

## ПАРАМЕТРИ ЗВ'ЯЗУВАННЯ АЛКАЛОЇДІВ БЕРБЕРИНУ ТА САНГВІНАРИНУ З ДНК

В.Г. ГУМЕНЮК,<sup>1</sup> Н.В. БАШМАКОВА,<sup>1</sup> С.Ю. КУТОВИЙ,<sup>1</sup> В.М. ЯЩУК,<sup>1</sup> Л.А. ЗАЙКА<sup>2</sup><sup>1</sup>Київський національний університет ім. Тараса Шевченка  
(Просп. Академіка Глушкова, 6, Київ 03127; e-mail: [ins@univ.kiev.ua](mailto:ins@univ.kiev.ua))<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
(Вул. Заболотного, 150, Київ 03143)УДК 535.34; 535.37  
©2011

Досліджено взаємодію рослинних алкалоїдів берберину та сангвінаріну з ДНК у водному розчині методами оптичної спектроскопії (поглинання, флюоресценція). Розглянуто залежності спектральних характеристик алкалоїдів від співвідношення концентрацій пар основ ДНК та молекул алкалоїду ( $N/c$ ), визначено прояви зв'язування алкалоїдів з ДНК. Показано, що характер зв'язування залежить від  $N/c$ . За допомогою модифікованих рівнянь Скетчарда та МакГі-фон Хіпшеля визначено параметри зв'язування берберину та сангвінаріну з ДНК.

## 1. Вступ

Створення ефективних малотоксичних протипухлинних препаратів на основі алкалоїдів природного походження є важливою задачею сучасної медицини. Для таких препаратів актуальні алкалоїди, які здатні вибірково накопичуватись у клітинах пухлин та утворювати нековалентні комплекси з нуклеїновими кислотами, блокуючи процеси їх транскрипції та реплікації.

Дана робота продовжує наші дослідження [1], направлені на вивчення взаємодії з ДНК алкалоїдів чистотілу — берберину та сангвінаріну, які також входять до складу протипухлинного препарату амітозину, створеного в ІМБГ НАН України. Берберин та сангвінарін (рис. 1) належать до групи ізохінолінів. Структурна формула молекули берберину —  $C_{20}H_{19}NO_5$ , сангвінаріну —  $C_{20}H_{15}NO_5$ .

Алкалоїди ізохінолінового ряду, як правило, взаємодіють з ДНК як інтеркалятори, або ж розміщуються у малій борозенці; можливим є і зовнішнє зв'язування з фосфатними групами. Проте ні для берберину, ні для сангвінаріну механізми зв'язування остаточно не встановлені, незважаючи на досить інтенсивні дослідження цього питання.

Взаємодія берберину з НК досліджувалась спектральними методами в низці робіт, але висновки про

спосіб їх зв'язування неоднозначні. Одні результати вказують на інтеркаляцію — повну [2] або часткову [3–5], інші — на борозенкове зв'язування [6, 7]. В роботі [8] припускається два незалежні типи зв'язування з різною спорідненістю, для кожного з яких визначено константи зв'язування.

Взаємодію сангвінаріну з ДНК також вивчали в низці робіт (див. огляд [9]). Відомо [9], що сангвінарін у водних розчинах існує у двох формах — імінній (SaI,  $pH < 6$ ) та алканоламінній (SaII,  $pH > 8,5$ ); перша з них є катіоном, інша — нейтральна (див. рис. 1). В роботі [10] показано утворення частково інтеркальованих в ДНК комплексів для обох форм сангвінаріну — імінної та алканоламінної, проте цей висновок заперечений результатами роботи [11], де стверджується, що з ДНК взаємодіє лише одна з форм — імінна; хоча інтеркаляція як спосіб зв'язування сангвінаріну з ДНК була підтверджена авторами [12].

В даній роботі отримано залежності спектральних характеристик берберину та сангвінаріну від співвідношення між кількістю пар основ ДНК та кількістю молекул алкалоїду ( $N/c$ ), показано прояви зв'язування цих алкалоїдів з ДНК. Особливу увагу приділено аналізу рівнянь Скетчарда та МакГі-фон Хіпшеля та їх застосуванню для чисельної апроксимації експериментальних даних.

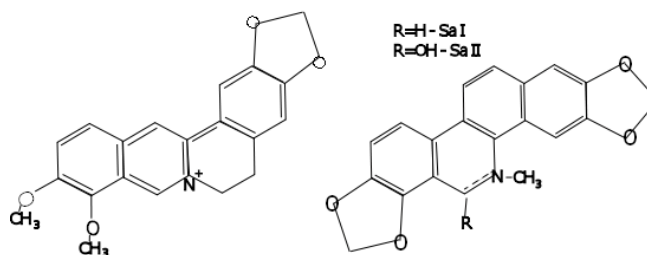


Рис. 1. Будова берберину (а) та сангвінаріну (б). Пунктиром позначено подвійний зв'язок, який існує в формі SaI

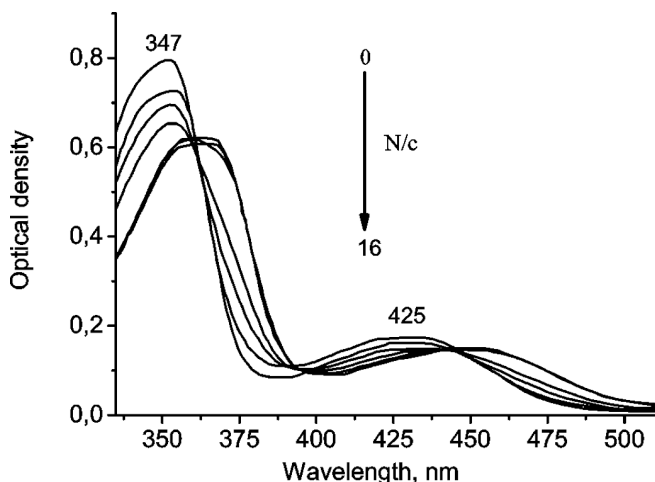


Рис. 2. Спектр поглинання водного розчину берберину та комплексу Ве+СТ ДНК при різних значеннях  $N/c$ .  $c_{\text{Ве}} = 2,5 \cdot 10^{-5}$  Моль/л

