17, 19, 20]. Важно отметить, что энтальпии и энтропии образования гетероассоциатов (табл. 2) принимают промежуточные значения между величинами $\Delta H_{гет}^0$ и $\Delta S_{гет}^0$ самоассоциации СF и ЕВ в водном растворе (см. табл. 1).

Комплексообразование ароматических лигандов с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TpGpCpA). Предварительно выполненные отнесения сигналов протонов дезокситетрануклеотида 5'-d(TpGpCpA) [36], а также протонов СF позволили отождествить спектры смешанных растворов. На рис. 5 представлен спектр 2М-NOE (500 МГц) раствора СF с тетрануклеотидом d(TGCA), полученный при времени смешивания $\tau_m = 200$ мс. Существенно, что в 2М-NOE-спектре при исследованных концентрациях не наблюдаются межмолекулярные кросс-пики между протонами СF и тетрамера. Отсутствие, а точнее сказать, пренебрежимо малая интенсивность кросс-пигов между протонами СF и дезокситетрануклеотида может быть обусловлено следующими причинами: относительно большими расстояниями между протонами СF и d(TGCA) в месте

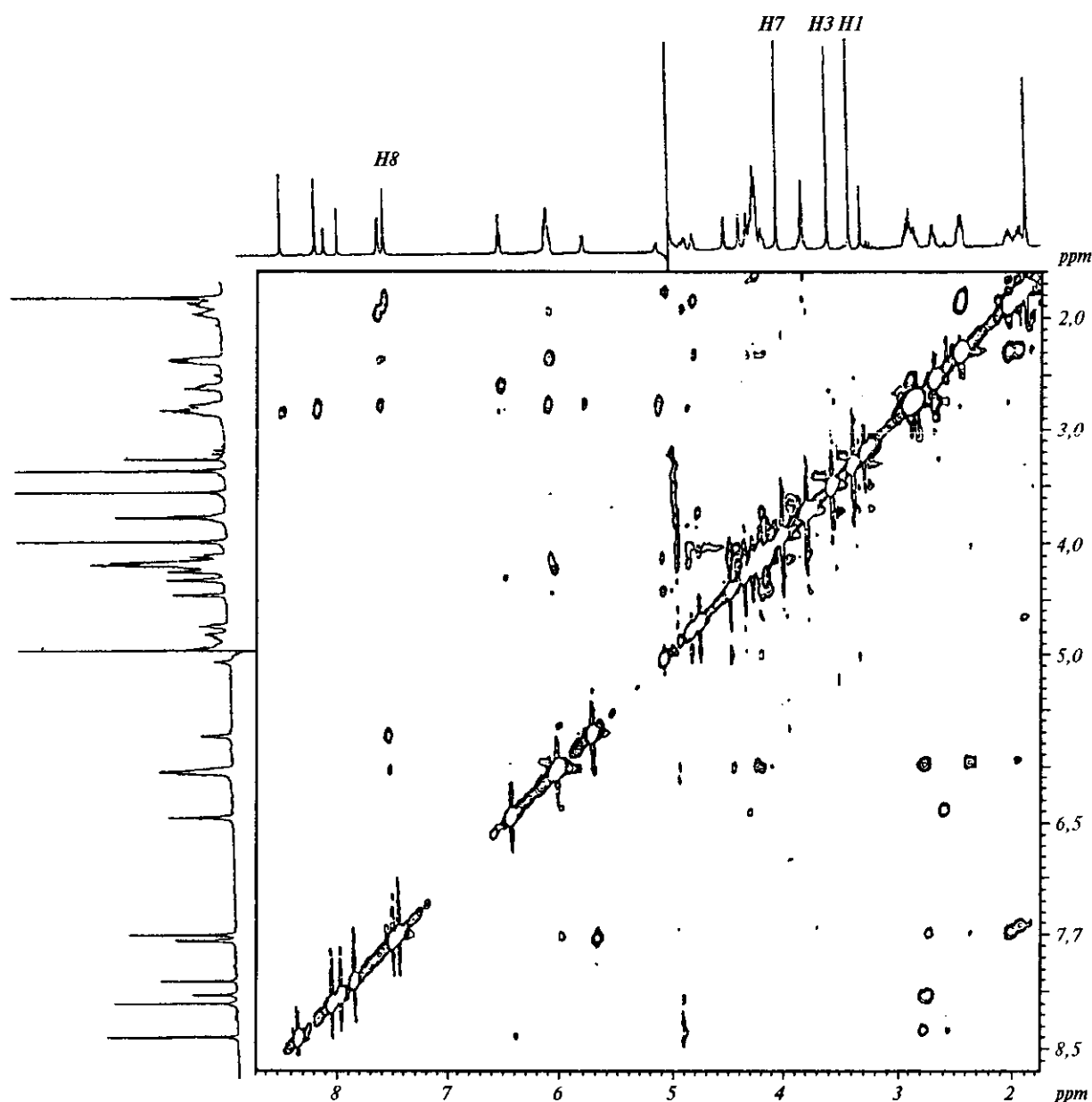


Рис. 5. Контурный 2М-NOESY-спектр (500 МГц, $\tau_m = 200$ мс) раствора дезокситетрануклеотида 5'-d(TrGpCpA) ($N_0 = 1,5$ мМ) и кофеина ($P_0 = 2,2$ мМ) при $T = 298$ К

интеркаляционного связывания лиганда; сложным динамическим равновесием взаимодействующих молекул и их комплексов, приводящим к относительно малому процентному содержанию любого типа комплекса, образующегося в растворе.

