

С.Ю. КУТОВИЙ,¹ Р.С. САВЧУК,¹ Н.В. БАШМАКОВА,¹ Д.М. ГОВОРУН,²
Л.А. ЗАЙКА²

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, фізичний факультет
(Вул. Володимирська 60, Київ 01601; e-mail: sanguinaire@gmail.com)

² Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
(Вул. Академіка Заболотного 150, Київ 03680)

МЕХАНІЗМИ ТА ПАРАМЕТРИ ЗВ'ЯЗУВАННЯ АМІТОЗИНОБЕРАМІДУ З ДНК У ВОДНОМУ РОЗЧИНІ

УДК 539

Методами оптичної спектроскопії – електронного поглинання та флюоресценції досліджено процеси взаємодії препарату амітозинобераміду (алкілований тіотефом берберин) з макромолекулою ДНК, у водному розчині. На основі отриманих результатів побудовано залежності спектральних характеристик від N/c – відношення концентрації пар основ ДНК до концентрації молекул ліганду. Користуючись системою модифікованих рівнянь Скетчарда та МакГі–фон Хіппеля, визначено параметри зв'язування амітозинобераміду з ДНК. Проведено порівняльний аналіз ефективності взаємодії з ДНК амітозинобераміду та алкалоїдів берберину і сангвінаріну. Методом функціонала густини на рівні теорії DFT B3LYP/6-31G(d,p) розраховано структуру та спектри електронного поглинання молекул тіотефу, берберину та амітозинобераміду.

Ключові слова: ДНК, амітозиноберамід, берберин, тіотеф, рівняння зв'язування МакГі–фон Хіппеля.

1. Вступ

Дослідження зв'язування різноманітних сполук з макромолекулою ДНК має широкий спектр застосувань. Так, вивчення взаємодії з ДНК низькомолекулярних лігандів важливе при створенні протипухлинних та імуномодуючих медичних препаратів, флюоресцентних зондів тощо.

Створення малотоксичних препаратів з широкою терапевтичною дією є важливим завданням сучасної фармації. Його неможливо успішно реалізувати без розуміння фізичних механізмів взаємодії цих сполук з ДНК на молекулярному рівні. До таких препаратів належить низка алкалоїдів чистотілу (наприклад, берберин, сангвінарін і т.д.), які проявляють протівірусні, протизапальні, бактеріцидні [1, 2] і протипухлинні [3–7] властивості. Завдяки рослинному походженню ці алкалоїди мають відносно низьку токсичність. Протипухлинну дію алкалоїдів пов'язують з їхньою здатністю вбудовуватися у подвійну спіраль ДНК, порушуючи та блокуючи тим самим її функції.

Ця робота є логічним продовженням наших попередніх досліджень [8–12], спрямованих на вивчення оптичними методами (електронне поглинання, флюоресценція (ФЛ), КРС) взаємодії макромолекули ДНК з низькомолекулярними сполуками. У цій роботі основну увагу приділено вивченню взаємодії препарату амітозинобераміду (алкілований тіотефом алкалоїд чистотілу берберин) з макромолекулою ДНК, у водному розчині. Оскільки амітозиноберамід (власне, модифікований берберин) як медичний препарат є розвитком своїх попередників, зокрема берберину та амітозину (комплексного препарату, до складу якого входять алкалоїди чистотілу, в тому числі берберин і сангвінарін), доцільно провести порівняльний аналіз взаємодії з ДНК амітозинобераміду та раніше досліджених нами алкалоїдів берберину і сангвінаріну [8–11]. Як показали останні дослідження, модифіковані алкалоїди, серед яких і модифікований берберин [13, 14], зв'язуються з ДНК ефективніше. Систематичних досліджень фізичними методами, зокрема, методами оптичної спектроскопії, направлених на вивчення взаємодії амітозинобераміду з ДНК, раніше не проводилось.

© С.Ю. КУТОВИЙ, Р.С. САВЧУК,
Н.В. БАШМАКОВА, Д.М. ГОВОРУН,
Л.А. ЗАЙКА, 2018

Амітозиноберамід N',N'',N''' -три- (Nберберино-етиленамід) тіофосфорної кислоти – препарат, отриманий в ІМБГ НАН України в результаті алкілювання берберину, алкалоїду групи ізохінолінів, тіотефом [15] (тобто амітозиноберамід є модифікованим берберином). Формула берберину $C_{20}H_{19}NO_5$, він має три ненасичених кільця та одне частково насичене, що містить заряджений атом азоту N^+ . За рахунок частково насиченого кільця молекула берберину дещо вигнута та має форму напівкрісла [16, 17]. Тіотеф (тіофосфамід, 1,1',1''-фосфоротіоїлектріазиридин) – фосфоорганічний алкілюючий агент, як медичний препарат, проявляє протипухлинну активність, хоча є дуже токсичним [18]. Формула тіотефу – $SP(NC_2H_4)_3$. Він сформований трьома молекулами азиридину, зв'язаними з атомами фосфору та сірки. До берберину приєднується через атом С13.

Структурні формули молекул берберину, тіотефу та амітозинобераміду наведено на рис. 1.

У роботі отримано залежності спектральних характеристик амітозинобераміду та, як допоміжні результати, тіотефу від N/c (відношення кількості пар основ ДНК до кількості молекул лігандів; інше, широко вживане позначення – P/D , тобто *Phosphate/Drug*). Зафіксовано спектральні прояви взаємодії амітозинобераміду (та тіотефу) з ДНК. Дані, отримані спектральними методами, використано для розрахунку параметрів зв'язування за допомогою системи модифікованих рівнянь Скетчарда та МакГі-фон Хіппеля.

2. Зразки та методика експерименту

У роботі використовувалися водні розчини препаратів амітозиноберамід (AmBe, ІМБГ НАН України) та тіофосфамід (Тіо, ІМБГ НАН України). Використано ДНК тимусу бика, *calf thymus* (“Serva”, Німеччина); середня молярна маса пари основ ~ 650 г/Моль, високий ступінь очищення. Також, в допоміжних експериментах, використовувалася ДНК молоків лосося, *salmon sperm* (“Sigma-Aldrich”, США), низького ступеня очищення (7% білків). Як розчинник використовували воду для ін'єкцій (“Дарниця”, Україна). Всі досліджені речовини використовувалися без подальшого очищення. Зразки готувалися за допомогою механічних самплерів типу “MicroPette” (“ULAB”, Україна). Маса наважки визначалася за допомогою аналі-