## 2. Зразки та методика експерименту

У роботі використовували алкалоїди берберин (Ве, “Alps Pharmaceutical”, Японія) та сангвінарин (Са, Львівський університет імені Івана Франка), у вигляді мікрокристалічних порошків, які розчиняли при температурі  $\sim 60\text{--}70$  °С у воді для ін’єкцій. Концентрації алкалоїдів в експериментах становили 12,5–50 мкМоль/л. За таких концентрацій реабсорбція чи концентраційні ефекти несуттєві. Використовували ДНК еритроцитів курчат *Chicken Erythrocytes* (ДНК СЕ, оброблена ультразвуком) та тимусу бика *Calf Thymus* (ДНК СТ), виробник “Serva”, Німеччина. Середня молярна маса пари нуклеотидів  $\sim 650$  Да. При отриманні концентраційних залежностей розчинів Ве+ДНК та Са+ДНК концентрація алкалоїду залишалась незмінною, а варіювалась концентрація ДНК. Співвідношення молярних концентрацій ДНК та алкалоїду ( $N/c$ ) виражалось у кількості пар нуклеотидів на одну молекулу алкалоїду.

Реєстрацію спектрів поглинання проводили на спектрофотометрі “Specord UV VIS” в діапазоні 200–700 нм. Спектральне розділення становило 1 нм. Спектри флюоресценції (ФЛ) отримано за допомогою флюорометра “Cary Eclipse” в діапазоні 300–800 нм. Спектральна ширина щілини для вимірів флюоресценції становила 5 нм.

## 3. Результати експерименту

Характерними проявами взаємодії алкалоїдів з ДНК в спектрах поглинання та ФЛ є гіпохромізм смуг

поглинання алкалоїду, зсуви максимумів поглинання (“червоний”) та ФЛ (“блакитний”) та зміна квантового виходу ФЛ. Детальному аналізу цих та інших проявів зв’язування берберину та сангвінарину з ДНК в оптичних спектрах в залежності від  $N/c$  буде присвячено іншу роботу, тут ми лише коротко їх опишемо.

### 3.1. Берберин

Спектр поглинання берберину лежить в інтервалі  $\lambda < 500$  нм, і складається з чотирьох двокомпонентних смуг з максимумами при  $\sim 425, 347, 264, 229$  нм. При додаванні в розчин берберину молекул ДНК в спектрі поглинання алкалоїду для смуг 345 та 425 нм спостерігається суттєвий гіпохромізм (до 30%) та довгохвильовий зсув максимумів (до 22 нм), що вказує на зв’язування берберину з ДНК (рис. 2).

У плоских ароматичних молекул дипольний момент орієнтований в площині молекули [13], тому для таких молекул розміщення дипольних моментів відповідає розміщенню самих молекул в просторі. Якщо дипольні моменти молекул розміщуються паралельно (“сандвічева” структура), в спектрах спостерігається гіпохромізм. В даному випадку гіпохромізм, як наслідок взаємодії  $\pi$ -систем молекул, розташованих паралельно, вказує на інтеркаляцію або зовнішній стекінг як можливі механізми зв’язування.

Спектр ФЛ берберину містить одну смугу з максимумом при  $\sim 556$  нм. При кімнатній температурі квантовий вихід флюоресценції берберину дуже низький. Спектри флюоресценції комплексу Ве-DNA характеризуються дуже значним підсиленням інтенсивності (до 200 разів, залежно від  $\lambda$  збудження, концентрації та типу зразка) та блакитним зсувом максимуму ФЛ (до 26 нм) порівняно з вільним берберином (рис. 3, 4).

Зміни в спектрах ФЛ зумовлені фіксацією молекул берберину на матриці ДНК – при комплексоутворенні зменшується імовірність безвишпромінювальної релаксації збудження, оскільки взаємодія коливань між собою менш ефективна; крім того, тепер менш ефективною є передача енергії молекулам розчинника. Як наслідок, квантовий вихід ФЛ зростає. “Блакитний” зсув максимуму ФЛ зумовлений, в основному, зміною полярності оточення молекул флюорофора – ДНК є менш полярним середовищем для молекул алкалоїду, ніж вода, крім того, зв’язані молекули алкалоїду частково екрановані від молекул розчинника; в результаті ефект релаксації розчинника, тобто взаємовплив дипольних моментів збуджених молекул алкалоїду та молекул розчинника [14] стає незначним.

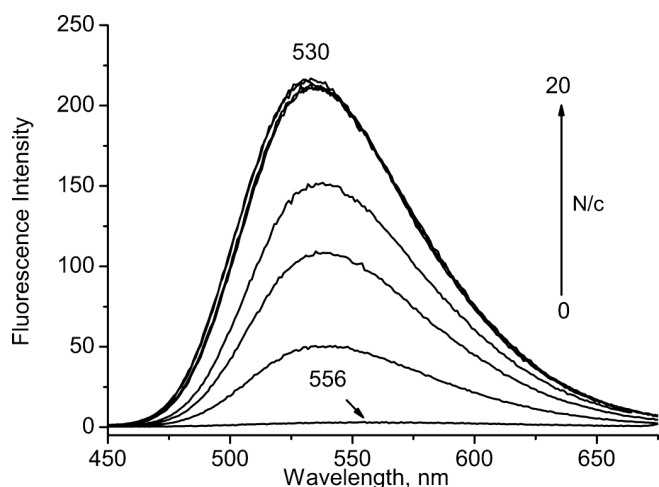


Рис. 3. Спектр ФЛ берберину та комплексу Ве+СТ ДНК при різних значеннях  $N/c$ .  $c_{\text{Ве}} = 4,1 \cdot 10^{-5}$  Моль/л. Збудження 450 нм