Измеренные концентрационные зависимости химических сдвигов протонов CF в растворе с тетрануклеотидом при одной из исследованных температур ($T = 298$ К) представлены на рис. 6. Для количественного анализа взаимодействия CF с

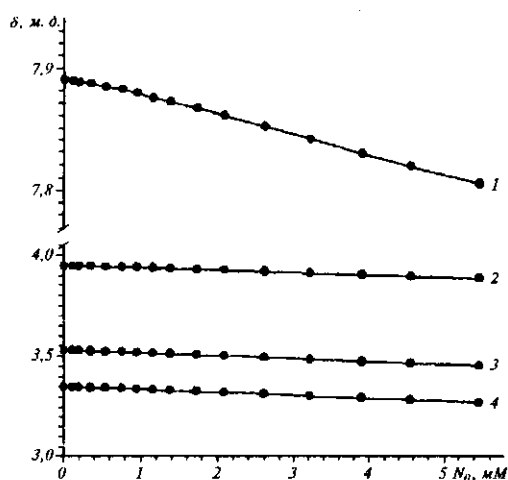
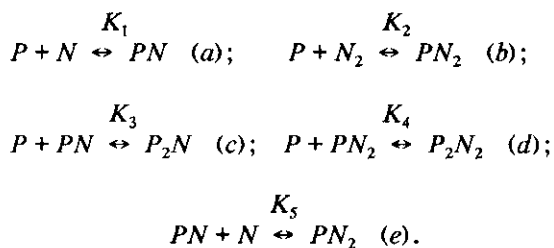


Рис. 6. Экспериментальные зависимости химических сдвигов протонов кофеина в растворе от концентрации тетра-нуклеотида 5'-d(ТрГрСрА) при постоянной концентрации кофеина $P_0 = 2,0$ мМ, $T = 298$ К (1 — Н8; 2 — Н7; 3 — Н3; 4 — Н1)

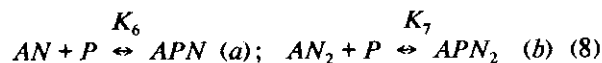
d(TGCA), как и ранее [19, 20, 23], использовали схему образования молекулярных ассоциатов, в которой наряду с реакциями самоассоциации взаимодействующих молекул (1) рассмотрены следующие реакции образования комплексов:



В схеме (7) предусмотрена возможность образования комплекса PN_2 (состава 1:2) CF (P) с тетра-нуклеотидом (N) двумя различными способами — непосредственным связыванием CF с дуплексом (реакция 7, b) и взаимодействием мономера тетра-нуклеотида с 1:1 комплексом PN (реакция 7, e), где CF играет роль «скрепки» [19, 23]. Расчет параметров модели — химических сдвигов протонов CF в составе различных комплексов (1:1 (PN); 1:2 (PN_2); 2:1 (P_2N); 2:2 (P_2N_2)) и равновесных констант их образования проводили с использова-

