

СВЯЗЫВАНИЕ БЕРБЕРИНА И АМИТОЗИНА С ТИМУСНОЙ ДНК ТЕЛЕНКА

Е. Б. КРУГЛОВА¹, Е. Л. ЕРМАК², Т. П. ВОЛОЩУК³, А. И. ПОТОПАЛЬСКИЙ³,
Ю. А. ПОТОПАЛЬСКАЯ³

¹Институт радиофизики и электроники НАН Украины, Харьков;
e-mail:kruglova@ire.kharkov.ua;

²Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, Украина;

³Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: t.p.voloshchuk@imbg.org.ua; juliakiev77@rambler.ru

Спектрофотометричним методом у видимій і УФ-областях спектра досліджено зв'язування амітозину та берберину з ДНК тимуса теляти. Показано, що амітозин утворює з ДНК комплекс одного типу, а берберин – комплекси двох типів. Аналіз концентраційної залежності спектрів поглинання та ізотерм зв'язування, проведений з використанням програми оптимізації DALSMOD, дозволив обчислити константи комплексоутворення амітозину та берберину з ДНК для першого типу комплексів: $K_{\text{Бк}} = 3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ і $K_{\text{Ам}} = 1,6 \cdot 10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1}$. Досліджено конкурентне зв'язування берберину з ДНК за присутності в реакційному середовищі бромистого етидію. Показано, що останній конкурує з берберином за місця зв'язування за типом інтеркаляції.

К л ю ч о в і с л о в а: амітозин, берберин, алкалоїди, ДНК, комплексоутворення, конкурентне зв'язування, етидіум бромід.

Уже в глубокой древности для лечения различных по этиологии и патогенезу болезней эмпирически использовали чистотел большой (*Chelidonium majus*). Это растение, являющееся живой лабораторией, открывает путь для перспективных направлений по молекулярной модификации алкалоидов.

Благодаря исследованиям химиков-аналитиков, биохимиков, фармакологов и врачей удалось установить, что разностороннее биологическое действие чистотела (а используется он для лечения многих кожных болезней с 18 ст., чему и обязан своим названием) в основном обусловлено алкалоидами, число которых достигает 26–28. Следует отметить сложность и непостоянство алкалоидного состава чистотела, поскольку в период его вегетации постоянно происходят процессы молекулярных превращений одних алкалоидов в другие, не говоря уже о явлениях изомерии и таутомерии.

Начиная с 1961 г., А. И. Потопальским с сотруд. [1–5] проводится активная работа по созданию на основе суммы и отдельных алкалоидов чистотела, модифицированных тиотэфом (тиофосфамидом), нового класса фитохимических веществ, обладающих разносторонним биологическим эффектом (противоопухолевым, антилейкозным, антимикробным, антивирусным, иммуномодулирующим) и незначительной токсичностью. Большинство публикаций по этой теме посвящены исследованию именно этого, преимущественно медицинского аспекта, однако ра-

боты по физико-химическому изучению полученных препаратов, которые могли бы объяснить механизм воздействия их на живой организм, практически отсутствуют [6].

На данном этапе исследований наиболее изучен амитозин – препарат, полученный путем алкилирования суммы алкалоидов чистотела тиотэфом. Имея в своем составе алкалоиды, обладающие сильной флуоресценцией (берберин, хелидонин, сангвинарин и др.), амитозин также “светится”. При введении его в опухоль окружающая здоровая ткань не флуоресцирует, что является свидетельством избирательности связывания препарата и, в определенной степени, объясняет его противоопухолевое действие [7, 8]. Способность амитозина и его отдельных алкилированных составляющих “светиться” успешно используется для изучения молекулярно-клеточных механизмов диагностики опухолевого процесса и контроля эффективности лечения им новообразований [7, 8], а также для изучения взаимодействия этих препаратов с ДНК и РНК [9–11].

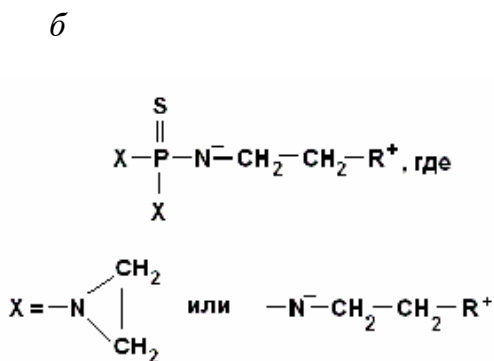
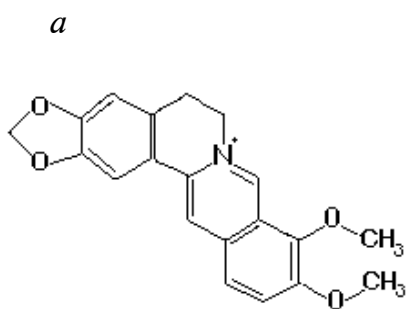
В данной работе приведены результаты исследований взаимодействия амитозина (модифицированной тиотэфом суммы алкалоидов чистотела) и немодифицированного алкалоида берберина с тимусной ДНК, сравнивается их комплексобразующая способность и сделаны выводы об активности и типах комплексов, образуемых ими с ДНК. Для определения типа комплекса берберина с дезоксирибонуклеиновой кислотой мы сочли целесообразным исследовать его

связывание с ДНК в присутствии известного ин-теркалятора – бромистого этидия.

