

УДК 535.34, 535.37

Кутовий С. Ю.¹, к.ф.-м.н., доц.
Савчук Р. С.², студ.
Башмакова Н. В.³, к.ф.-м.н., асист.

S.Yu. Kutovyy¹, PhD, assoc.prof.
R. S. Savchuk², stud.
N. V. Bashmakova³, PhD, assist.prof.

Параметри зв'язування алкалоїду сангвінаріну з ДНК

Binding parameters of sanguinarine to DNA

^{1,2,3}Київський національний університет імені
Тараса Шевченка, Україна, 01601, місто Київ,
вул. Володимирська, 64/13
e-mail: ¹sanguilaire@gmail.com

^{1,2,3}Taras Shevchenko National University of Kyiv,
64/13, Volodymyrska Street, City of Kyiv, Ukraine,
01601
e-mail: ¹sanguilaire@gmail.com

Досліджено взаємодію рослинного алкалоїду сангвінаріну з ДНК у водному розчині методами оптичної спектроскопії (поглинання, флюоресценція). Розглянуто залежності спектральних характеристик алкалоїду від співвідношення концентрацій пар основ ДНК та молекул алкалоїду P/D, визначено прояви зв'язування алкалоїду з ДНК. Показано, що характер зв'язування залежить від P/D. За допомогою модифікованих рівнянь Скетчарда та МакГі–фон Хіппеля визначено параметри зв'язування сангвінаріну з ДНК.

Ключові слова: ДНК, сангвінарін, рівняння зв'язування, інтеркаляція, зовнішнє зв'язування, параметри зв'язування.

The interaction of plant alkaloid sanguinarine with DNA in aqueous solutions, by using optical spectroscopy methods (absorption and fluorescence) was studied. The dependencies of alkaloid spectral characteristics on the concentration ratio P/D between the DNA base pairs and alkaloid molecules in the solutions are considered in the P/D range of 0...22, the manifestations of the alkaloid-DNA binding are revealed. It was found that the dependencies of the optical parameters on P/D have a minimum at small P/D. The changes in optical parameters (the extinction coefficient, fluorescence intensity) were analyzed using a special program operating with the modified Scatchard and McGhee-von Hippel binding equations. It gave opportunity to avoid Scatchard plot building procedure which is too sensitive to experimental data precision. The character of binding is found to depend on P/D. Since two forms of sanguinarine are available in a solution, for calculation of binding parameters the concentrations of SaI and SaII separately from an initial sanguinarine concentration were determined: on the base of the fluorescence spectra the concentration dependence (the curves of a relative content of each form of sanguinarine as a function of pH) was constructed. The model of two binding modes was applied and it was established that the external binding prevails at small values of P/D (≤ 2) and intercalation at $P/D \geq 6$. The parameters of the binding with DNA are determined for external binding and intercalation. The general conclusion about the influence of ligand form on binding ways was also done.

Key Words: DNA, sanguinarine, binding equations, intercalation, external binding, binding parameters.

Статтю представив академік НАН України, д.ф.-м.н., проф. Булавін Л.А.

1. Вступ

Алкалоїд сангвінарін ($C_{20}H_{15}O_5N$ або $C_{20}H_{14}O_4NOH$ [1]) належить до групи бензофенантридинів. Молекула сангвінаріну майже пласка, що робить її потенційним інтеркалятором в подвійну спіраль ДНК. Препарати сангвінаріну проявляють бактерицидні, протизапальні а також протипухлинні [2] властивості.

Відомо [3], 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 (рис. 1).

Проведено чимало фізичних експериментів присвячених дослідженню взаємодії сангвінаріну з ДНК (див., зокрема, [4-9] та огляди [3,10,11]). Взагалі алкалоїди ізохінолінового ряду взаємодіють з ДНК або як інтеркалятори, або ж розміщуються у малій борозенці ДНК. При

зв'язування з ДНК в спектрі поглинання проявляються батохромний (довгохвильовий зсув максимумів) та гіпохромний ефекти. Інтенсивність флюоресценції сангвінаріну при додаванні в розчин молекул ДНК знижується, температура плавлення ДНК зростає, проявляються і інші ефекти.