нием аддитивной модели [19, 20, 23]. Вычислительная процедура нахождения параметров по методу последовательного усложнения модели взаимодействия молекул подробно описана и обсуждалась в ряде работ [19, 20, 23]. В процессе расчетов осуществляли совместную обработку концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов молекул при различных температурах и температурных зависимостей протонов CF в смешанном растворе с тетра-нуклеотидом. Найденные в результате расчетов значения параметров — равновесные константы $K_1 + K_5$ образования комплексов как с мономером, так и с дуплексом тетра-нуклеотида, а также значения предельных химических сдвигов протонов CF в составе комплексов $\delta_1 + \delta_2$ представлены в табл. 3. Там же приведены параметры комплексообразования EB с исследованным тетра-мером в аналогичных экспериментальных условиях, полученные нами ранее с использованием той же самой методики [20]. Обращает на себя внимание тот факт, что равновесные константы комплексообразования CF с мономером и дуплексом d(TGCA) примерно на два порядка меньше соответствующих констант взаимодействия EB с данным тетра-нуклеотидом. Наблюдаемые различия связаны как со структурными особенностями хромофора лиганда, так и с характером его боковых групп и цепей [19, 20, 23].

Расчет относительного содержания комплексов «ДНК—лиганд» в присутствии кофеина в растворе. Знание равновесных констант само- и гетероассоциации CF и EB, а также их комплексообразования с фрагментом ДНК, дезокситетрануклеотидом 5'-d(ТрГрСрА), в одинаковых экспериментальных условиях (табл. 1—3) позволяет рассчитать относительное содержание комплексов ароматического красителя с тетра-нуклеотидом при добавлении CF в раствор и тем самым сделать заключение о молекулярном механизме действия CF на эффективность интеркаляционного связывания ароматических антибиотиков с ДНК в водном растворе. В расчетной схеме наряду с рассмотренными выше реакциями самоассоциации (1), гетероассоциации (4) CF и EB и их комплексообразования (7) с дезокситетрануклеотидом были учтены также реакции образования гетерокомплексов CF и EB с мономером и дуплексом тетра-нуклеотида:



где A , P и — концентрации EB, CF и тетра-нуклеотида соответственно. При этом равновесные константы K_6 и K_7 связывания CF с 1:1 (AN) комплек-

Таблица 3

Расчетные значения параметров комплексообразования кофеина и бромистого этидия с дезокситетрануклеотидом 5'-d(ТрГрСрА) в 0,1 М фосфатном буфере, рD 7,1, T = 298 К

Протон	δ_1 , м. д.	δ_2 , м. д.	δ_3 , м. д.	δ_4 , м. д.	δ_5 , м. д.	δ_m , м. д.
<i>CF + 5'-d(ТрГрСрА)</i>						
H8	7,64	7,51	7,71	7,61	7,58	7,89
H7	3,69	3,67	3,80	3,66	3,64	3,95
H3	3,28	3,23	3,26	3,14	3,29	3,54
H1	3,14	2,91	3,11	3,16	2,98	3,35
<i>EB + 5'-d(ТрГрСрА)</i>						
H1	7,94	7,86	7,88	7,82	7,84	8,69
H10	7,61	7,88	7,82	7,81	7,89	8,63
H9	7,17	6,79	7,02	6,16	6,85	7,66
H4	6,27	6,38	6,75	6,02	6,34	7,55
H2	6,17	6,87	6,90	6,29	6,84	7,48
H7	5,22	5,67	5,89	5,80	5,70	6,67
$K_1, 10^3 \text{ M}^{-1}$	$K_2, 10^3 \text{ M}^{-1}$	$K_3, 10^3 \text{ M}^{-1}$	$K_4, 10^3 \text{ M}^{-1}$	$K_5, 10^3 \text{ M}^{-1}$		
<i>CF + 5'-d(ТрГрСрА)</i>						
0,034±0,004	0,246±0,018	0,060±0,010	0,042±0,015	0,016±0,006		
<i>EB + 5'-d(ТрГрСрА)</i>						
27,3±5,6	72,0±9,0	10,2±3,4	141±25	0,57±0,26		