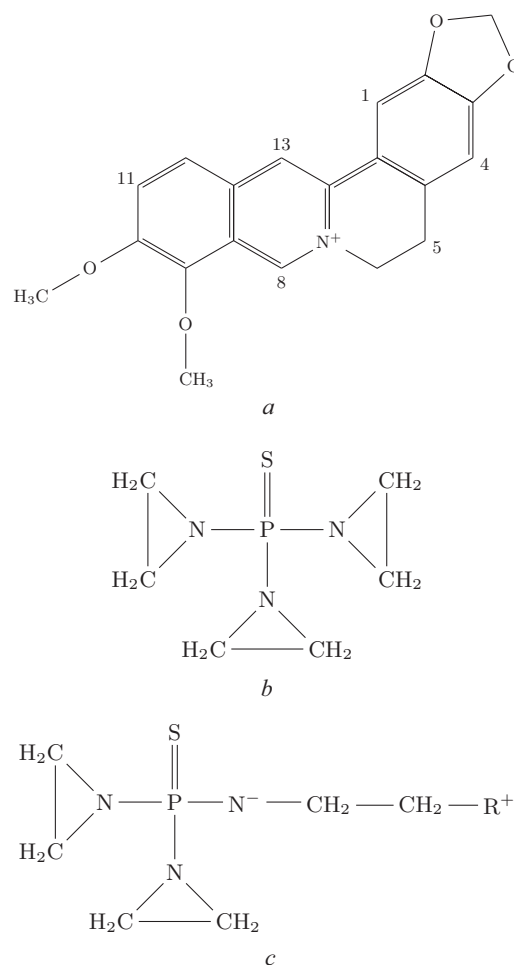


Рис. 1. Структурні формули берберину (а), тіотефу (b) та амітозинобераміду (с), R^+ -берберин

тичних торсійних вагів “Techniprot WT” (Польща), точність яких становить 0,02 мг. Стокові (концентровані) розчини досліджуваних препаратів та ДНК готувалися шляхом розчинення наважки препарату у воді.

При отриманні концентраційних залежностей розчинів AmBe + ДНК, Тіо + ДНК концентрація препарату залишалась незмінною, а варіювалась концентрація ДНК. Співвідношення молярних концентрацій ДНК та препарату (N/c) виражалася у кількості пар нуклеотидів ДНК на одну молекулу ліганду.

Спектри поглинання отримано за допомогою спектрофотометра ‘Specord UV VIS’ (Carl Zeiss, Німеччина) в діапазоні 200–700 нм. Спектраль-

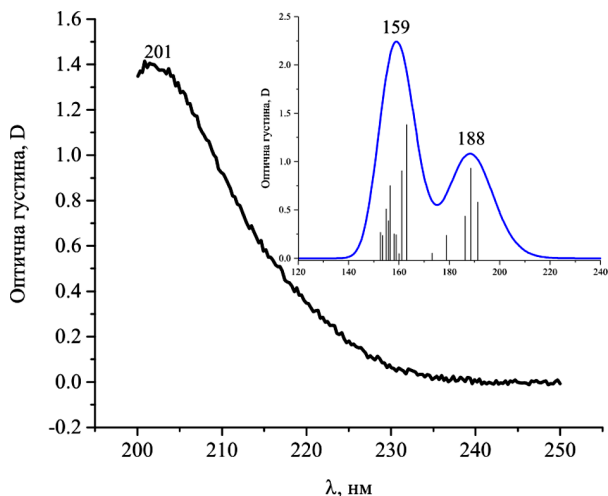


Рис. 2. Спектри поглинання тіотетфу, експериментальний, та розрахований методом DFT (вставка)

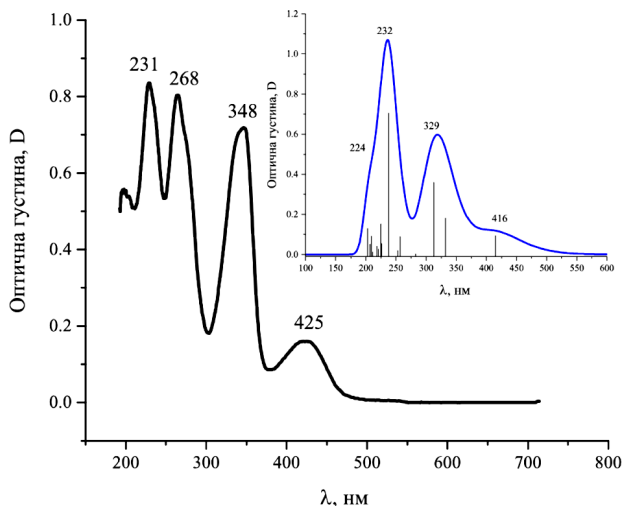


Рис. 3. Спектри поглинання берберину, експериментальний [8], та розрахований методом DFT (вставка)

не розділення становило ~ 1 нм. Спектри флюоресценції отримано за допомогою флюориметра ‘Sary Eclipse’ (Varian, Австралія) в діапазоні 300–800 нм. Спектральна ширина щілини для вимірів параметрів флюоресценції становила 5 нм.

3. Експериментальні результати

Характерними проявами взаємодії малих лігандів з ДНК в спектрах поглинання та флюоресценції є гіпо- чи гіперхромізм смуг поглинання ліганду, “червоний” або “блакитний” зсуви максимумів по-

глинання та флюоресценції, зміна квантового виходу флюоресценції.

3.1. Поглинання

3.1.1. Тіотетф

Експериментальний спектр поглинання тіотетфу лежить в області $\lambda \leq 230$ нм, максимум смуги міститься при ≤ 200 нм, тобто реєстрація проводилась на межі можливостей приладу “Spercord UV VIS”. Тому було проведено розрахунок спектра поглинання тіотетфу (після оптимізації структури молекули) методом функціонала густини на рівні теорії DFT B3LYP/6-31G(d,p). З урахуванням того, що чисельні методи розрахунку дають дещо зміщені значення положень максимумів поглинання, можна сказати, що результати розрахунку та експерименту корелюють досить добре. Розрахована складна дублетна смуга поглинання тіотетфу лежить в області 140–220 нм, з основними максимумами при ~ 160 нм та ~ 190 нм; її довгохвильова компонента практично збігається з положенням експериментальної смуги з максимумом при ~ 200 нм. На рис. 2 наведено експериментальний та розрахований спектри електронного поглинання тіотетфу.

3.1.2. Берберин

Прояви в оптичних спектрах взаємодії берберину з ДНК описано в наших роботах [8, 9], тут ми для повноти викладу наведемо лише спектри електронного поглинання (рис. 3).

Спектр поглинання берберину лежить в області $\lambda \leq 500$ нм, його перший довгохвильовий максимум знаходиться на $\lambda_{\text{max}} \simeq 425$ нм. Далі розміщуються (в області 200–400 нм) три складні, як мінімум, двокомпонентні смуги поглинання з максимумами на ~ 348 , ~ 268 та ~ 231 нм.

Розрахований методом DFT спектр поглинання берберину містить також чотири смуги, див. рис. 3 (вставка). Видно добру кореляцію між експериментальним та розрахованим спектрами.

При додаванні ДНК зі зростанням N/c в спектрах спостерігаються гіпохромні зміни оптичної густини (до 30%) та “червоний” зсув максимумів поглинання, до 22 нм [8].

3.1.3. Амітозиноберамід

Щоб уникнути явищ реабсорбції та агрегації, концентрації AmBe для вимірювання спектрів погли-

нання не перевищували 10^{-3} Моль/л. В діапазоні досліджуваних концентрацій спостерігалася лінійна залежність оптичної густини в максимумах смуг поглинання AmBe від концентрації, тобто виконувався закон Бугера–Ламберта–Бера і розчин був молекулярним.