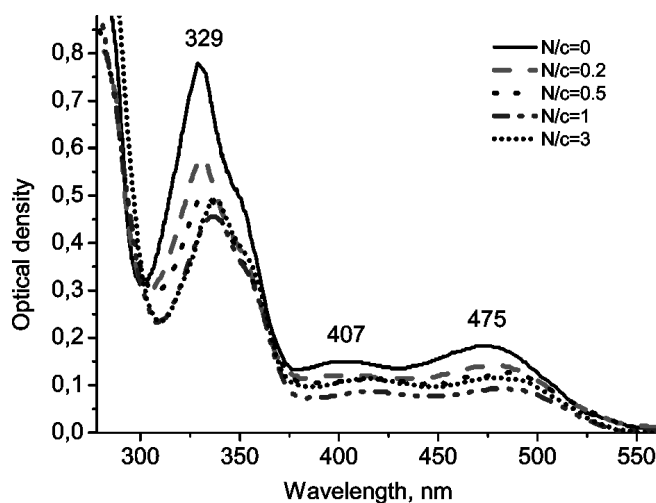


Рис. 5. Спектр поглинання розчину Са+СЕ ДНК при різних значеннях  $N/c$ .  $c_{\text{Са}} = 5 \cdot 10^{-5}$  Моль/л

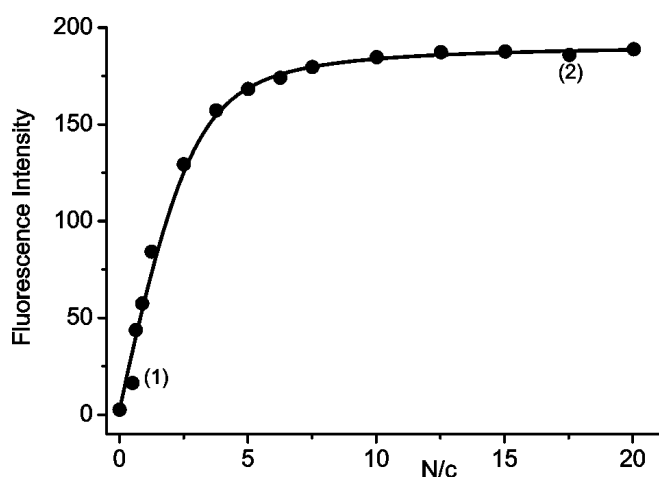


Рис. 4. Залежність інтенсивності ФЛ комплексу Ве+СТ ДНК від  $N/c$ .  $c_{\text{Ве}} = 4,1 \cdot 10^{-5}$  Моль/л. Збудження 450 нм. Про точки (1),(2) див. в п. 4.5

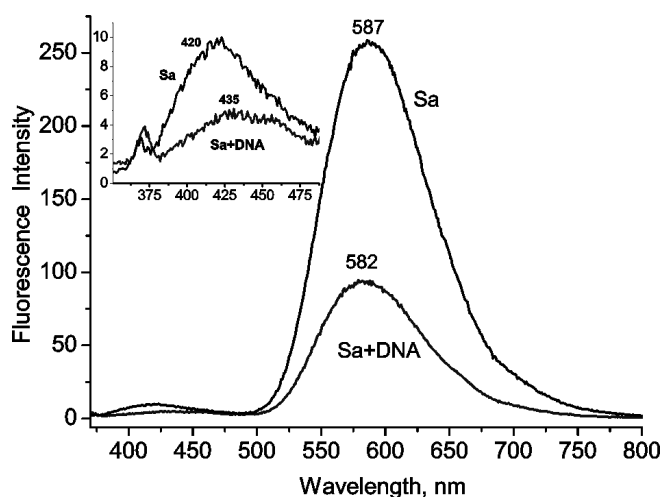


Рис. 6. Спектр ФЛ сангвінаріну та комплексу Са+СТ ДНК ( $N/c = 1$ ).  $c_{\text{Са}} = 5 \cdot 10^{-5}$  Моль/л. Збудження 330 нм. Форму СаП наведено на вставці

За перетином смуги ФЛ та першої смуги поглинання (в одиницях  $I/\nu^4$  та  $\varepsilon/\nu$  відповідно, згідно з [15]) визначено також частоту першого електронного переходу (0-0) для системи Ве+ДНК залежно від  $N/c$ .

В цілому, всі згадані залежності (“червоний” та “блакитний” зсуви, зміна інтенсивності ФЛ та ступеня гіпохромізму, зміна частоти 0-0-переходу) мають загальний вигляд типу, зображеного на рис. 4, тобто спочатку досить швидко зростання відповідного параметра, після чого, при певних (близьких) значеннях  $N/c$ , залежності виходять на насичення.

### 3.2. Сангвінарин

Як зазначалось, молекула сангвінаріну існує в імінній (при  $\text{pH} < 6$ ) та алканоламінній формах ( $\text{pH} > 8, 5$ ); у нас  $\text{pH} \sim 7$ , тобто в наших експериментах сангвінарин присутній в обох формах.

Наявність двох форм Са в розчині характеризується складною формою кривої поглинання зі смугами, характерними для двох форм Са (рис. 5), а також двома смугами ФЛ з максимумами при 587 та 419 нм (рис. 6), яким відповідають різні спектри збудження.

У спектрах поглинання та ФЛ сангвінаріну при додаванні ДНК також, як і для берберину, спостеріга-

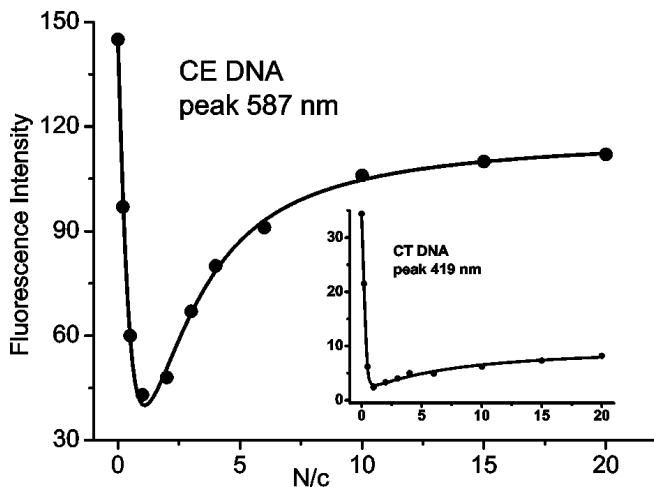


Рис. 7. Залежність інтенсивності ФЛ смуги 587 нм комплексу Sa+CE ДНК від  $N/c$ . Збудження 470 нм. На вставці – те саме для смуги 419 нм. Збудження 330 нм.  $c_{Sa} = 5 \cdot 10^{-5}$  Моль/л

ється зсув смуг, гіпохромізм та зміна інтенсивності ФЛ. Але, на відміну від берберину, зміна оптичної густини та інтенсивності ФЛ, а також частоти першого електронного переходу (0-0) залежно від  $N/c$  для сангвінаріну описується нетиповою залежністю – криві проходять через мінімум (рис. 7, спектр ФЛ), і така поведінка спостерігається для обох форм сангвінаріну.