сом EB + d(TGCA) и 1:2 (AN₂) комплексом EB + d(TGCA)₂ полагали соответственно равными константам K₃ и K₄ в схеме (7). Такое предположение представляется оправданным, так как связывание ароматических лигандов с ДНК отвечает модели «исключенного соседа» [37], согласно которой интеркаляция молекулы лиганда между соседними парами оснований маловероятна, и соответственно взаимное влияние друг на друга лигандов, не содержащих массивных боковых цепей или групп, при их интеркаляционном встраивании в олигонуклеотидную последовательность незначительно.

Вычислительная процедура относительного содержания комплексов различного вида предусмат-

ривает определение равновесных концентраций P, A и N посредством решения системы нелинейных уравнений, составленных с учетом законов действующих масс для реакций (1), (4), (7) и (8) и закона сохранения массы.

На рис. 7 представлены расчетные кривые, показывающие относительное уменьшение содержания комплексов EB с дуплексом дезокситетрануклеотида 5'-d(ТрГрСрА) в зависимости от молярной концентрации тетрануклеотида при добавлении в раствор CF в различных концентрациях. Прежде всего следует отметить, что все расчетные кривые выходят на насыщение при N₀ > 1 мМ, то есть когда концентрация тетрануклеотида превы-

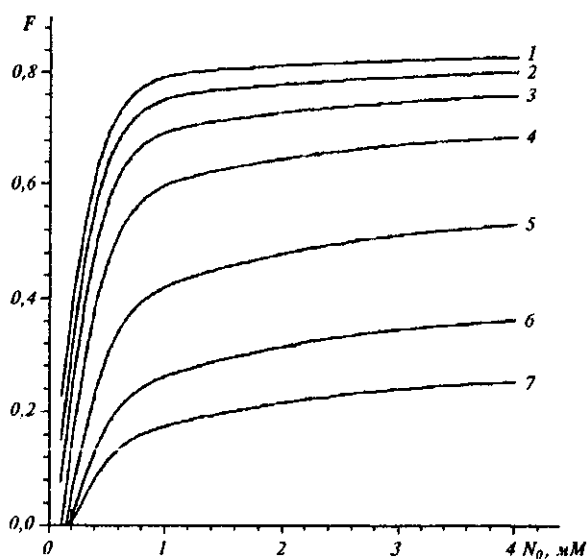


Рис. 7. Относительное снижение содержания комплексов бромистого этидия с дуплексом $5'$ -d(TrGrCpA)₂ в зависимости от концентрации дезокситетрануклеотида при различных концентрациях кофеина в растворе, $T = 298$ К; $P_0 = 100$ (1); 80 (2); 60 (3); 40 (4); 20 (5); 10 (6) и 2 (7) мМ

шает содержание красителя ($A_0 = 1$ мМ) в растворе. При этом степень насыщения кривых существенно зависит от концентрации CF в растворе — наибольшие изменения в комплексообразовании EB с дуплексом тетрауклеотида наблюдаются в области концентраций CF в растворе $P_0 = 2$ —40 мМ; при дальнейшем возрастании процентного содержания CF в растворе ($P_0 \geq 60$ мМ) этот эффект становится менее выраженным. Подобный анализ позволяет, в принципе, для каждого ароматического биологически активного вещества подобрать оптимальную концентрацию CF, обеспечивающую определенное снижение эффективного связывания лиганда с ДНК. Например, при $P_0 = 40$ мМ наблюдается относительное уменьшение содержания комплексов EB с d(TGCA)₂ на 65 %, а при концентрации CF $P_0 = 100$ мМ — на 80 %, то есть при этом эффективность действия интеркалятора на ДНК составляет лишь 20 %.