Материалы и методы

В работе использовали коммерческую ДНК фирмы «Serva» (Германия) и берберин хлорид (Бх) фирмы «ALPS Pharmaceutical» (Япония). Алкалоиды для получения амитозина выделяли из *S. majus*, которые затем алкилировали по модифицированной методике, приведенной в монографиях [3, 5]. Полученный препарат представлял собой гигроскопическую массу, для высушивания которой использовали этанол. Часть препарата, перешедшего в спиртовой раствор, обозначили как амитозин 1 (Ам 1), а нерастворившуюся в этаноле часть (но растворимую в воде) – как амитозин 2 (Ам 2). Значения коэффициентов молярного поглощения препаратов были вычислены путем деления поглощений лигандов на их концентрации, определенные весовым методом. В максимуме поглощения они составляют: $\epsilon_{345} = 2,42 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для Бх, $\epsilon_{290} = 7,12 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для Ам 1 и $\epsilon_{270} = 1,99 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для Ам 2. При изучении конкурентного связывания двух лигандов с ДНК использовали этидиум бромид [12]. Для определения его концентрации использовали значение ϵ_{480} , равное $5,85 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [12].

Ниже приведены формулы, где (а) – Бх, а б – Ам 1 и Ам 2; R^+ в амитозине обозначает разный набор алкалоидов, относящихся к группе берберина, хелидонина и протопина:



Спектрофотометрические измерения проводили в кюветах с длиной оптического пути 1, 2 и 10 мм на спектрофотометре Spesord M40 (Германия). Особенности комплексообразования изучали в фосфатном буферном растворе, содержащем $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ KH_2PO_4 и $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ Na_2HPO_4 (рН 6,86). При определении концентрации тимусной ДНК в молях нуклеотидов (C_p^0) использовали значение коэффициента молярного поглощения при λ 260 нм: $\epsilon_{260} = 6,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [13], а величины R/D вычисляли как величину отношения общих концентраций ДНК (C_p^0) к концентрации исследуемого лиганда (C_D^0).

При определении констант связывания и величин мест связывания n (где n равно количеству нуклеотидов, занимаемых лигандом на матрице ДНК) в исследуемых препаратах с ДНК использовали уравнение J. D. McGee и P. H. Nirpel [14], которое описывает связывание лигандов с полиэлектролитной матрицей:

$$\frac{R}{C_f} = K \left[\frac{1 - R \times n}{1 - R \times n + R} \right]^n (1 - R \times n + R), \quad (1)$$

где K – константа связывания лиганда; R – доля связанного лиганда, равная частному от деления равновесной концентрации комплекса на концентрацию ДНК (C_p^0); C_f – концентрация свободного лиганда.

Для вычисления параметров связывания исследуемых лигандов с ДНК (K и n) по уравнению (1) нами была использована методика оптимизации спектров поглощения смесей ДНК – лиганд в широкой области длин волн и концентраций этой нуклеиновой кислоты по разработанной ранее программе оптимизации DALSMOD [15–19] с учетом точности в измерении оптических плотностей при каждой длине волны ($\Delta A = 0,005$) и ошибок в приготовлении концентрации раствора (1%).

Результаты и обсуждение

1. Изучение связывания лигандов с ДНК в нейтральных растворах

На рис. 1 приведены спектры поглощения смесей ДНК – Бх и ДНК – Ам 1 при разных концентрациях нуклеиновой кислоты и постоянных концентрациях соответствующих лигандов. Установлено, что для Бх (рис. 1, а) и для Ам 1 (рис. 1, б) с ростом концентрации ДНК как в видимой, так и в УФ-областях наблюдается длинноволновый сдвиг полосы поглощения, который сопровождается уменьшением абсорбции и появлением изобестических точек. Это свидетельствует о связывании изучаемых лигандов с мат-