Спектр поглинання амітозинобераміду (рис. 4) лежить в області до 600 нм, в ньому проявляються кілька складних смуг, серед них дві довгохвильові смуги з максимумами при ~ 420 нм та ~ 344 нм. При додаванні ДНК зі зростанням N/c для обох цих смуг спостерігаються зміни оптичної густини та “червоний” зсув максимумів поглинання, при цьому відносні зміни для довгохвильової смуги 420 нм більші. Ці зміни вказують на взаємодію ліганду з ДНК, а також на можливе зв'язування.

Величини “червоного” зсуву досягають ~ 15 нм для смуги 344 нм та ~ 20 нм для смуги 420 нм, при цьому характер зміни величини зсуву немонотонний – спочатку швидко зростання до максимального значення, далі зменшення і вихід на полицю.

Оптична густина обох смуг поглинання змінювалася також немонотонно (рис. 5). Характер зміни оптичної густини подібний до зміни величини “червоного” зсуву. При малих N/c (< 2) спостерігався гіпохромний ефект (зменшення оптичної густини), при $N/c \geq 2$ – гіперхромний (збільшення оптичної густини), що вказує на різні способи комплексоутворення за різних значень N/c .

Зазначимо, що подібний тип залежностей від N/c спостерігався і для змін інтенсивності флуоресценції, див. далі.

З порівняння спектрів поглинання тіотефу, берберину та амітозинобераміду можна зробити висновок про те, що смуга поглинання амітозинобераміду в околі 220–200 нм зумовлена “тіотефною” частиною молекули амітозинобераміду, решта, більш довгохвильових смуг – “бербериновою”. Смуги поглинання AmBe зсунуті в короткохвильовий бік відносно відповідних смуг Be на 3–5 нм. Це підтверджується і розрахунками методом DFT.

3.2. Флуоресценція

3.2.1. Тіотеф

Для кращого розуміння процесів взаємодії амітозинобераміду з ДНК проведено допоміжні експерименти з вивчення взаємодії з ДНК одного

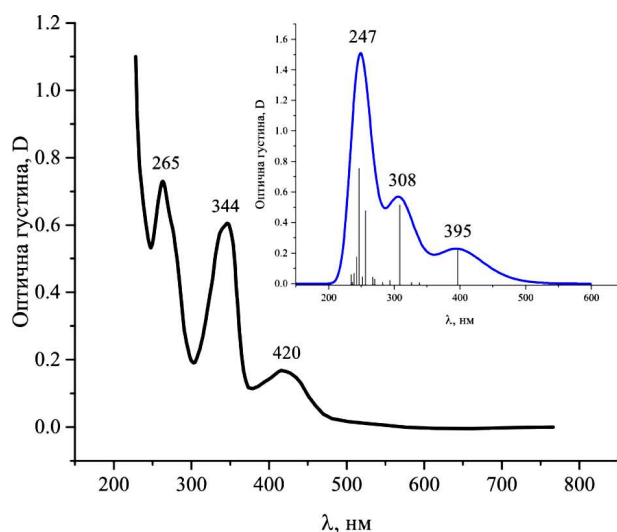


Рис. 4. Спектри поглинання амітозинобераміду, експериментальний, та розрахований методом DFT (вставка)

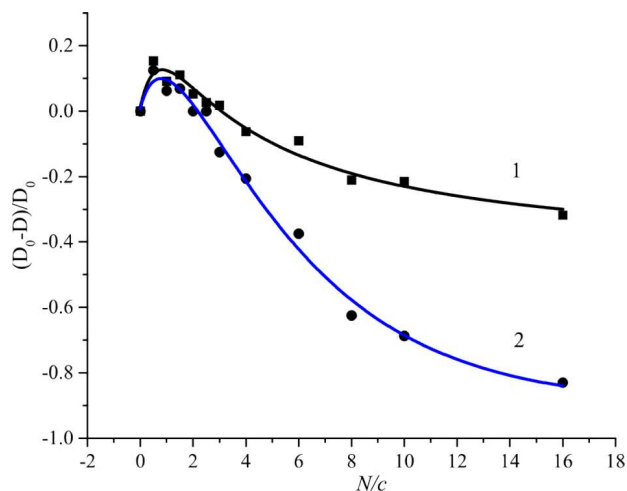


Рис. 5. Зміни оптичної густини амітозинобераміду в залежності від N/c : 1 – смуга 344 нм, 2 – смуга 420 нм

з компонентів амітозинобераміду – тіофосфаміду, який є малою молекулою, що взаємодіє з ДНК. Спектр флуоресценції тіотефу лежить в області 300–600 нм, складається з двох близьких нерозділених смуг складної структури з максимумом ~ 410 нм (див. рис. 6).

Флуоресценція комплексу тіотеф–ДНК характеризується підсиленням інтенсивності випромінювання у 10–20 разів (рис. 7) (в залежності від λ збудження, концентрації, типу ДНК) у порівнянні з вільним тіотефом.

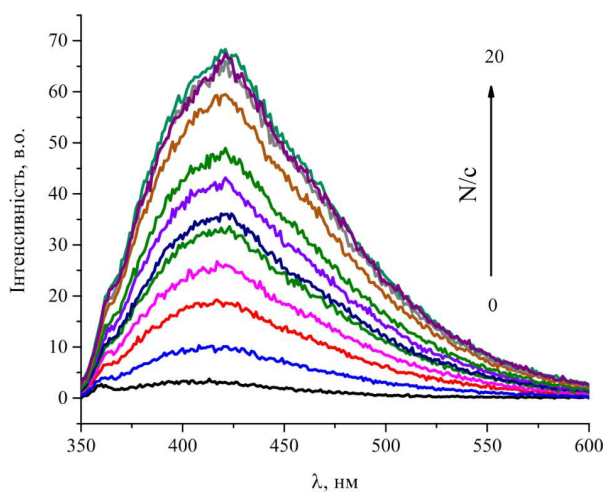


Рис. 6. Спектри флюоресценції тіофлавіну Т залежно від N/c . Концентрація тіофлавіну Т – $1,06 \cdot 10^{-3}$ М, $\lambda_{\text{ex}} = 260$ нм, $N/c = 0-20$

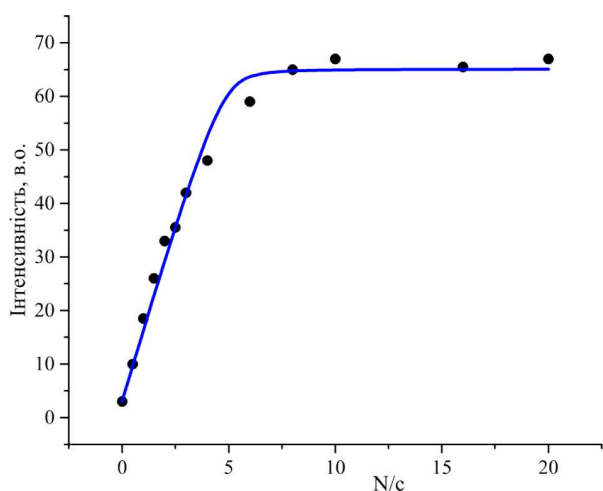


Рис. 7. Зміни інтенсивності флюоресценції тіофлавіну Т в залежності від N/c

Також спостерігається зсув максимуму флюоресценції до ~ 10 нм в червону область.