В чем же состоит молекулярный механизм такого действия CF? Как уже отмечалось, в работах [9—11] сделано предположение о том, что протекторное действие CF при воздействии на клетки интеркалирующих агентов, вызывающих инги-

бирование их роста, связано, главным образом, с формированием гетерокомплексов «CF—лиганд», что приводит к уменьшению эффективной концентрации свободного лиганда в растворе и тем самым к уменьшению его фармакологической активности. Проведенные нами расчеты позволяют проверить правомерность данного предположения. На рис. 8 представлены расчетные зависимости относительного содержания гетерокомплексов APN и APN_2 от концентрации CF в растворе. Видно, что удельный вес таких комплексов возрастает с повышением концентрации CF, то есть CF блокирует места посадки красителя EB на дезокситетрануклеотиде. Для того чтобы выяснить, какой из процессов является преобладающим при воздействии CF на степень связывания интеркалирующего лиганда с ДНК — блокирование мест посадки на олигонуклеотиде или образование гетерокомплекса «CF—лиганд» непосредственно в растворе, — было рассчитано содержание гетерокомплексов «CF—EB» по отношению к комплексам CF с дезокситетрануклеотидом при различных концентрациях CF в смешанном растворе (рис. 8, кривая 4). Из рис. 8

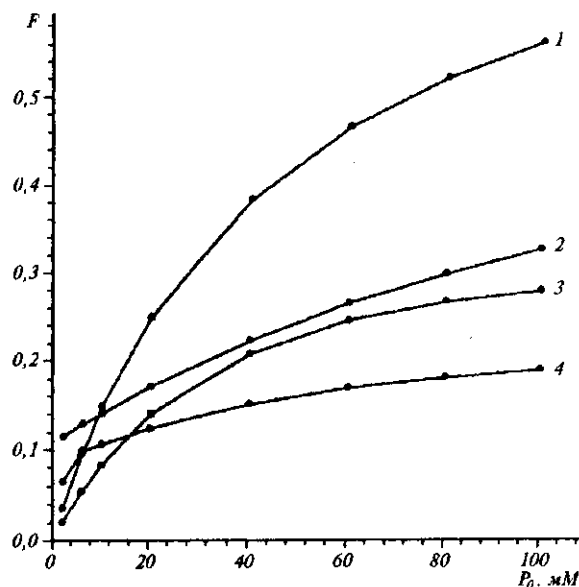


Рис. 8. Относительные содержания комплексов кофеина (CF) и бромистого этидия (EB) с $5'$ -d(TrGrCpA): 1 — комплексы CF с тетрауклеотидом; 2 — гетерокомплекс APN ; 3 — гетерокомплекс APN_2 ; 4 — содержание гетероассоциатов CF—EB по отношению к суммарному содержанию комплексов CF с тетрауклеотидом в зависимости от концентрации кофеина в смешанном растворе при $N_0 = 1.0$ мМ, $T = 298$ К

видно, что даже при максимальной исследованной концентрации $CF P_0 = 100$ мМ вклад гетерокомплекса «CF—EB» в снижение эффективности связывания красителя EB с тетрауклеотидом составляет не больше 20 %. Безусловно, для других интеркаляторов этот вклад может быть иным, что определяется соотношением равновесных констант образования молекулярных ассоциатов в растворе и, в первую очередь, равновесной константой гетероассоциации CF с интеркалирующим лигандом. Тем не менее, вывод, сделанный в [9—11] относительно протекторного действия CF как комплексобразователя — интерцептора («перехватчика») биологически активных ароматических веществ при больших концентрациях CF в растворе, без учета блокирования кофеином мест посадки лиганда на олигонуклеотидную последовательность вряд ли можно считать правомочным и окончательным.

Выражаем благодарность Объединенному исследовательскому центру Лондонского университета за предоставленную возможность в Беркбек колледже использовать для измерений ЯМР-спектрометр 500 МГц.