Нааявність мінімуму інтенсивності ФЛ протирічить даним [9], лише в роботі [16] показана схожа залежність, але пояснення відсутні. Таку нетипову зміну оптичного параметра алкалоїду можна пояснити двома типами зв'язування сангвінаріну з ДНК – зовнішнім та інтеркаляцією. Мінімуми залежностей ( $N/c \leq 1$ ) відповідають максимально компактному розташуванню молекул на матриці ДНК, що приводить до гіпохромізму смуг поглинання  $\sim 40\text{--}50\%$  та гасіння ФЛ  $\sim 70\text{--}80\%$ . Оскільки для інтеркаляційного механізму зв'язування характерні значення  $N/c \geq 2$ , то найімовірніший механізм зв'язування при  $N/c < 1$  – це механізм зовнішнього “стекингу”. При збільшенні концентрації ДНК, а отже і при збільшенні місць зв'язування, молекули алкалоїду розташовуються на ДНК на більш далекій відстані, що відображається зростанням величини оптичного параметра. У цьому випадку для сангвінаріну найбільш імовірним є інтеркаляційний спосіб зв'язування. При певних співвідношеннях концентрацій залежності виходять в насичення.

Відзначимо, що при схожому характері змін інтенсивностей смуг ФЛ 419 та 587 нм, мінімум для смуги 419 нм спостерігається при більших значеннях  $N/c$ .

Це вказує на взаємодію форми II з ДНК, проте взаємодія ефективніша при більших  $N/c$  порівняно з формою I.

Основною причиною зменшення квантового виходу ФЛ сангвінаріну ми вважаємо ефект, подібний до концентраційного гасіння: зв'язуючись з ДНК (особливо зовні), молекули алкалоїду розміщуються відносно близько одна від одної, порівняно з вільними молекулами, що і спричинює певне гасіння ФЛ.

Також зазначимо, що всі згадані залежності однотипні для CE та CT ДНК, але для останньої всі залежності досягають максимуму, мінімуму чи насичення при менших значеннях  $N/c$ . Це виглядає так, ніби взаємодія алкалоїду більш ефективна з необробленою ультразвуком CT ДНК; розрахунки параметрів зв'язування (див. далі) підтвердили це припущення.

#### 4. Розрахунок параметрів зв'язування

##### 4.1. Теорія

Для визначення параметрів зв'язування малих лігандів з ДНК було створено спеціальну програму *BindFit*. Її особливістю є пряма робота з експериментальними даними, тобто відсутність будь-яких перетворень координат, відомих як “лінеаризація”. Це дозволило підвищити точність визначення параметрів для процесів, що описуються нелінійними графіками навіть після лінеаризації (див. п. 4.5).

Класичним рівнянням для визначення параметрів зв'язування (власне, константи зв'язування) є рівняння Скетчарда [17]:

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

де  $\nu$  – відношення концентрації зв'язаних лігандів ( $c_b$ ) до повної концентрації місць зв'язування ( $N$ ),  $c_f$  – концентрація вільних лігандів,  $K$  – константа зв'язування.

Згідно з (1), залежність  $\nu/c_f$  від  $\nu$  має бути лінійною, і константа зв'язування визначається з нахилу одержаної прямої. З ряду причин ця залежність може бути нелінійною – зокрема, якщо молекула ліганду займає більш ніж одне місце зв'язування на матриці ДНК (а саме –  $n$ ); рівняння тоді набуває вигляду  $\nu/c_f = K(1 - n\nu)$ . Проте його використання не завжди коректне – внаслідок недооцінки вільних місць зв'язування параметри зв'язування визначаються невірно (зокрема, значення константи зв'язування може завищуватись в  $\sim 2n$  раз [18]).

МакГі та фон Хішпел [18] розвинули підхід Скетчарда на випадок  $n > 1$ , коректно врахувавши (методами теорії ймовірностей) той факт, що протяжні ланцюжкові ліганди можуть займати більш ніж одне місце зв'язування. Рівняння МакГі-фон Хішпеля мають вигляд:

– для некооперативного зв'язування

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

– для кооперативного

$$\frac{\nu}{c_f} = K(1 - \nu) \left( \frac{(2\omega - 1)(1 - n\nu) + \nu - R}{2(\omega - 1)(1 - n\nu)} \right)^{n-1} \times \left( \frac{1 - (n+1)\nu + R}{2(1 - n\nu)} \right)^2. \quad (3)$$

Тут  $R = \sqrt{(1 - (n+1)\nu)^2 + 4\omega\nu(1 - n\nu)}$ ,  $\omega$  – параметр кооперативності ( $\omega > 1$  – зв'язування кооперативне,  $\omega = 1$  – некооперативне,  $\omega < 1$  – антикооперативне).

Хоча в більшості випадків графіки в координатах Скетчарда  $\nu$ ,  $\nu/c_f$  нелінійні, однак в цих змінних рівняння зв'язування можна записати в явному вигляді, що неможливо в експериментальних змінних, тому змінні Скетчарда набули певного поширення.

#### 4.2. Прив'язка до оптичного параметра

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.