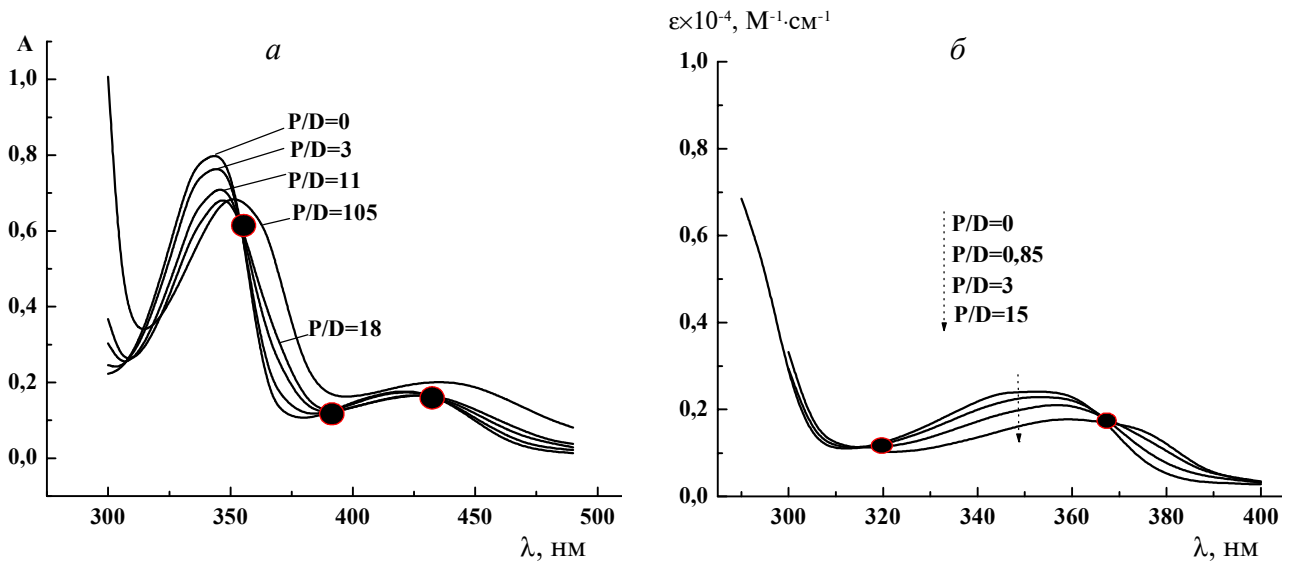


Рис. 1. Спектры поглощения смесей ДНК – Бх ($C_{Бх} = 3,33 \cdot 10^{-5} M$, а), и ДНК – Ам1 ($C_{Ам1} = 2,04 \cdot 10^{-4} M$, б) в фосфатном буферном растворе ($2,5 \cdot 10^{-2} M K H_2 P O_4 + 2,5 \cdot 10^{-2} M N a_2 H P O_4$, рН 6,86) при различных значениях P/D. Кружками отмечены изобестические точки.

рицей ДНК и об образовании в области низких значений P/D лишь одного типа комплекса. Аналогичные спектральные изменения отмечены и при взаимодействии тимусной ДНК с этидиум бромидом [18], для которого характерно образование комплекса только по типу интеркаляции. Следует, однако, отметить, что для Бх при больших концентрациях ДНК (например, P/D = 105) спектры поглощения смесей уже не проходят через отмеченные изобестические точки. Это свидетельствует об образовании второго типа комплексов и требует более детального исследования как для Бх, так и для Ам 1 и Ам 2.

Как следует из рис. 2, спектры поглощения Ам 1 (а) и Ам 2 (б) отличаются, что объясняется неодинаковым составом препаратов. В отличие от Ам 1, в спектре Ам 2 при увеличении концентрации ДНК в пределах P/D от 0 до 10, мы не обнаружили существенных изменений и появления изобестических точек. Это может свидетельствовать о более слабом, чем для Ам 1, связывании Ам 2 с ДНК. Значительное поглощение нуклеиновой кислоты и совпадение ее спектров со спектрами поглощения Ам2 в УФ-области препятствует анализу спектров поглощения смесей Ам 2 – ДНК, а в видимой области такой анализ