Д. О. Веселков, Д. Б. Девис, Л. Н. Димант, О. Н. Веселков

Молекулярний механізм потекторної дії кофеїну при комплексоутворенні інтеркалюючого ліганда з ДНК

Резюме

Розглянуто молекулярний механізм дії кофеїну (CF) як комплексоутворювача — інтерцептора ароматичних лігандів, інтеркалюючих у ДНК, на прикладі типового інтеркалятора — фенантридинієвого барвника бромистого етидію (EB). Вивчено процеси само- і гетероасоціації CF і EB, а також їхнього комплексоутворення з дезокситетрануклеотидом 5'-d(TpGpCpA) в однакових експериментальних умовах методом одното двовимірної ¹H-ЯМР спектроскопії (500 МГц). Виміряно концентраційні (при температурах 298 і 308 К) і температурні залежності протонних хімічних зсувів молекул у водному розчині. Визначено рівноважні константи реакцій само- і гетероасоціації CF і EB, утворення різних типів комплексів між CF, EB і тетрауклеотидом d(TGCA) в мономерній та дуплексній формах, а також значення граничних хімічних зсувів протонів ароматичних лігандів у складі асоціатів і комплексів. Розраховано найвірогідніші структури димеру кофеїну і 1:1 гетерокомплексу CF—EB у водному розчині. Здійснено розрахунок відносного вмісту асоціатів і комплексів різного типу в змішаному розчині, який містить CF, EB і d(TGCA). Виявлено особливості динамічної рівноваги гетероасоціатів CF—EB і гетерокомплексів CF—EB—d(TGCA) в залежності від концентрації кофеїну в змішаному розчині. Зроблено висновок стосовно того, що зниження ефективності дії ліганда, інтеркалюючого в ДНК, при додаванні в розчин CF у значній мірі пов'язано з блокуванням молекулами кофеїну місць посадки на олигонуклеотидній послідовності і в меншому ступені — з утворенням гетероасоціатів CF—EB у змішаному розчині.

D. A. Veselkov, D. B. Davies, L. N. Djimant, A. N. Veselkov

Molecular basis of the protective action of caffeine on the complexation of intercalating ligands with DNA

Summary

Molecular mechanism of caffeine (CF) action as a complex-forming agent — interceptor of aromatic ligands intercalating into DNA has been examined using as an example a typical intercalator, the phenanthridinium dye, ethidium bromide (EB). Self-association and hetero-association of CF and EB as well as their complexation with deoxytetranucleotide 5'-d(TpGpCpA) under the same experimental conditions have been studied using one- and two-dimensional ¹H NMR spectroscopy (500 MHz). The concentration dependencies (at 298 K and 308 K) and temperature dependencies of the proton chemical shifts of the molecules in aqueous solution have been measured. Equilibrium constants of self-association and hetero-association of CF and EB as well as equilibrium constants of formation of different complexes between CF, EB and monomer and duplex forms of deoxytetranucleotide d(TGCA) have been determined. The limiting proton chemical shifts of the aromatic ligands in different associates and complexes have been calculated. The most favourable structures of caffeine dimer and 1:1 CF+EB hetero-complex in aqueous solution have been constructed. The relative content of different types of associates and complexes in the mixed solution containing CF, EB and d(TGCA) has been calculated. Specific features of the dynamic equilibrium between the hetero-associates of CF and EB and their hetero-complexes with d(TGCA), i. e. CF-EB-d(TGCA), have been revealed as a function of concentration of caffeine in the mixed solution. It has been concluded that the decrease in the efficacy of the action of the ligand intercalating into DNA upon the CF addition in the solution is mostly due to the competition for the binding sites of oligonucleotide sequence by caffeine molecules and less — to the formation of CF-EB hetero-association complexes in the mixed solution.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. O'Neil F. J. Differential effects of cytochalasin B and caffeine on control of DNA synthesis in normal and transformed cells // J. Cell Physiol.—1979.—101.—P. 201—218.
2. Selby C. P., Sancae A. Molecular mechanism of DNA repair inhibition by caffeine // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1990.—87.—P. 3522—3525.
3. Kunicka J. E., Myc A., Melamed M. R., Darzynkiewicz Z. Caffeine increases sensitivity of DNA to denaturation in chromatin of L1210 cells // Cell Tissue Kinet.—1990.—23.—P. 31—39.
4. Fritzsche H., Petri I., Schutz H., Weller K., Sedrema P., Lang H. On the interaction of caffeine with nucleic acids. III. ¹H NMR studies of caffeine-5'-adenosine monophosphate and caffeine-poly (riboadenylate) interactions // Biophys. Chem.—1980.—11.—P. 109—119.
5. Kimura H., Aoyama T. Decrease in sensitivity to ethidium bromide by caffeine, dimethylsulfoxide or 3-aminobenzamide due to reduced permeability // J. Pharmacobiodyn.—1989.—12.—P. 589—595.
6. Ross W. E., Zwelling L. A., Kohn K. W. Relationship between cytotoxicity and DNA strand breakage by adriamycin and other intercalating agents // Int. J. Radiat. Biol. Phys.—1979.—5.—P. 1221—1224.
7. Ganapathi R., Grabowski D., Schmidt H., Yen A., Iliakis G. Modulation of adriamycin and N-trifluoroacetyl-adriamycin-14-valerate induced effects on cell cycle traverse and cytotoxicity in P388 mouse leukemia cells by caffeine and the calmodulin inhibitor trifluopirazine // Cancer Res.—1979.—46.—P. 5553—5557.