3.2.2. Берберин

Спектр флюоресценції берберину лежить в області 450–700 нм, складається з двох близьких нерозділених смуг складної структури з максимумом ~ 556 нм (рис. 8)

Флюоресценція комплексу берберин–ДНК характеризується підсиленням інтенсивності випромінювання у 100–200 разів (рис. 9) (залежно від λ збудження, концентрації, типу ДНК) у порівнянні

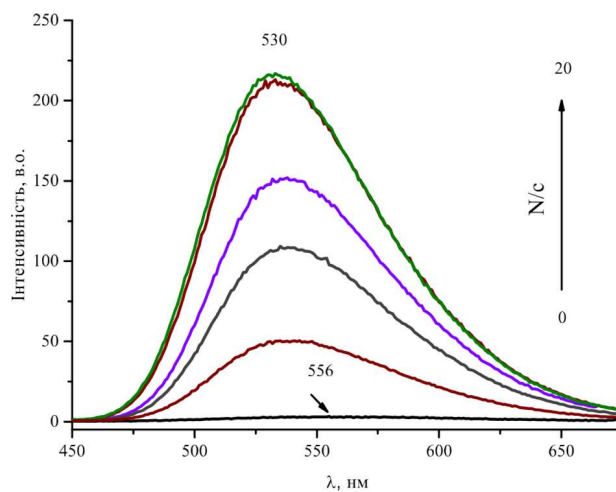


Рис. 8. Спектри флюоресценції берберину [8] залежно від N/c . Концентрація берберину – $4,1 \cdot 10^{-5}$ М, $\lambda_{\text{ex}} = 450$ нм, $N/c = 0-20$

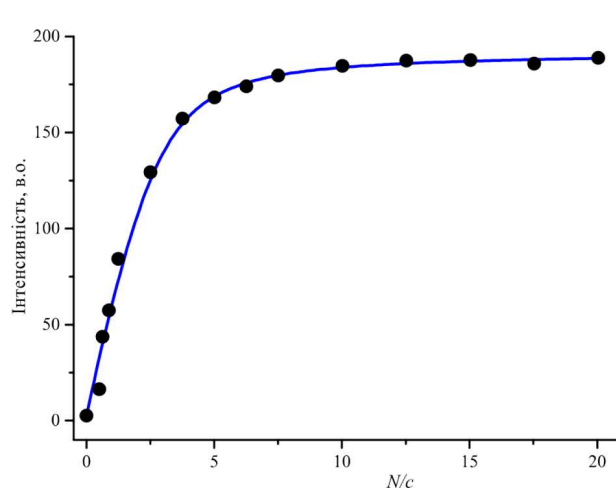


Рис. 9. Зміни інтенсивності флюоресценції берберину [8] в залежності від N/c

з вільним берберином. Також спостерігається зсув максимуму флюоресценції до ~ 30 нм в “блакитну” область.

Зростання інтенсивності флюоресценції відбувається внаслідок фіксації молекул ліганду на матриці ДНК. При утворенні такого комплексу зменшується кількість коливальних ступенів вільності, що призводить до зменшення імовірності безвипромінювальної релаксації збудження, коливальна релаксація за час збудженого стану, ϵ , відповідно, теж менш ефективною. В результаті квантовий вихід флюоресценції зростає.

3.2.3. Амітозиноберамід

Спектр флюоресценції амітозинобераміду складається з двох складних смуг: короткохвильової з максимумом близько 375 нм (при $N/c = 0$) та довгохвильової з максимумом 550 нм (рис. 10). Положення короткохвильової смуги практично збігається зі смугою флюоресценції тіотефу, а довгохвильова смуга схожа за формою та близька за положенням до смуги флюоресценції берберину [9]. Враховуючи це, а також проаналізувавши спектри збудження флюоресценції, можна зробити висновок про те, що в спектрі флюоресценції AmBe можна окремо виділити випромінювання “тіотефної” та “берберинової” частин молекули, передача збудження між якими утруднена.

При додаванні ДНК в спектрах спостерігаються зміни: інтенсивність випромінювання зростає, максимуми зміщуються (“тіотефна” смуга 375 нм до 10 нм в “червону” область, “берберінова” смуга 550 нм – до 20 нм в “блакитну”, що відповідає і поведінці смуг ФЛ тіотефу та берберину). Як і в спектрах поглинання, зміни інтенсивності флюоресценції амітозинобераміду та зсуви максимумів смуг при додаванні ДНК мають немонотонний характер залежно від N/c , а саме – при малих його значеннях ($N/c \leq 1$) спостерігається різке зростання інтенсивності до її максимуму, після цього інтенсивність зменшується та виходить на полицю. Зміни інтенсивності ФЛ та зсуви положень максимумів смуг спостерігаються для обох смуг ФЛ AmBe (рис. 11), отже, можна припустити, що обидві частини молекули AmBe беруть участь у процесах взаємодії з ДНК.

4. Параметри зв'язування

Для визначення параметрів зв'язування використано розроблену нами програму *BindFit*, яка дозволяє працювати з прямими експериментальними даними без “лінеаризаційних” перетворень. Це дозволяє підвищити точність визначення параметрів для процесів, які й після лінеаризації характеризуються нелінійною кривою зв'язування. Головним принципом роботи цієї програми є апроксимація експериментальних даних за допомогою відповідних рівнянь зв'язування.

Класичним рівнянням зв'язування є рівняння Скетчарда [19]:

$$\frac{\nu}{c_f} = K(1 - \nu). \quad (1)$$

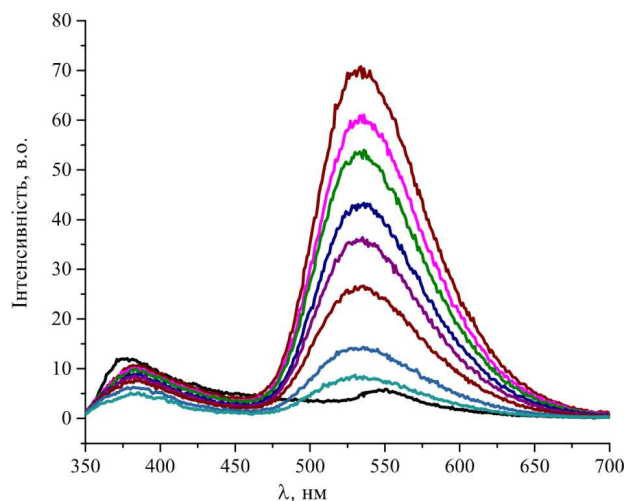


Рис. 10. Спектри флюоресценції амітозинобераміду при різних значеннях N/c . Концентрація AmBeг – $4,24 \cdot 10^{-4}$ М, $\lambda_{\text{ex}} = 300$ нм, $N/c = 0-16$