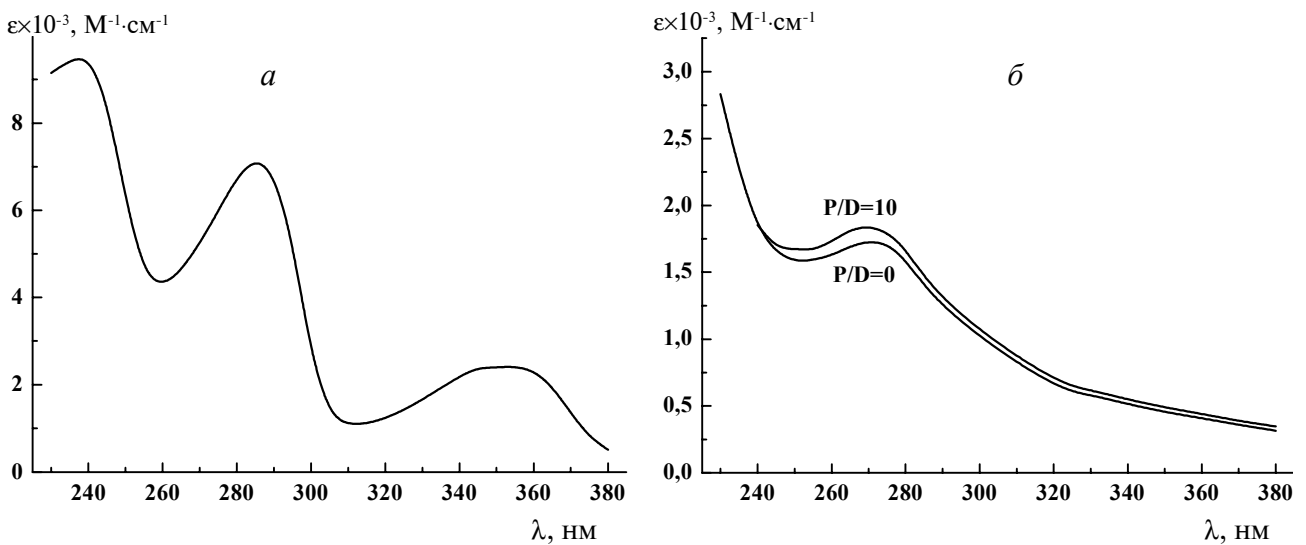


Рис. 2. Спектры поглощения в фосфатном буферном растворе (той же концентрации, что и на рис. 1) Ам 1 при $C_{Ам1} = 2,04 \cdot 10^{-4} M$ (а), Ам 2 (P/D=0) и смеси Ам 2 с ДНК при $C_{Ам2} = 5,34 \cdot 10^{-4} M$ (б).

затруднен из-за слабого поглощения Ам 2. Поэтому говорить о возможности установления образования для Ам 2 второго типа комплекса данным методом не представляется возможным. Константы связывания Ам 2 с ДНК невозможно вычислить из-за наличия в этом образце большего по сравнению с Ам 1 видового состава алкалоидов, имеющих разное строение, что вносит существенные погрешности при определении концентрации активного вещества.

Для вычисления констант комплексообразования и величин мест связывания исследуемых лигандов Бх и Ам 1 с ДНК нами были построены соответствующие изотермы связывания (изотермы Скетчарда), которые рассчитывали с использованием следующих уравнений:

$$A = \epsilon_b \times C_b + \epsilon_f \times C_f \quad (2)$$

$$C_D^0 = C_b + C_f \quad (3)$$

$$C_b = (A - \epsilon_f \times C_D^0) / (\epsilon_b - \epsilon_f), \quad (4)$$

где A – поглощение смеси ДНК – лиганд при выбранной длине волны; ϵ_b , ϵ_f – молярные коэффициенты поглощения связанного и свободного лигандов при той же длине волны соответственно; C_D^0 – общая (аналитическая) концентрация лигандов; C_b , C_f – концентрации связанного и свободного лигандов соответственно. Молярные коэффициенты поглощения связанного лиганда ϵ_b определяли из спектров насыщения, когда добавление каждой последующей порции раствора ДНК уже практически не приводит к изменению поглощения смесей. После вычисления C_b для каждой смеси рассчитывали величины R (обозначения приведены в уравнении 1) и строили изотермы Скетчарда в координатах R/C_f от R .

На рис. 3 представлены изотермы связывания Бх и Ам 1 с ДНК, построенные в максимуме поглощения лигандов в видимой области спектра.

Анализируя полученные изотермы, можно вычислить величины констант связывания (пересечение графика с осью ординат) и величины мест связывания n (обратная величина пересечения графика с осью абсцисс) [14] для каждого из рассмотренных алкалоидов. Так, для Бх и Ам 1 $K \approx 3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ и $2,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ соответственно. Как следует из предыдущих наших исследований [18], для хорошо изученного интеркалятора этидиума

бромид константа связывания с тимусной ДНК в том же буферном растворе равна $1,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, т.е. она почти на два порядка выше, чем для исследуемых нами алкалоидов.

Более точные значения констант и величин мест связывания, а также молярные коэффициенты поглощения свободных и связанных лигандов для Бх и Ам 1 в видимой области спектра были получены нами при использовании программы оптимизации DALSMOD (рис. 4) [15, 17]. В приведенной ниже таблице вычисленные по этой программе оптимальные значения констант связывания Бх, этидиума бромида и Ам 1 с ДНК сравниваются со значениями, определенными методом анализа изотерм Скетчарда. Они достаточно хорошо совпадают для Бх и этидиума бромида и несколько хуже – для амитозина.