##### 4.2.1. Два стани ліганду (один тип місць зв'язування)

Якщо ліганд може перебувати лише в одному з двох станів (вільний чи зв'язаний), то вираз для оптичного параметра досить простий і дозволяє напряму визначити концентрації вільних та зв'язаних лігандів:

$$A = \frac{c_f}{c} A_f + \frac{c_b}{c} A_b, \quad (4)$$

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:

$$\nu = \frac{(A - A_f)c}{(A_b - A_f)N}, \quad \frac{\nu}{c_f} = \frac{A - A_f}{(A_b - A)N}; \quad (5)$$

для безпосередньої апроксимації експериментальних даних ці процедури зайві.

##### 4.2.2. Три стани ліганду (два типи місць зв'язування)

Якщо вважається, що ліганд може перебувати лише в одному з трьох станів (вільний, зв'язаний на місце першого типу чи зв'язаний на місце другого типу), то вираз для оптичного параметра  $A$  має такий вигляд:

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

де  $A_b^{(1)}$ ,  $A_b^{(2)}$  – оптичні параметри лігандів, зв'язаних на місця першого та другого типу,  $c_b^{(1)}$  та  $c_b^{(2)}$  – їх концентрації. Для цього випадку складно визначити концентрації лігандів кожного стану (і, отже, перейти до координат Скетчарда), оскільки  $A_b^{(1)}$  та  $A_b^{(2)}$  неможливо визначити прямими вимірами, а в системі для визначення концентрацій зв'язаних та вільних лігандів рівнянь менше, ніж змінних. При безпосередній апроксимації експериментальних даних таких проблем не виникає, ці величини обчислюються разом з іншими параметрами.

#### 4.3. Модельні рівняння

Для чисельного аналізу рівняння (1)–(3) в змінних  $\nu$  та  $\nu/c_f$  не дуже зручні, оскільки ці змінні досить складним чином пов'язані з експериментальними оптичними параметрами (інтенсивністю ФЛ, 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” в загальному випадку нелінійних залежностей приводить 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) вказані рівняння були нами модифіковані і застосовані у вигляді рівнянь відносно змінної  $c_b$  – концентрації зв'язаних лігандів.

#### 4.3.1. Один тип місць зв'язування

Базовими є рівняння МакГі–фон Хіппеля, 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 співвідношення концентрацій розчинених компонентів – як правило, відношення повної концентрації місць зв'язування до повної концентрації лігандів ( $N/c$ ), тобто величина, по природі своїй обернена до  $\nu$ , і відомими є саме концентрації компонентів, а не концентрації зв'язаних чи вільних лігандів. Тому для програмної обробки доцільніші 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 нескладних перетворень (послідовним домноженням “канонічних” рівнянь (2) чи (3) на  $c_f$  та  $N$  та деяким перепозначенням змінних), рівняння МакГі–фон Хіппеля для некооперативного (2) та кооперативного (3) зв'язування зводяться до бажаної форми – відносно змінної  $c_b$ :

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

$$K(c - c_b)(N - nc_b) \left( \frac{(2\omega - 1)(N - nc_b) + c_b - R'}{2(\omega - 1)(N - nc_b)} \right)^{n-1} \times$$

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

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

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

Окремого зауваження потребує параметр  $n$ . У випадку, коли  $0 < n < 1$ , рівняння примусово замінюється на рівняння з  $n = 1$  і  $N' = N/n$ , тобто такі значення параметра інтерпретуються як вказівка на те,

що місць зв'язування насправді більше, ніж  $N$ . Така ситуація може реалізовуватись, наприклад, коли за  $N$  вибирається концентрація пар основ ДНК, а зв'язування йде з фосфатними залишками, концентрація яких  $2N$ . Однак згадані вище значення  $n$  можуть також свідчити про кооперативне зв'язування; у цьому випадку процес описується кооперативним рівнянням (8) з  $n = 1$ , при цьому обов'язково  $\omega > 1$ .

В (8) при  $\omega \rightarrow 1$  знаменник прямує до нуля; якщо виконати відповідний граничний перехід, рівняння переходить в некооперативне. Програмно така ситуація обробляється заміною при  $\omega = 1$  кооперативного рівняння на некооперативне. Параметр  $n$  обробляється так само, як і для некооперативного рівняння.

#### 4.3.2. Два типи місць зв'язування

Процеси з двома типами місць зв'язування можна схематично позначити як  $c_b^{(1)} \iff c_f \iff c_b^{(2)}$ , причому процес прямого переходу зв'язаних лігандів з місць типу “1” на місця типу “2” неможливий. Такі процеси 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.

Серед реалізованих схем найпростішою є система двох модифікованих рівнянь Скетчарда, що описує два незалежних процеси зв'язування лігандів, що займають одне місце зв'язування:

$$\begin{cases} c_b^{(1)} = K_1(c - c_b^{(1)} - c_b^{(2)})(2N - c_b^{(1)}), \\ c_b^{(2)} = K_2(c - c_b^{(1)} - c_b^{(2)})(N - c_b^{(2)}). \end{cases} \quad (9)$$

Можливими є і інші комбінації рівнянь Скетчарда та МакГі–фон Хіппеля.

Для наших експериментальних даних найкращі результати апроксимації отримано при використанні системи з модифікованих рівнянь Скетчарда (для зовнішнього зв'язування) та МакГі–фон Хіппеля (для інтеркаляції). Система описує два залежних процеси зв'язування лігандів, що займають одне місце зв'язування, причому 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 така система:

$$\begin{cases} c_b^{(1)} = K_1(c - c_b^{(1)} - c_b^{(2)})(2N - c_b^{(1)}) \left(1 - \frac{c_b^{(2)}}{N}\right), \\ c_b^{(2)} = K_2(c - c_b^{(1)} - c_b^{(2)})(N - nc_b^{(2)}) \times \\ \times \left(\frac{N - nc_b^{(2)}}{N - (n-1)c_b^{(2)}}\right)^{n-1} \left(1 - \frac{c_b^{(1)}}{2N}\right)^2. \end{cases} \quad (10)$$

Важливо, що для залежних процесів в рівняннях з'являється додатковий множник. З'являється він таким чином.