8. Iliakis G., Nusse M., Ganapathi R., Egner J., Yen A. Differential reduction by caffeine of adriamycin induced cell killing and cell cycle delay in Chinese V79 cells // *Int. J. Radiat. Biol. Phys.*—1986.—12.—P. 1987—1995.
9. Traganos F., Karpuscinski J., Darzynkiewicz Z. Caffeine modulates the effects of DNA-intercalating drug *in vitro*: A flow cytometric and spectrophotometric analysis of caffeine interaction with novatrone, doxorubicin, ellipticine and doxorubicin analogue AD198 // *Cancer Res.*—1991.—51.—P. 3682—3689.
10. Larsen R. W., Jasuja R., Hetzler R., Muraoka P. T., Andrada V. G., Jameson D. M. Spectroscopic and molecular modelling studies of caffeine complexes with DNA intercalators // *Biophys. J.*—1996.—70.—P. 443—452.
11. Karpuscinski J., Kimmel M. Thermodynamical model of mixed aggregation of intercalators with caffeine in aqueous solution // *Biophys. Chem.*—1993.—46.—P. 153—163.
12. Weller K., Shutz H., Petri I. Thermodynamical model of indefinite mixed association of two components and NMR data analysis for caffeine-AMP interaction // *Biophys. Chem.*—1984.—19.—P. 289—298.
13. Baxter N. J., Williamson M. P., Lilley T. H., Haslam E. Stacking interaction between caffeine and methyl gallate // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1996.—92.—P. 231—234.
14. Aradi F., Foldesi A. Equilibrium constants for association of caffeine and theophylline with solutions studied by ^1H NMR chemical shifts measurements // *Magn. Res. Chem.*—1985.—23.—P. 375—378.
15. Aradi F., Foldesi A. Hetero-association of caffeine and theophylline with purine and pyrimidine in aqueous solutions studied by ^1H NMR chemical shifts measurements // *Magn. Res. Chem.*—1989.—27.—P. 249—252.
16. Chen J.-S., Shiao J.-Ch. Graphic method for determination of the complex NMR shift and equilibrium constant for a hetero-association accompanying a self-association // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1994.—90.—P. 429—433.
17. Davies D. B., Veselkov D. A., Veselkov A. N. Structure and thermodynamics of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution determined by NMR spectroscopy // *Mol. Phys.*—1999.—97.—P. 439—451.
18. Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N. ^1H NMR investigation of self-association of aromatic drug molecules in aqueous solution. Structural and thermodynamical analysis // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1996.—92.—P. 383—390.
19. Davies D. B., Veselkov A. N. Structural and thermodynamical analysis of molecular complexation by ^1H NMR spectroscopy // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1996.—92.—P. 3545—3557.
20. Davies D. B., Karawajew L., Veselkov A. N. ^1H NMR structural analysis of ethidium bromide complexation with self-complementary deoxytetranucleotides 5'-d(ApCpGpT), 5'-d(ApGpCpT) and 5'-d(TpGpCpA) in aqueous solution // *Biopolymers.*—1996.—38.—P. 745—757.
21. Lilley T. H., Linsdell H., Maestre A. Association of caffeine in water and in aqueous solutions of sucrose // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1992.—88.—P. 2865—2870.