2. Анализ конкурентного связывания Бх с ДНК в присутствии этидиума бромида

Чтобы выяснить, какие типы комплексов образует Бх с ДНК мы провели исследование его конкурентного связывания с нуклеиновой кислотой в присутствии часто используемого интеркалятора этидиума бромида. Сравнение концентрационных зависимостей поглощения смесей Бх с ДНК в присутствии и в отсутствие этидиума бромида провели в видимой области спектра, где поглощают оба лиганда и их комплексы с ДНК. Из кривых на рис. 5, а следует, что поглощение смесей ДНК – этидиум бромид не изменяется в длинах волн, соответствующих изобестическим точкам при $\lambda = 400$ и 505 нм . Если теперь из поглощения смесей ДНК – Бх – этидиум бромид при длине волны $\lambda = 400 \text{ нм}$ вычесть соответствующее поглощение интеркалятора и построить зависимости поглощения смесей Бх – ДНК от $\lg P/D_{\text{Бх}}$, то можно увидеть, как присутствие этидиума бромида влияет на связывание Бх с ДНК. Так, при низких концентрациях ДНК количество связанного с ДНК Бх при наличии в инкубационной среде этидиума бромида практически не изменяется, что подтверждается совпадением кривых титрования этих смесей с кривыми смесей, в которых он не содержится (рис. 5, б; кривые 1, 2). Однако при дальнейшем увеличении концентрации ДНК и появлении второго типа комплекса, как это видно из приведенного

Параметры связывания лигандов с ДНК

Лиганд	$K, \text{ M}^{-1}$ (по изотерме Скетчарда)	$K, \text{ M}^{-1}$ (по программе оптимизации DALSMOD)	n
Бх	$\sim 3 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$	5–6
Ам 1	$\sim 2,5 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3 - 10^4$	1–2
Этидиум бромид	$1,4 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	4

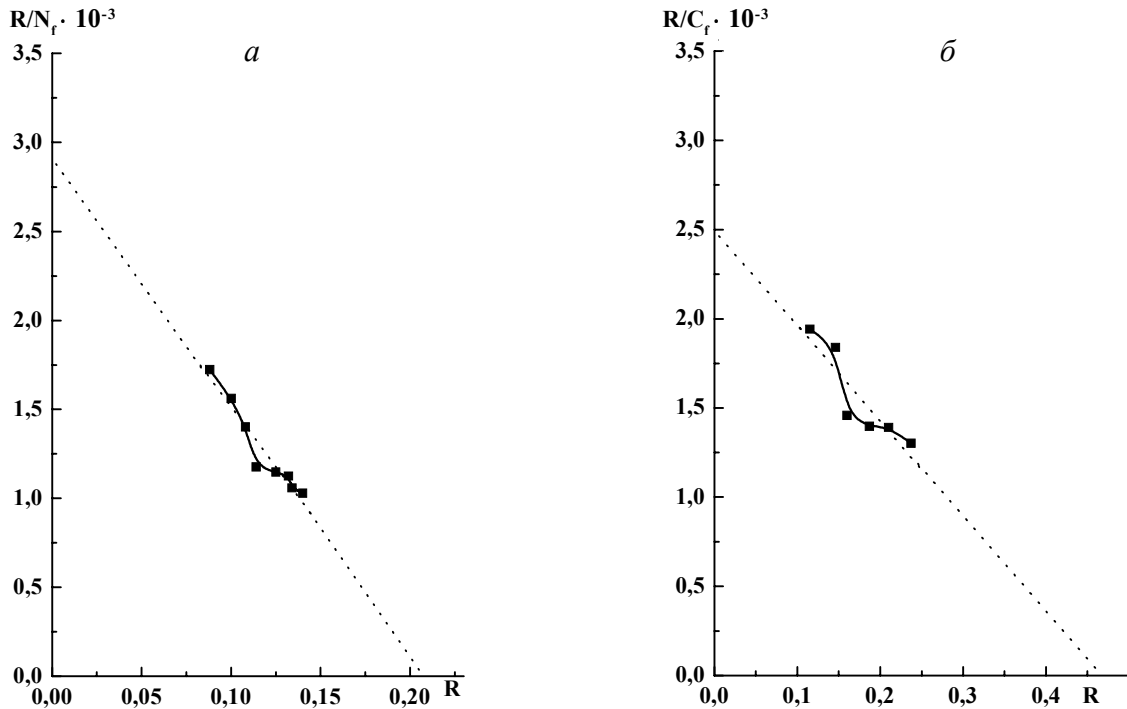


Рис. 3. Изотермы связывания Бх (а) и Ам 1 (б) с ДНК в фосфатном буферном растворе. Пунктиром обозначена линейная аппроксимация зависимостей R/C_f от R .