Будь-яке рівняння зв'язування має вигляд

$$c_b = K c_f N_f$$

– концентрація зв'язаних лігандів рівна добутку концентрації вільних лігандів на концентрацію вільних місць зв'язування і на константу зв'язування. Саме  $N_f$  і породжує додаткові множники, оскільки ця величина зрештою набуває вигляду

$$N_f = (N - nc_b)P_f$$

– концентрація місць зв'язування дорівнює концентрації незайнятих місць, помноженій на ймовірність, що на довільно вибраному вільному місці зв'язування не діють чинники, що заважають зв'язуванню. Для залежних процесів таким чинником вибирається наявність на суміжному місці зв'язування іншого типу зв'язаного ліганду. Ймовірність, що такий чинник не заважає зв'язуванню рівна ймовірності, що усі такі суміжні місця зв'язування вільні, тобто

$$P_f = \left(1 - \frac{c_b^{\text{other}}}{N_{\text{other}}}\right)^s,$$

де  $s$  – кількість таких суміжних місць зв'язування.

В даному випадку ця величина визначається таким чином:

– для зв'язування з фосфатом – це доля фосфатів, що належать до незайнятого проміжку:

$$p_a = 1 - \frac{2c_b^{(2)}}{2N} = 1 - \frac{c_b^{(2)}}{N}$$

– кожен зайнятий проміжок забороняє зв'язування з двома фосфатами;

– для інтеркаляції – це ймовірність, що обидва фосфати цього проміжку вільні:

$$p_b = (P_{\text{ph.free}})^2 = (1 - P_{\text{ph.occupied}})^2 = \left(1 - \frac{c_b^{(1)}}{2N}\right)^2$$

– ймовірність, що фосфат зайнятий,  $P_{\text{ph.occupied}}$ , рівна ймовірності, що один з  $c_b^{(1)}$  лігандів зв'язався з одним з  $2N$  фосфатів.

Зауважимо, що:

1. Процеси, в яких можливий прямий перехід зв'язаних лігандів з місць типу “1” на місця типу “2” тут не розглядаємо, оскільки для їх опису потрібно кілька рівнянь і близько десятка параметрів – надто багато, щоб визначити їх з задовільною точністю.

2. Оскільки розв'язок є концентрацією зв'язаних лігандів, на нього накладаються певні обмеження: концентрація зв'язаних лігандів є невід'ємним числом, не перевищує повну концентрацію лігандів і обмежена концентрацією місць зв'язування.

Наведені вище рівняння взагалі мають кілька розв'язків, однак в робочому діапазоні параметрів вказаним обмеженням задовольняє, як виявилось, лише один з них.

3. Серед застосованих алгоритмів розв'язку рівнянь найкращим, тобто таким, що дає стабільні результати за найвищої швидкості обчислень, виявився метод бінарного пошуку. Апроксимація ведеться окремо по кожному з параметрів.

#### 4.4. Параметри комплексоутворення берберину та сангвігарину

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

##### 4.4.1. Берберин

Для апроксимації експериментальних даних використовувались модифіковані рівняння МакГі-фон Хіпеля (7),(8) для некооперативного та кооперативного зв'язування. Виявилось, що кращі результати отримуються, якщо вважати, що зв'язування кооперативне, але ступінь кооперативності незначний. Отримано (для СТ ДНК, див. табл. 1):

**Т а б л и ц я 1.** Параметри зв'язування берберину з СТ ДНК

	За спектрами ФЛ	За спектрами поглинання
$K$	$(5, 2 \pm 0, 2) \cdot 10^4$	$(5, 7 \pm 0, 7) \cdot 10^4$
$n$	$1, 85 \pm 0, 1$	$1, 8 \pm 0, 3$
$\omega$	$1, 3 \pm 0, 2$	$1, 45 \pm 0, 4$

Маємо дуже добре збігання розрахованих параметрів, отриманих апроксимацією даних незалежних експериментів (ФЛ та поглинання).

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

Для порівняння – в [19], на підставі аналізу дещо інших рівнянь (причому в координатах Скетчарда) отримано такі значення:  $K = 3,54 \cdot 10^4$ ,  $n = 2$ ; таким чином, маємо добре узгодження результатів, враховуючи складність отримання точних експериментальних даних і розрахунку.

#### 4.4.2. Сангвінарин

Оскільки залежність оптичної густини та інтенсивності флюоресценції розчинів  $Sa+ДНК$  від концентрації ДНК нетривіальна (типу, показаного на рис. 7), то до такого випадку неможливо безпосередньо застосувати рівняння МакГі–фон Хіппеля. Як виявилось, експериментальні результати найкраще описуються системою рівнянь, яка враховує два залежних процеси зв'язування лігандів: зовнішнє зв'язування з фосфатами (“1”) та інтеркаляцію в подвійну спіраль ДНК (“2”), причому процес прямого переходу зв'язаних лігандів з місць типу “1” на місця типу “2” неможливий (умова 1), а між двома інтеркальованими лігандами має бути не менше  $n - 1$  вільних проміжків (умова 2). Такій моделі відповідає система рівнянь (10), в яких враховано умови 1 та 2. Кількість пар основ, зайнятих одним алкалоїдом при зовнішньому зв'язуванні вважалась рівною 0,5, для інтеркаляції  $n$  було одним з параметрів рівняння. Прийнято, що концентрація зовнішніх місць зв'язування  $\approx 2N$ , для інтеркаляції –  $N$ .

В результаті апроксимації експериментальних залежностей згідно з системою рівнянь (10) отримано значення констант зв'язування (л/Моль) та параметра  $n$ , див. табл. 2.

**Т а б л и ц я 2.** Параметри зв'язування сангвінарину з ДНК

	SaI+CE ДНК	SaI+CT ДНК	SaII+CT ДНК
$K_1$	$(6,7 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$(3,5 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(7,9 \pm 0,3) \cdot 10^5$
$K_2$	$(5,5 \pm 0,7) \cdot 10^5$	$(1,1 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(1,0 \pm 0,5) \cdot 10^5$
$n$	$3,4 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,4$	$12 \pm 3$

#### 4.5. Особливості координат Скетчарда

Координати Скетчарда потребують можливості визначення концентрацій зв'язаних та вільних лігандів на пряму з експериментальних даних, що можливо не завжди; якщо ж це навіть можливо, то ця операція може неконтрольовано спотворювати результати. Доцільність використаного програмного підходу проілюструємо на конкретному прикладі. Для більш коректного порівняння результатів (власне, значень  $K$  та  $n$ ) використано рівняння МакГі–фон Хіппеля для некооперативного зв'язування, оскільки з рівняння Скетчарда параметр  $\omega$  взагалі не визначається.