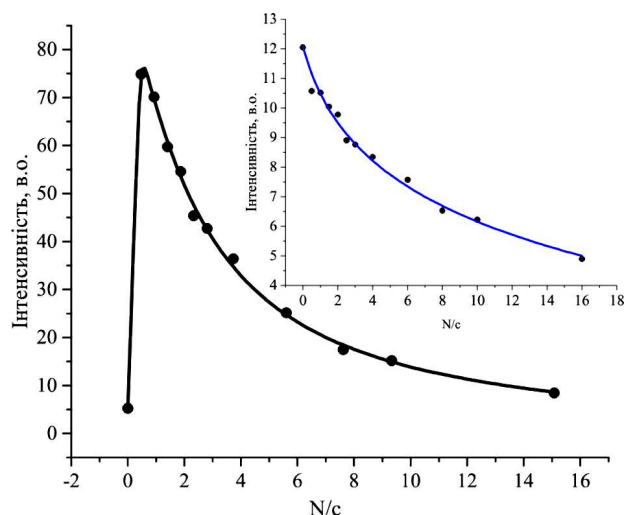


Рис. 11. Зміни інтенсивності смуг флюоресценції амітозинобераміду – 550 нм та 375 нм (вставка) залежно від N/c

Тут ν – співвідношення між концентрацією зв'язаних лігандів c_b і загальною кількістю місць зв'язування N , c_f – концентрація вільних лігандів і K – константа зв'язування.

Видно, що залежність ν/c_f від ν має бути лінійною, а константа зв'язування визначається з нахилу прямої. Якщо молекула ліганду займає більше, ніж одне місце зв'язування на матриці (а саме n місць), рівняння пишуть у вигляді:

$$\frac{\nu}{c_f} = K(1 - n\nu). \quad (2)$$

Початково рівняння було розроблене для білків, і застосування цих рівнянь для аналізу зв'язування з ДНК не завжди коректне – через недооцінку вільних місць зв'язування параметри зв'язування визначаються невірно (так, наприклад, значення константи зв'язування може завищуватись в $\sim 2n$ разів [20]). При цьому, для процесів зв'язування малих лігандів з ДНК ці залежності і після лінеаризації, як правило, нелінійні.

МакГі та фон Хіпшель [20] методами теорії імовірності поширили підхід Скетчарда для випадків $n > 1$, кількість вільних місць зв'язування також визначена коректно. Рівняння МакГі–фон Хіпшеля для некооперативного та кооперативного зв'язування, відповідно, мають вигляд

$$\frac{\nu}{c_f} = K(1 - n\nu) \left(\frac{1 - n\nu}{1 - (n-1)\nu} \right)^{n-1}, \quad (3)$$

$$\frac{\nu}{c_f} = K(1 - n\nu) \left(\frac{(2\omega - 1)(1 - n\nu) + \nu - R}{2(\omega - 1)(1 - n\nu)} \right)^{n-1} \times \left(\frac{1 - (n+1)\nu + R}{2(1 - n\nu)} \right)^2, \quad (4)$$

де ω – параметр кооперативності, а

$$R = \sqrt{(1 - (n+1)\nu)^2 + 4\omega\nu(1 - n\nu)}.$$

4.1. Модифіковані рівняння

Концентрації зв'язаних чи вільних лігандів не є експериментально спостережуваними величинами; на досліді вимірюються залежності оптичних параметрів розчину від концентрацій складових. Зазвичай оптичний параметр обчислюють як суму внесків лігандів у різних станах – зв'язаних та вільних. Як оптичний параметр зручно вибрати або інтенсивність флюоресценції, або значення оптичної густини (в спектрах поглинання).

Якщо ліганд може перебувати лише в одному з двох станів (вільний чи зв'язаний), тобто реалізується лише один тип місць зв'язування, то вираз для оптичного параметра досить простий і дозволяє на пряму визначати концентрації вільних та зв'язаних лігандів:

$$A = \frac{c_f}{c} A_f + \frac{c_b}{c} A_b, \quad (5)$$

де A – оптичний параметр суміші, c – повна концентрація лігандів, A_f – оптичний параметр вільних лігандів, c_f – їх концентрація, A_b – оптичний

параметр зв'язаних лігандів, c_b – їх концентрація; $c = c_f + c_b$. Знаючи A_f та A_b (перший визначається з чистого розчину ліганду, другий потенційно визначається з розчину ліганду зі значним надлишком ДНК), можна визначити c_f та c_b і далі перейти до координат Скетчарда.

Якщо ж ліганд може перебувати в одному з трьох станів (вільний, зв'язаний на місце типу 1, зв'язаний на місце типу 2), тобто реалізуються два типи місць зв'язування, то вираз для оптичного параметра складніший:

$$A = \frac{c_f}{c} A_f + \frac{c_b^{(1)}}{c} A_b^{(1)} + \frac{c_b^{(2)}}{c} A_b^{(2)}, \quad (6)$$

де $A_b^{(1)}$, $A_b^{(2)}$ – оптичні параметри лігандів, зв'язаних на місця типу 1 та типу 2, $c_b^{(1)}$ та $c_b^{(2)}$ – їх концентрації.

Для цього випадку складно визначити концентрації лігандів кожного стану і, відповідно, перейти до координат Скетчарда, оскільки $A_b^{(1)}$ та $A_b^{(2)}$ неможливо визначити прямими вимірами. Проте при безпосередній апроксимації експериментальних даних ці величини обчислюються разом з іншими параметрами [9].

Для чисельного аналізу рівняння в змінних Скетчарда ν та ν/c_f не дуже зручні, оскільки ці змінні досить складним чином пов'язані з експериментальними оптичними параметрами (інтенсивністю флюоресценції, оптичною густиною та ін.).

Крім того, параметри зв'язування з рівнянь в змінних Скетчарда визначаються з досить великою похибкою. Це пов'язано з тим, що лінеаризація “за Скетчардом” у загальному випадку нелінійних залежностей призводить до значного спотворення експериментальних похибок, і відповідно, точності визначення параметрів зв'язування, які краще визначати з початкових нелінеаризованих кривих.

Тому для аналізу експериментальних даних та їх безпосередньої апроксимації (тобто в експериментальних змінних) рівняння (3), (4) були нами модифіковані [9] і застосовані у вигляді рівнянь відносно змінної c_b – концентрації зв'язаних лігандів.

Для процесів з одним типом місць зв'язування базовими є рівняння МакГі–фон Хіпшеля, переведені від оригінальної форми до такої, що містить лише змінні, безпосередньо пов'язані з дослідом.