раннее рис. 1, поглощение смесей Бх – ДНК в присутствии этидиум бромид (кривая 2) становится существенно меньшим, чем поглощение этих смесей в его отсутствие (кривая 1). Это можно объяснить тем, что количество Бх, связанного с ДНК по первому типу комплекса в присутствии интеркалятора в этой области значений P/D

возрастает. При больших значениях P/D спектры поглощения смесей Бх – ДНК уже не проходят через изобестические точки, что свидетельствует об образовании второго типа комплекса.

Следует отметить, что поглощение смеси Бх – ДНК при длине волны 400 нм (изобестическая точка этидиум бромид) возрастает (кри-

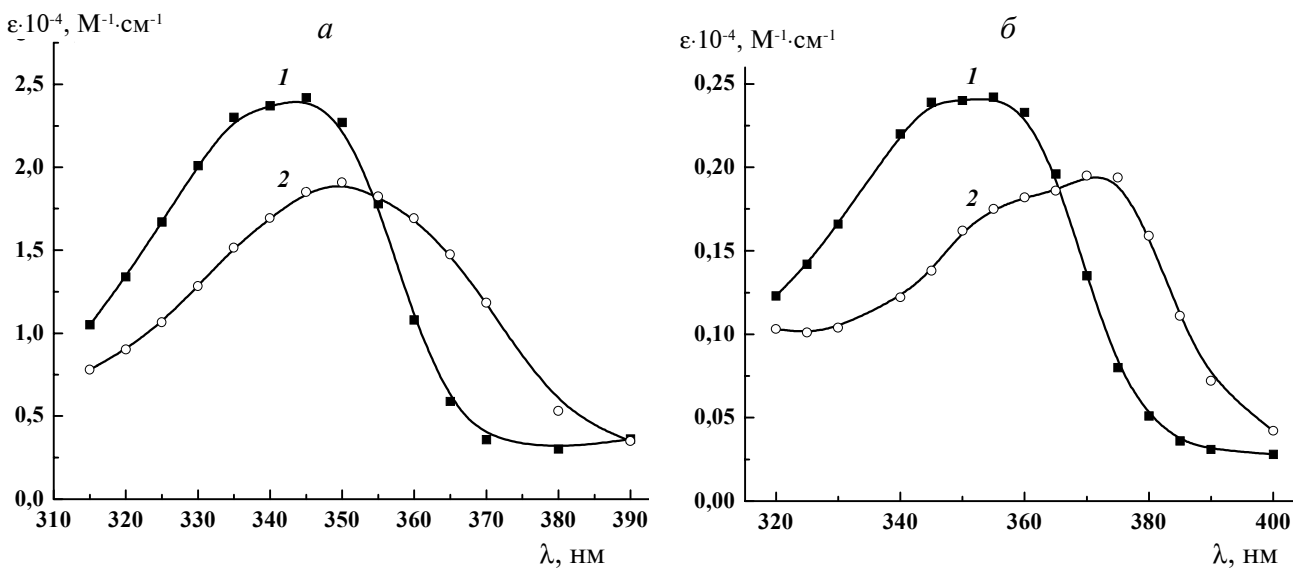


Рис. 4. Коэффициенты молярного поглощения свободного (кривая 1) и связанного с ДНК (кривая 2) Бх (а) и Ам 1 (б), полученные по программе оптимизации DALSMOD.