На рис. 4 наведено початкові експериментальні дані (залежність інтенсивності ФЛ комплексу  $Be+CT$  ДНК від  $N/c$ ) та результати їх безпосередньої апроксимації. Апроксимаційні криві практично накладаються при використанні рівнянь як для кооперативного (рис. 4), так і для некооперативного зв'язування; відмінності помітні в числових значеннях параметрів, визначених з використанням відповідних рівнянь. Отримано, для некооперативного зв'язування:

$$K = (7,69 \pm 3,18) \cdot 10^4 \text{ л/Моль}; \quad n = 2,11 \pm 0,23.$$

При переведенні експериментальних даних до координат Скетчарда (5) виникає проблема визначення концентрацій зв'язаних та вільних лігандів: яку величину вважати за значення оптичного параметра зв'язаних лігандів? Спочатку використаємо найбільше серед експериментальних точок значення оптичного параметра (188,9); результат наведено на рис. 8,а. Видно, що розкид точок значно збільшився після лінеаризації.

Якщо оптичний параметр для зв'язаних лігандів визначити як результат апроксимації (рис. 4), то отримаємо значення 191,8 – досить близьке до використаного; графік Скетчарда з його урахуванням – рис. 8,б.

Видно, що графік змінився суттєво – значення  $\nu/c_f$  змінились в кілька разів при зміні  $A_b$  менш ніж на півтора відсотки. Далі – дві точки, (1) та (2), випадають з загальної тенденції. Виключимо їх та знову виконаємо безпосередню апроксимацію даних – отримаємо

$$K = (5,64 \pm 0,35) \cdot 10^4, \quad n = 1,86 \pm 0,07.$$

Як видно, параметри ( $K$  та  $n$ ) помітно змінились, при цьому точність визначення параметрів зросла, тобто відкинуті точки дійсно лише вносили похибку. Звідси також отримуємо уточнене значення  $A_b =$



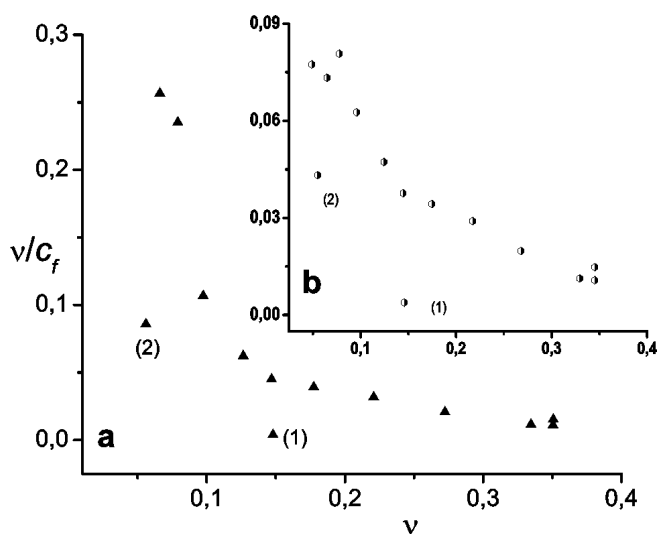


Рис. 8. Ті ж дані, що і на рис. 4, в координатах Скетчарда

194,3; оскільки вже ясно, що графік Скетчарда суттєво залежить від цієї величини, знову перебудуємо його і знайдемо параметри зв'язування (рис. 9):

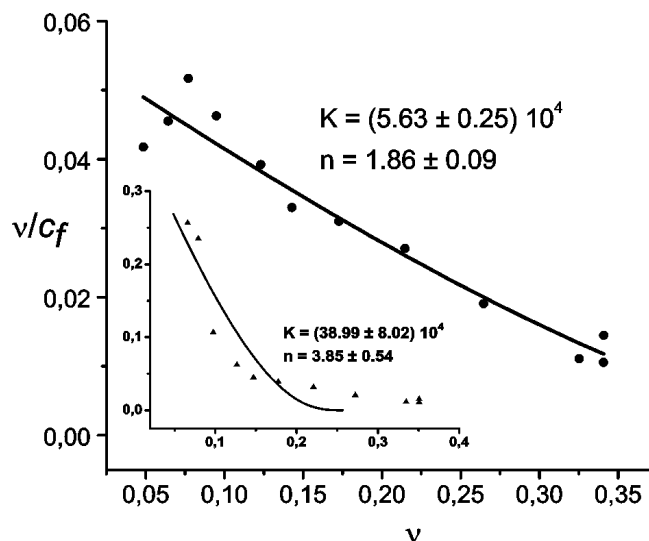
$$K = (5,63 \pm 0,25) \cdot 10^4, \quad n = 1,86 \pm 0,09.$$

Для порівняння виконаємо апроксимацію для початкового графіка Скетчарда (рис. 8,а), звичайно, побувши точок (1) та (2); див. рис. 9 (вставка).

Таким чином, значення  $A_b$ , отримане в результаті безпосередньої апроксимації даних, забезпечує краще збігання теоретичної кривої та експериментальних точок в змінних Скетчарда (рис. 9), ніж отримане без такої апроксимації (рис. 9, вставка). Значення константи зв'язування дуже залежить від точності визначення  $A_b$ . В нашому випадку при переході від 188,9 до 194,3, тобто при зміні  $A_b$  менш ніж на 3% (що близько до похибки визначення цієї величини), константа зв'язування змінилась на порядок (див. значення параметрів на рис. 9). Похибка, відзначена в координатах Скетчарда, не враховує вказаного вище факту, тому не має жодного змісту.