Зазвичай на досліді вимірюється залежність певного оптичного параметра розчину від співвід-

ношення концентрацій розчинених компонентів – як правило, відношення повної концентрації місць зв'язування до повної концентрації лігандів (N/c), тобто величина, по природі своїй обернена до ν , і відомими є саме концентрації компонентів, а не концентрації зв'язаних чи вільних лігандів. Тому для програмної обробки доцільніше такі змінні, як повні концентрації лігандів (c) та місць зв'язування (N) – тоді в рівнянні лишається одна невідома змінна, що знаходиться при чисельному розв'язанні.

Рядом перетворень [9] рівняння МакГі-фон Хіпеля для некооперативного та кооперативного зв'язування приводяться до форми (7),(8) відносно змінної c_b :

$$K(c - c_b)(N - \nu c_b) \left(\frac{N - nc_b}{N - (n-1)c_b} \right)^{n-1} - c_b = 0, \quad (7)$$

$$K(c - c_b)(N - nc_b) \times \left(\frac{(2\omega - 1)(N - nc_b) + c_b - R'}{2(\omega - 1)(N - nc_b)} \right) \times \left(\frac{N - (n+1)c_b + R'}{2(N - nc_b)} \right) - c_b = 0, \quad (8)$$

де

$$R' = \sqrt{(N - (n+1)c_b)^2 + 4\omega c_b(N - nc_b)},$$

які в цьому вигляді реалізовані в програмі і розв'язуються чисельно. Це дає можливість працювати з c_b як з функцією $c_b = c_b(N, c; K, n)$.

Процеси з двома типами місць зв'язування описуються системою з двох рівнянь, причому в ній має бути враховано залежність чи незалежність процесів зв'язування лігандів, що займають одне місце зв'язування (тобто пару основ плюс фосфати). Якщо N – концентрація пар основ ДНК, то першому типу зв'язування – з фосфатом – відповідає $2N$ місць зв'язування, другому типу зв'язування – інтеркаляції – відповідає N місць зв'язування. Вважається, що процес прямого переходу зв'язаних лігандів з місць типу 1 на місця типу 2 неможливий.

Для наших експериментальних даних (щодо AmBe) найкращі результати апроксимації отримані при використанні системи з модифікованих рівнянь Скетчарда (для зовнішнього зв'язування) та МакГі-фон Хіпеля (для інтеркаляції). Система описує два залежних процеси зв'язування лігандів,

що займають одне місце зв'язування, при цьому інтеркаляція в проміжок між парами основ дозволена, лише якщо з обома фосфатами цього проміжку ліганди не зв'язались, і навпаки – зв'язування з фосфатами можливе, лише якщо до відповідного проміжку не інтеркалював ліганд. Крім того, між двома лігандами, що інтеркалювали, має бути не менше $n - 1$ вільних проміжків. Такій моделі відповідає система рівнянь:

$$\begin{cases} c_b^{(1)} = K_1 (c - c_b^{(1)} - c_b^{(2)}) (2N - c_b^{(1)}) \left(1 - \frac{c_b^{(2)}}{N}\right), \\ c_b^{(2)} = K_2 (c - c_b^{(1)} - c_b^{(2)}) (N - nc_b^{(2)}) \times \\ \times \left(\frac{N - nc_b^{(2)}}{N - (n-1)c_b^{(2)}} \right)^{n-1} \left(1 - \frac{c_b^{(1)}}{2N}\right)^2. \end{cases} \quad (9)$$

Можна бачити, що для залежних процесів в рівняннях з'являється додатковий множник

$$\left(1 - \frac{c_b^{(1)}}{2N}\right)^2;$$

детально про нього див. [9].

4.2. Параметри зв'язування

Для визначення параметрів зв'язування найзручніше використовувати дані зі зміни оптичної густини (в спектрах поглинання) та зміни інтенсивності ФЛ (в максимумі смуги). В наших експериментах точніші дані отримані за спектрами ФЛ, відповідно, результати апроксимації, отримані за ними, дещо точніші.

4.2.1. Тіотеф

Спектри флюоресценції тіотефу при різних N/c наведено на рис. 6. Крива зміни інтенсивності максимуму флюоресценції в залежності від N/c (крива зв'язування) наведена на рис. 7. Можна бачити, що при $N/c \sim 10$ інтенсивність флюоресценції набуває максимального значення, залежність виходить в насичення, що свідчить про те, що зв'язалась максимально можлива кількість молекул ліганду.

За кривою залежності інтенсивності флюоресценції від співвідношення концентрацій, використовуючи програму *BindFit*, можна отримати параметри зв'язування. В даному випадку, експериментальні результати найкраще описувались рівнянням (8), що враховує один тип зв'язування –

інтеркаляцію (можливо, часткову), причому зв'язування, як виявилось, є антикооперативним.

Отримані параметри зв'язування тіотефу з ДНК:

$$K_2 = (0,10 \pm 0,04) \cdot 10^6 \text{ л/Моль},$$

$$n = 3,6 \pm 0,4, \quad \omega = 0,30 \pm 0,05.$$

(K_2 – константа зв'язування для процесу інтеркаляції, n – середня кількість місць зв'язування, які займає ліганд, ω – параметр кооперативності.)

Зазначимо, що в роботі [21] методами квантовохімічних розрахунків показано селективне зв'язування тіотефу з dGMP (дезоксигуанозинмонофосфат) за рахунок сильного водневого зв'язку типу N–H–N.

4.2.2. Берберин

Для апроксимації експериментальних даних використувалося модифіковане рівняння МакГі-фон Хішпеля (8) для кооперативного зв'язування. Крива зв'язування берберину наведена на рис. 9. Отримано

$$K_2 = (5,2 \pm 0,2) \cdot 10^4 \text{ л/Моль},$$

$$n = 1,9 \pm 0,1, \quad \omega = 1,3 \pm 0,2.$$

Значення $n \sim 2$ означає, що одна молекула алкалоїду займає дві пари основ ДНК; це вказує на інтеркаляційний спосіб зв'язування берберину з ДНК. Незначна кооперативність може свідчити про деяке розкручування спіралі ДНК у місцях інтеркаляції. Детальніше про зв'язування берберину див. [8].

4.2.3. Амітозиноберамід

Спектр флюоресценції амітозинобераміду складається з двох смуг (рис. 10), характер залежностей зміни інтенсивності від співвідношення концентрацій ліганду та ДНК, тобто криві зв'язування, для цих смуг, мають вигляд (рис. 11).

За отриманими експериментальними даними було встановлено, що для AmBer характерними є два типи зв'язування – інтеркаляція та зовнішнє зв'язування. Для визначення констант зв'язування була використана система модифікованих рівнянь МакГі-фон Хішпеля та Скетчарда (9), яка враховує два типи зв'язування ліганду з ДНК. Як виявилось, для “берберинової” смуги проявляються

обидва процеси зв'язування – інтеркаляція та зовнішнє, причому за малих $N/c (\leq 2)$ домінує інтеркаляція, при більших N/c – зовнішнє зв'язування. Для “тіотефної” частини молекули характерним є лише один тип зв'язування – зовнішнє, у всьому діапазоні значень N/c . Значення отриманих параметрів зв'язування амітозинобераміду з ДНК:

- за смугою 375 нм:

$$K_1 = (0,06 \pm 0,02) \cdot 10^4 \text{ л/Моль}, \quad n = 2,6 \pm 0,2;$$

- за смугою 550 нм:

$$K_1 = (10,2 \pm 0,8) \cdot 10^4 \text{ л/Моль},$$

$$K_2 = (32,8 \pm 6,7) \cdot 10^4 \text{ л/Моль}, \quad n = 4,1 \pm 0,6.$$

(K_1 – константа зовнішнього зв'язування, K_2 – константа зв'язування для процесу інтеркаляції, n – середня кількість місць зв'язування, які займає ліганд.)