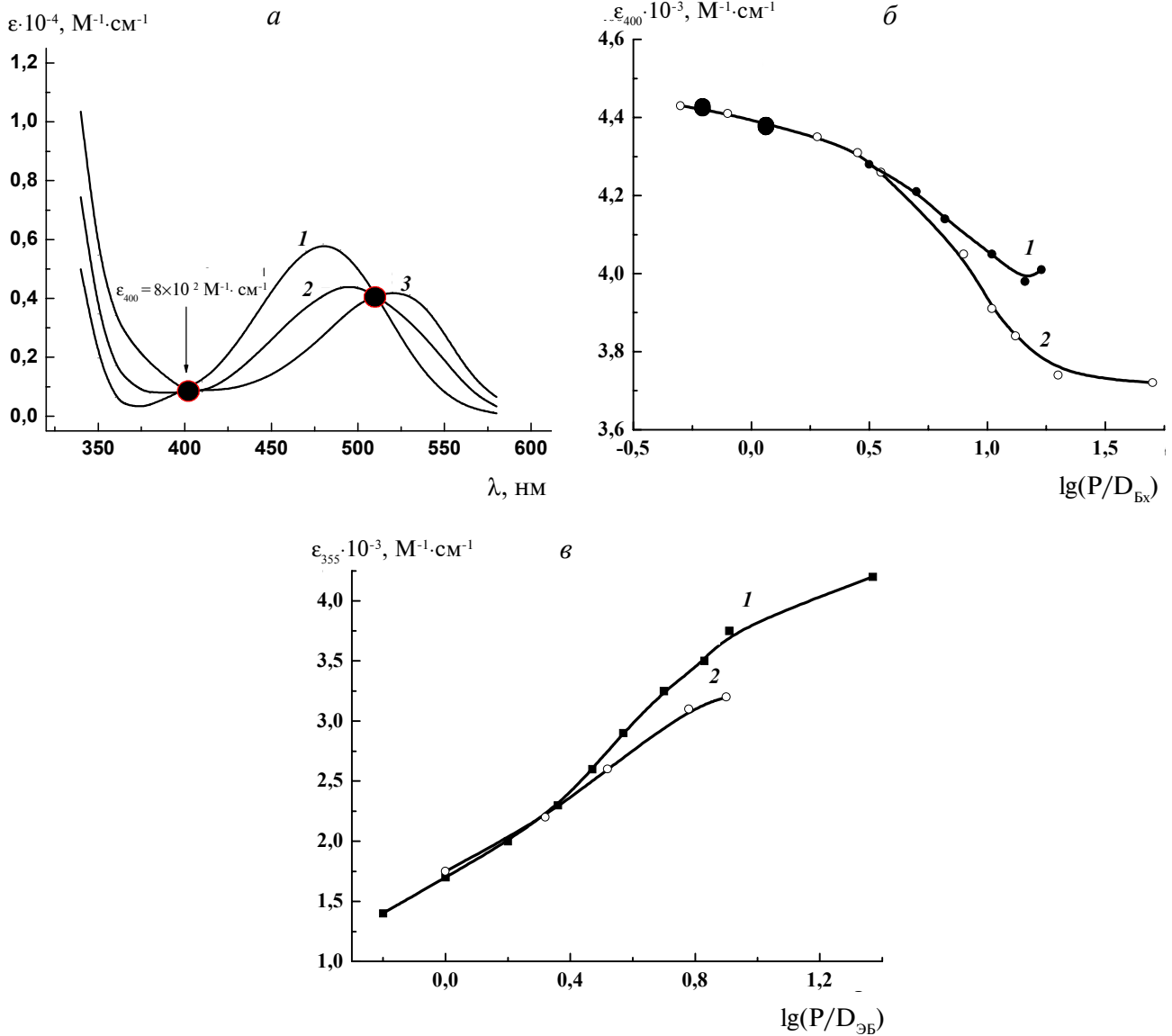


Рис. 5. Спектры поглощения смесей ДНК – этидиум бромид при различных значениях P/D : 1 – $P/D = 0$; 2 – $P/D = 2$; 3 – $P/D = 30$, $C_{ЭБ} = 1,52 \cdot 10^{-4} M$ (а); зависимость поглощения смесей Бх – ДНК ($C_{Бх} = 3,33 \cdot 10^{-5} M$) (1) и Бх – ДНК – этидиум бромид ($C_{Бх} = 3,33 \cdot 10^{-5} M$, $C_{ЭБ} = 1,82 \cdot 10^{-5} M$) (2) от $P/D_{Бх}$ при $\lambda = 400 nm$ (б), зависимость поглощения смесей этидиум бромид – ДНК (1) и Бх – ДНК – этидиум бромид (2) от $P/D_{ЭБ}$ при $\lambda = 355 nm$ (в).

вая 1 рис. 5, б). Однако в присутствии этидиум бромида увеличение поглощения не наблюдается (кривая 2 рис. 5, б). Следовательно, изучаемый интеркалятор, занимая места связывания на ДНК по типу интеркаляции, препятствует образованию второго типа комплекса Бх на ДНК в данной области значений P/D . Следовательно, можно предположить, что этидиум бромид влияет на связывания Бх с ДНК, конкурируя с ним за места связывания, преимущественно по второму типу комплексов. Именно этот тип связывания Бх с ДНК может быть интерпретирован нами как интеркаляция.

Если теперь построить такие же зависимости при $\lambda = 355 nm$ (изобестической точки для смесей Бх – ДНК), то можно проследить за изменениями связывания с ДНК этидиума бромида в присутствии Бх (рис. 5, в; кривая 2). В этом случае количество интеркалятора, связанного с ДНК, также уменьшается по сравнению с контрольным экспериментом (рис 5, в; кривая 1).