Якщо перехід до координат Скетчарда виконано з достатньою точністю, то результати практично збігаються з отриманими при безпосередній апроксимації, проте ця "достатня" точність вимагає досить копіткої обробки початкових даних.

Могло скластись враження (рис. 8), що координати Скетчарда дозволяють легко відсіяти "погані" експериментальні точки – але при безпосередній апроксимації не становить жодних складностей виявити точки, що вносять підозріло велику похибку. Крім того, перевагою програми є однаково проста робота з да-

Рис. 9. Апроксимація в змінних Скетчарда рівнянням МакГі-фон Хіппеля для некооперативного зв'язування. Вставка: те саме, але  $A_b$  визначався без апроксимації початкових даних

ними, що дають як лінійні, так і нелінійні графіки Скетчарда.

## 5. Висновки

Таким чином, аналіз за спектрами поглинання та ФЛ проявів взаємодії алкалоїдів берберину та сангвінарину з ДНК свідчить про їх зв'язування з ДНК. Показано, що характер зв'язування залежить від співвідношення концентрацій алкалоїду та пар основ ДНК.

Визначено параметри зв'язування берберину з ДНК за допомогою модифікованого рівняння МакГі-фон Хіппеля для кооперативного зв'язування. Отримані параметри свідчать, що спосіб зв'язування – інтеркаляція.

Визначено параметри зв'язування сангвінарину з ДНК. Для взаємодії сангвінарину з ДНК характерними є два типи зв'язування: при  $N/c < 2$  переважає зовнішнє зв'язування, при  $N/c > 6$  – інтеркаляція.

1. Н.В. Башмакова, С.Ю. Кутовий, В.М. Ящук, Д.М. Говорун, М.Ю. Лосицький, Л.А. Заїка, УФЖ **54**, 471 (2009).
2. T.-K.E. Li, E. Bathory, E.J. La Voie *et al.*, *Biochemistry* **39**, 7107 (2000).
3. D. Debnath, G.S. Kumar, and M. Maiti, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **9**, 61 (1991).
4. D.S. Pilch, C. Yu, D. Makhey, E.J. La Voie, A.R. Srinivasan, V.K. Olson, R.R. Sauers, K.J. Breslauer,

- N.E. Geacintov, and L.F. Liu, *Biochemistry* **36**, 12542 (1997).
5. A.K. Sun, Y. Kwon, J.H. Kim, M.T. Muller, and I.K. Cheng, *Biochemistry* **37**, 16316 (1998).
6. W.-Y. Li, H. Lu, C.-X. Xu, J.-B. Zhang, and Z.-H. Lu, *Spectrosc. Lett.* **31**, 1287 (1998).
7. S. Mazzini, M.C. Bellucci, and R. Mondelli, *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 505 (2003).
8. X. Su, L. Kong, X. Li, X. Chen, M. Guo, and H. Zou, *J. Chromatogr. A* **1076**, 118 (2005).
9. M. Maiti and G.S. Kumar, *Med. Res. Rev.* **27**, 649 (2007).
10. E. Smekal, N. Kubova, and V. Kleinwachter, *Stud. Biophys.* **114**, 125 (1984).
11. M. Maiti, S. Das, A. Sen *et. al.*, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **20**, 455 (2003).
12. S.S. Srivastava, E. Coutinho, and M. Maiti, *Indian J. Biochem. Biophys.* **33**, 74 (1995).
13. B. Valeur, *Molecular Fluorescence – Principles and Applications* (Wiley-VCH, Weinheim, 2002).
14. J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer, New York, 2006).
15. В.Л. Левшин, *УФН* **LXIV**, 55 (1958).
16. J. Urbanova, P. Lubal, I. Slaninova, E. Taborska, and P. Taborsky, *Ann. Bioanal. Chem.* **394**, 997 (2009).
17. G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660 (1949).
18. J.D. McGhee and P.H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **86**, 469 (1974).
19. M.W. Davidson, I. Lopp, S. Alexander, and W.D. Wilson, *Nucleic Acid Res.* **4**, 2697 (1977).

Одержано 14.02.11

ПАРАМЕТРЫ СВЯЗЫВАНИЯ АЛКАЛОИДОВ  
БЕРБЕРИНА И САНГВИНАРИНА С ДНКВ.Г. Гуменюк, Н.В. Башмакова, С.Ю. Кутовой, В.М. Ящук,  
Л.А. Заика

## Резюме

Исследовано взаимодействие растительных алкалоидов берберина и сангвинарина с ДНК в водных растворах методами оптической спектроскопии (поглощение, флуоресценция). Рассмотрены зависимости спектральных характеристик алкалоидов от соотношения между концентрациями пар основ ДНК и молекул алкалоида ( $N/c$ ), определены проявления связывания алкалоидов с ДНК. Показано, что характер связывания зависит от  $N/c$ . С помощью модифицированных уравнений Скэтчарда и МакГи–фон Хиппеля определены параметры связывания берберина и сангвинарина с ДНК.

BINDING PARAMETERS OF ALKALOIDS BERBERINE  
AND SANGUINARINE WITH DNAV.G. Gumenyuk<sup>1</sup>, N.V. Bashmakova<sup>1</sup>, S.Yu. Kutovyy<sup>1</sup>,  
V.M. Yashchuk<sup>1</sup>, L.A. Zaika<sup>2</sup><sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv  
(6, Prosp. Academician Glushkov, Kyiv 03127, Ukraine;  
e-mail: lns@univ.kiev.ua)<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Nat. Acad. of Sci. of Ukraine  
(150, Academician Zabolotnyi Str., Kyiv 03143, Ukraine)

## Summary

We study the interaction of berberine and sanguinarine (plant alkaloids) with DNA in aqueous solutions, by using optical spectroscopy methods (absorption and fluorescence). The dependences of alkaloid spectral characteristics on the concentration ratio  $N/c$  between the DNA base pairs and alkaloid molecules in the solutions are considered, and the manifestations of the alkaloid–DNA binding are revealed. The character of binding is found to depend on  $N/c$ . The parameters of the binding of berberine and sanguinarine with DNA are determined, by using the modified Scatchard and McGhee–von Hippel equations.