Зазначимо, що результати, отримані за “тіотефною” кривою зв'язування, є менш точними через низьку інтенсивність смуги 375 нм; важливим тут є якісний результат – “тіотефна” частина амітозинобераміду схильна до зовнішнього зв'язування.

4.2.4. Порівняння параметрів зв'язування

Оскільки амітозиноберамід є медичним протипухлинним препаратом, доцільно порівняти параметри комплексоутворення амітозинобераміду з параметрами комплексоутворення алкалоїдів берберин та сангвінарин, які досліджувались нами раніше [9–11], які самі по собі проявляють протипухлинні властивості, і входять до складу іншого протипухлинного препарату, розробленого в ІМБГ НАН України (амітозин). Також наведено параметри зв'язування тіотефу (див. таблицю).

Як можна бачити, домінуючим типом зв'язку для всіх трьох препаратів – берберину, тіотефу та амітозинобераміду є інтеркаляція (повна чи часткова) – якщо вони взаємодіють з ДНК кожен окремо. Якщо ж з двох препаратів – берберину та тіотефу – сформувано третій – амітозиноберамід, то між двома частинами нової молекули виникає певна конкуренція щодо зв'язування. При цьому берберинова частина, зв'язуючись з матрицею ДНК переважно інтеркаляційно, блокує зв'язування такого самого типу тіотефної частини молекули, яка, в свою чергу, зв'язується з ДНК зовнішнім

Параметри зв'язування

Параметр	Берберин	Тіотеф	Амітозиноберамід		Сангвінарин
			375 нм (Тіо-смуга)	550 нм (Ве-смуга)	
K_1	–	–	$(0,06 \pm 0,02) \cdot 10^4$	$(10,2 \pm 0,8) \cdot 10^4$	$(2,5 \pm 0,4) \cdot 10^6$
K_2	$(5,2 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(10,0 \pm 0,4) \cdot 10^4$	–	$(32,8 \pm 6,5) \cdot 10^4$	$(26,7 \pm 5,7) \cdot 10^6$
n	$1,9 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,1$
ω	$1,3 \pm 0,2$	$0,30 \pm 0,05$	–	–	–

K_1 – константа зовнішнього зв'язування (л/Моль), K_2 – константа зв'язування для інтеркаляції (л/Моль), n – середня кількість місць зв'язування, які займає ліганд, ω – параметр кооперативності.

зв'язуванням, типу “голова до хвосту” (орієнтація дипольних моментів), на що вказує гіперхромізм при $N/c > 2$, тобто в усьому діапазоні зовнішнього зв'язування (рис. 5). Непрямим підтвердженням такого зовнішнього зв'язування “тіотефу” є порівняно невелике значення n (~ 4), яке мало би бути значно більшим при інших типах зовнішнього зв'язування (які є, проте, малоймовірними для такої структури молекули). Крім того, зв'язування окремо тіотефу з ДНК є антикооперативним. При цьому значення констант зв'язування амітозинобераміду вищі, ніж для берберину і тіотефу, що узгоджується з дослідженнями інших видів модифікованого берберину [13, 14].

Щодо порівняння з сангвінарином (імінна форма, яка зв'язується з ДНК ефективніше, ніж алканоламінна), то цікавим є порівняння не стільки констант зв'язування, як форми кривих зв'язування: для Sa вона має інший вигляд (рис. 12), ніж для Ве (рис. 9) [9, 11] та AmВе (рис. 11), і, видимо, це три типи кривих зв'язування, які описують зв'язування малих лігандів з ДНК (крива зв'язування бромистого етидію [11] має дещо S-подібну форму, але її можна вважати варіантом кривої “типу Ве”). При цьому, якщо для Sa та AmВе ділянки кривих, які відповідають зовнішньому зв'язуванню (тобто певні області значень N/c) проявляються помітним чином, то для Ве зовнішнім зв'язуванням (яке проявляється при дуже малих N/c) можна практично знехтувати.

З наведеного видно, що сангвінарин ефективніше зв'язується з ДНК у порівнянні з берберином, тіотефом та амітозиноберамідом – константи зв'язування для нього вищі. Пояснити це можна тим, що молекула сангвінарину плоска [22], і завдяки формі більш схильна до інтеркаляції порівняно з Ве (дещо вигнута [16]), хоча і з тієї са-

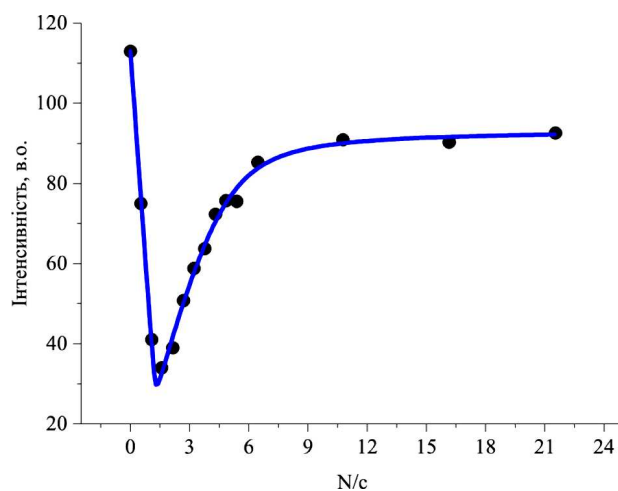


Рис. 12. Зміни інтенсивності флюоресценції сангвінарину (смуга 587 нм) залежно від N/c [9]

мої структурної групи, що й Sa), Тіо (непласка) та AmВе (непласка, і з “хвостом”). Оскільки медико-біологічна дія препарату Sa дещо інша, ніж у Ве, Тіо та AmВе, говорити про порівняно вищу протипухлинну ефективність препарату сангвінарину не можна.

5. Висновки

За спектрами електронного поглинання та флюоресценції водних розчинів AmВе + ДНК зафіксовано спектральні ознаки зв'язування препарату амітозинобераміду з ДНК та встановлено його механізми.

Для максимумів в спектрах флюоресценції AmВе + ДНК отримано залежність зміни інтенсивності від співвідношення N/c . Вона описується немонотонною кривою, вигляд якої є вперше зареєстрованим нетривіальним результатом.

Визначено, що для тіотефу і для берберину – компонентів, з яких формується амітозиноберамід – характерним способом зв'язування є інтеркаляція, в той час як для амітозинобераміду, окрім інтеркаляції, важливий внесок дає зовнішнє зв'язування. Припускається, що причиною цього є “домінування” берберинової частини молекули над тіотефною при малих концентраціях місць зв'язування. За допомогою програми *BindFit* визначено параметри зв'язування (константи зв'язування та середня кількість місць зв'язування, які займає мала молекула на матриці ДНК).