Таким образом, есть основания полагать, что при взаимодействии с тимусной ДНК Бх образует два типа комплексов: первый – по типу внешнего связывания (при низких значениях P/D), и второй – по типу интеркаляции при

значительных концентрациях ДНК. Ам1 при аналогичных условиях и низких концентрациях ДНК также образует комплексы по первому типу связывания.

Константы связывания обоих алкалоидов с ДНК в области низких значений P/D, которые незначительно различаются между собой, оказываются на два порядка ниже, чем для этидиум бромид.

BERBERINE AND AMITOZINE BINDING WITH CALF THYMUS DNA

*E. B. Kruglova, E. L. Ermak,
T. P. Voloshchuk, E. I. Potopalsky,
Yu. A. Potopalska*

¹Institute of Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov;
e-mail: kruglova@ire.kharkov.ua

²Karazin Kharkov National University, Ukraine;

³Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: t.p.voloshchuk@imbg.org.ua;
juliakiev77@rambler.ru

S u m m a r y

Binding of amitozine and berberine to DNA has been investigated by VIS- and UV-spectroscopy. It has been found that amitozine forms one type of complex and berberine forms two types of complexes with DNA. Observed concentration dependences of absorption spectra were analyzed using the DALSMOD optimization program and association constants were calculated ($K_{BCI} = 3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_{Am} = 1.6 \cdot 10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1}$). Competitive binding of berberine to DNA in presence of ethidium bromide has been investigated as well. It has been shown that it competes with berberine for DNA binding sites.

К е у w o r d s: amitozine, berberine, DNA, complexation, competitive binding, ethidium bromide.

1. *Потопальский А. И.* Результаты экспериментального изучения нового противоопухолевого препарата "амитозин". Диссертация. Ивано-Франковск. 1965.
2. *Потопальский А. И., Акишина Т. М.* // Микробиол. журн. 1975. **37**, Вып. 6. С. 755–759.

3. *Потопальский А. И., Петличная Л. И., Ивасивка С. В.* Модификация алкалоида берберина. К.: Наук. думка. 1982. 110 с.
4. *Потопальский А. И., Петличная Л. И., Ивасивка С. В.* Барбарис и его препараты в биологии и медицине. К.: Наук. думка. 1989. С. 156–158.
5. *Потопальский А. И.* Препараты чистотела в биологии и медицине. К.: Наук. думка. 1992. 237 с.
6. *Skinner B.* // Chem. Soc. 1950. P. 823–827.
7. *Потопальская Ю. А., Лукаш Л. Л., Пидпала О. В.* / Тезисы. Учредит. съезд Укр. общ. клеточной биологии. Львов. 25–28 апреля 2004 г. С. 124.
8. *Потопальская Ю. А., Заика Л. А., Сусак Я. М.* // Материалы III съезда онкологов и радиологов СНГ. Минск. 25–28 мая 2004 г. С. 414.
9. *Potopalskaya Y. A., Kordysh M. A.* // Conference for young scientists, phd students and students on molecular biology and genetics. Kiev. September 25–27. 2003. С. 118.
10. *Yashchuk V. M., Dudko O. V., Zayika L. A. et al.* // 5th International conference. Kiev. May 24–29. 2004. P. 43–44.
11. *Сусак Я. М., Осинський С. П., Потопальська Ю. А.* Спосіб лікування раку підшлункової залози. Деклараційний патент на винахід 51566 – 15.11.2002. Бюл. № 11.
12. *Bresloff J. L., Crothers D. M.* // J. Mol. Biol. 1975. **95**. P. 103–123.
13. *Muller W., Crothers D. M.* // Eur. J. Biochem. 1975. **54**. P. 267–277.
14. *McGhee J. D., von Hippel P. H.* // J. Mol. Biol. 1974. **86**. P. 469–489.
15. *Круглова Е. Б., Малеев В. Я., Глибин Е. Н., Веселков А. Н.* // Вісн. Харк. ун-ту № 560. Біофіз. вісник. 2002. **1**, № 10. С. 21–29.
16. *Круглова Е. Б., Зиненко Т. Л.* // Мол. биол. 1993. **27**, № 3. С. 655–665.
17. *Круглова Е. Б.* // Биофизика. 1994. 39, вып. 3. С. 280–288.
18. *Круглова Е. Б.* // Вісн. Харк. ун-ту. № 525. Біофіз. 2001. **1**, № 8. С. 27–33.
19. *Anti-cancer drug design: biological and biophysical aspects of synthetic phenoxazone derivatives.* / Eds. A. N. Veselkov, D. B. Davies. Sevastopol: SEVNTU PRESS. 2002. 259 p.

Получено 10.02.2005