22. Bresloff J. L., Crothers D. M. Equilibrium studies of ethidium-poly-nucleotide interaction // *Biochemistry.*—1981.—20.—P. 3547—3553.
23. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Болотин П. А., Барановский С. Ф., Паркес Х., Дэвис Д. Исследование взаимодействия бромистого этидия с дезокситетрануклеозидтрифосфатом 5'-d(GpCpGpC) методом ^1H -ЯМР-спектроскопии // *Молекуляр. биология.*—1995.—29.—С. 326—338.
24. Kan L.-S., Borer P. N., Cheng D. M., Ts'o P. O. P. ^1H - and ^{13}C -NMR studies on caffeine and its interaction with nucleic acids // *Biopolymers.*—1980.—19.—P. 1641—1654.
25. Horman I., Dreux B. Estimation of dimerization constants from complexation induced displacements of ^1H NMR chemical shifts: dimerization of caffeine // *Helv. Chim. Acta.*—1983.—67.—P. 754—764.
26. Sitkavski J., Stefaniak L., Nicol L., Martin M. L., Martin G. J., Webb G. A. Complete assignments of the ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR spectra of caffeine // *Spectrochim. Acta.*—1995.—51A.—P. 839—841.
27. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Барановский С. Ф., Болотин П. А., Паркес Х. Е., Дэвис Д. Б. Исследование самоассоциации бромистого этидия в водном растворе методом ^1H -ЯМР-спектроскопии // *Хим. физика.*—1994.—13.—С. 70—78.
28. Veselkov A. N., Djimant L. N., Karawajew L., Kulikov E. L. Investigation of the aggregation of acridine dyes in aqueous solution by proton NMR // *Stud. Biophys.*—1985.—106.—P. 171—180.
29. Zahalka J., Donbrow M., Yanuka Y. Study of self-association of 7-alkylxanthines by nuclear magnetic resonance spectroscopy // *J. Chem. Res.*—1993.—72.—P. 2429—2447.
30. Falk M., Gil M., Iza N. Self-association of caffeine in aqueous solution: an FT-IR study // *Can. J. Chem.*—1990.—68.—P. 1293—1299.
31. Веселков А. Н., Дымант Л. Н. Учет кооперативности в модели самоассоциации акридиновых красителей // *Хим. физика.*—1988.—7.—С. 711—713.
32. Giessner-Prettre C., Pullman B. Quantum mechanical calculations of NMR chemical shifts in nucleic acids // *Quart. Rev. Biophys.*—1987.—20.—P. 113—172.
33. Шестопалова А. В., Данилов В. И., Малеев В. Я. Природа стопкообразования молекул кофеина в воде. Изучение методом Монте-Карло // *Докл. АН СССР.*—1985.—282.—С. 1000—1003.
34. Danilov V. I., Shestopalova A. V. Hydrophobic effect in biological associates: a Monte-Carlo simulation of caffeine molecules stacking // *Int. J. Quant. Chem.*—1989.—35.—P. 103—112.
35. Falk M., Chew W., Walter J. A., Kwiatkowski W., Barclay K. D., Klassen G. A. Molecular modelling and NMR studies of the caffeine dimer // *Can. J. Chem.*—1998.—76.—P. 48—56.
36. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Кадинцев В. В., Лисютин В. А., Паркес Х., Дэвис Д. Б. Исследование самоассоциации молекул дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов d(TpGpCpA) в водном растворе методом ^1H -ЯМР-спектроскопии // *Биофизика.*—1995.—40.—С. 283—292.
37. McGhee J. D., von Hippel P. H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions. Cooperative and noncooperative binding of large ligands to one dimensional homogeneous lattice // *J. Mol. Biol.*—1974.—86.—P. 463—489.

УДК 577.113

Поступила в редакцию 17.06.99