Встановлено, що амітозиноберамід зв'язується з ДНК ефективніше, ніж берберин, і це підтверджує результати попередніх медико-біологічних досліджень.

Як допоміжні результати, методом DFT оптимізовано геометричну структуру азиридину, тіотефу, амітозинобераміду, та розраховано їхні спектри електронного поглинання.

1. L.M. Guaman Ortiz, P. Lombardi, M. Tillhon, A.I. Scovassi. Berberine, an epiphany against cancer. *Molecules* **19**, 12349 (2014).
2. Y. Cai, Q. Xia, R. Luo, P. Huang, Y. Sun, Y. Shi, W. Jiang. Berberine inhibits the growth of human colorectal adenocarcinoma in vitro and in vivo. *J. Natur. Med.* **68**, 53 (2014).
3. Y.-S.Seo, M.-J.Yim, B.-H.Kim, K.-R.Kang, S.-Y.Lee, J.-S.Oh, J.-S.You, S.-G.Kim, S.-J.Yu, G.-J.Lee, D.K. Kim, C.S. Kim, J.-S.Kim. Berberine-induced anticancer activities in FaDu head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **34**, 3025 (2015).
4. J.B. Patil, J. Kim, G.K.Jayaprakasha. Berberine induces apoptosis in breast cancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway. *Eur. J. Pharm.* **645**, 70 (2010).
5. S.M. Meeran, S. Katiyar, K.Katiyar. Berberine-induced apoptosis in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species generation. *Toxicol. Appl. Pharm.* **229**, 33 (2008).
6. T.L. Serafim, P.J. Olivaira, V.A. Sardao, E. Perkins, D. Parke, J. Holy. Different concentrations of berberine result in distinct cellular localization patterns and cell cycle effects in a melanoma cell line. *Cancer Chemoth. Pharm.* **61**, 1007 (2008).
7. A. Grebinyk, V. Yashchuk, N. Bashmakova, D. Gryn, T. Hagemann, A. Naumenko, N. Kutsevol, T. Dandekar, M. Frohme. A new triple system DNA-nanosilver-berberine for cancer therapy. *Appl. Nanosci.* **2018**, 1 (2018).
8. N. Bashmakova, S. Kutovyuy, V. Yashchuk, D. Hovorun, V. Losytskyy, L. Zaika. Optical spectroscopy studies of the interaction between a number of plant alkaloids and the DNA double helix in an aqueous solution. *Ukr. J. Phys.* **54**, 471 (2009).
9. V.G. Gumenyuk, N.V. Bashmakova, S.Yu. Kutovyuy, V.M. Yashchuk, L.A. Zaika. Binding parameters of alkaloids berberine and sanguinarine with DNA. *Ukr. J. Phys.* **56**, 525 (2011).
10. С.Ю. Кутувий, Р.С. Савчук, Н.В. Башмакова. Параметри зв'язування алкалоїду сангвінаріну з ДНК. *Вісник Київського Університету, сер. Фіз.-мат. науки, Вип. 3*, 265 (2014).
11. V. Gumenyuk, S. Kutovyuy, T. Sych, R. Savchuk, N. Bashmakova. Peculiarities of the Binding of Some Small Ligands to DNA. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **589**, 242 (2014).
12. С.Ю. Кутувий, Т.П. Сич, Л.А. Заїка. Особливості зв'язування бромистого етидію та акридинового оранжевого з ДНК. *Вісник Київського Університету, сер. Фіз.-мат.науки, Вип. 3*, 273 (2014).
13. D. Bhowmik, B. Franco, F. Gaetano, O. Fabrizio, T.M. Syeda, L. Paolo, G.S.Kumar. Synthesis of new 13-diphenylalkyl analogues of berberine and elucidation of their base pair specificity and energetics of DNA binding. *Med. Chem. Commun.* **5**, 226 (2014).
14. D. Bhowmik, H. Maidul, B. Franco, D. Rosaria, L. Paolo, G.S.Kumar. Biophysical Studies on the Effect of the 13 Position Substitution of the Anticancer Alkaloid Berberine on Its DNA Binding. *J. Phys. Chem.* **116**, 2314-2324, (2012).
15. А.І. Потопальський, С.Т. Рибалко, О.О. Фільченков, М.П. Завелевич. Амітозиноберамід як інгібітор реплікації вірусу герпесу, Бюл. №23. Патент України на корисну модель №55573 (2010).
16. V.I. Danilov, V.V. Danilidonis, D.M. Hovorun, N. Kurita, Y. Murayama, T. Natsume, A.I. Potopalsky, L.A. Zaika. Berberine alkaloid: Quantum chemical study of different forms by the DFT and MP2 methods. *Chem. Phys. Lett.* **430**, 409 (2006).
17. N. Bashmakova, S. Kutovyuy, R. Zhurakivsky, D. Hovorun, V. Yashchuk. Vibrational spectra of berberine and their interpretation by means of DFT quantum-mechanical calculations. *Ukr. J. Phys.* **56**, 130 (2011).
18. K.-W. Kim, J.K. Roh, H.-J.We, C. Kim. *Cancer Drug Discovery: Science and History* (Ed. Springer, 2016).
19. G. Scatchard. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660 (1949).
20. J.D. McGhee, P.H. von Hippel. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J. Mol. Biol.* **86**, 469 (1974).
21. T. Nikolaienko, L. Bulavin, L. Sukhodub. The Complexation of the Anticancer Drug ThioTEPA with Methylated DNA Base Guanine: Combined Ab Initio and QTAIM Investigation. *Molecular Informatics* **33**, 104 (2014).
22. А.П. Орехов. *Химия алкалоидов* (Изд. АН СССР, 1955).

Одержано 02.05.18

*S. Yu. Kutovyy, R. S. Savchuk,
N. V. Bashmakova, D. M. Hovorun, L. A. Zaika*

MECHANISMS AND PARAMETERS
OF THE BINDING OF AMITOZINOBERAMID
TO DNA IN THE AQUEOUS SOLUTION

S u m m a r y

The interaction between the amitozinoberamid preparation (thiotepa-alkylated berberine) and a DNA macromolecule in the aqueous solution has been studied, by using the optical spectroscopy methods: electron absorption and fluores-

cence. The dependence of spectral characteristics on the concentration ratio N/c between the DNA base pairs and the ligand molecules is plotted. Using the system of modified Scatchard and McGhee–von Hippel equations, the parameters of the binding of amitozinoberamid to DNA are determined. A comparative analysis of the DNA interaction with amitozinoberamid, on the one hand, and berberine and sanguinarine alkaloids, on the other hand, is carried out. The structure and the spectra of electron absorption of thiotepa, berberine, and amitozinoberamid molecules are calculated in the framework of the density functional theory at the DFT B3LYP/6-31G(d,p) level.