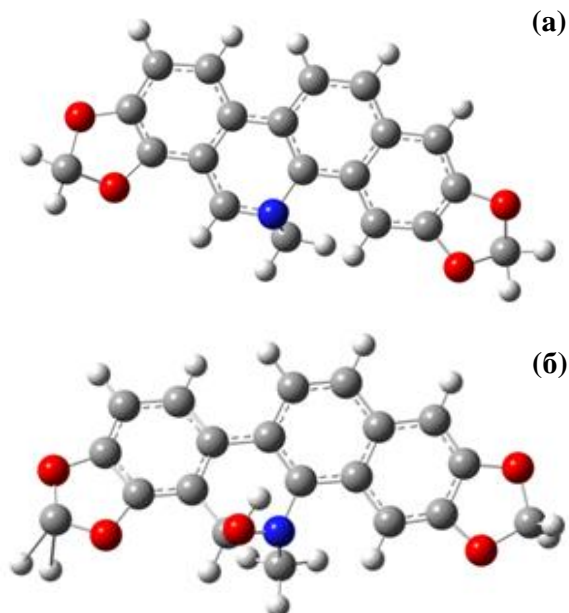


Рис. 1. Будова молекули сангвінаріну
(а – SaI, б - SaII).

В [6] наведено параметри зв'язування сангвінаріну з ДНК, визначені за спектрами поглинання, а у [4] за спектрами поглинання та флюоресценції.

Сангвінарін викликає процеси розкручування-закручування в суперспіральних плазмідах ДНК з кутом розкручування 27° , з чого автори [3] роблять висновок про інтеркаляційний механізм зв'язування. Інтеркаляція сангвінаріну в ДНК була також підтверджена авторами [6]. Дослідження впливу рН та іонної сили на зв'язування свідчать про суттєвий вплив цих факторів [7]. Взаємодія сангвінаріну з ДНК також досліджувалась методами ЯМР [12]. Ці дослідження показали повну інтеркаляцію молекули в подвійну спіраль ДНК, навіть при високих температурах (~ 350 К). За результатами спектрофлюорометричних та спектрофотометричних досліджень визначено термодинамічні характеристики зв'язування сангвінаріну з деякими В-ДНК з різною послідовністю основ в різних діапазонах температур та концентрацій солі натрію. В [6] показано утворення частково інтеркальованих в ДНК комплексів для обох форм сангвінаріну – імінної та алканоламінної. Цей висновок був заперечений результатами

роботи [9], де стверджується, що з ДНК взаємодіє лише одна з форм – імінна, оскільки вона заряджена та пласка, на відміну від нейтральної та вигнутої алканоламінної форми.

В роботі [4] було зроблено висновок про те, що для молекули сангвінаріну характерними є два типи зв'язування: при $P/D < 2$ переважає зовнішнє зв'язування, при $P/D > 6$ – інтеркаляція. Також наведено параметри зв'язування сангвінаріну з В-ДНК, які, проте, були розраховані з використанням загальної концентрації сангвінаріну.

2. Вразки та техніка експерименту

Для проведення експериментів було використано сангвінарін (ІМБГ НАН України), виготовлений у вигляді мікрокристалічного порошку. Алкалоїд розчиняли у воді для ін'єкцій при температурі в інтервалі від $60-70^\circ\text{C}$. Концентрація сангвінаріну в розчині становила 23.75 мкМ/л. Для дослідження було використано ДНК *Calf thymus* ("Serva", Німеччина). Середня молекулярна маса пари основ – близько 650 г/М. Під час дослідження розчину ДНК+Sa, концентрація алкалоїду залишалась сталою, але змінювалась концентрація ДНК. Співвідношення між концентрацією ДНК та концентрацією молекул алкалоїду виражає кількість пар основ ДНК на одну молекулу ліганду.

Спектри поглинання реєструвались на спектрофотометрі *Specord UV VIS* в діапазоні $200-700$ нм. Роздільна здатність складала 1 нм. Спектри флюоресценції, спектри збудження поляризованої флюоресценції та поляризованої флюоресценції були отримані з використанням флюорометра *Cary Eclipse*, в діапазоні $300-800$ нм. Спектральна ширина щілини для флуоресцентних вимірювань становила 5 нм. При отриманні спектрів поляризованої флюоресценції в якості поляризаторів використовувались призми Глана (діапазон пропускання від 300 нм) та плівковий поляризатор (діапазон пропускання від 200 нм), які ставились відповідно після монохроматора збудження та перед монохроматором випромінювання.

3. Обчислення параметрів зв'язування

Для визначення параметрів зв'язування ми використали програму *BindFit*. Ця програма дозволяє оперувати з прямими експериментальними даними без жодних координатних перетворень, відомих як «лінеаризація». Це дає можливість підвищити точність визначення параметрів для процесів, що характеризуються нелінійною кривою навіть після лінеаризації.

Головний принцип обробки даних цією програмою – апроксимація експериментальних значень за допомогою певного рівняння зв'язування. Класичним рівнянням для визначення константи зв'язування є рівняння Скетчарда [13]:

$$\frac{v}{c_f} = K \cdot (1-v) \quad (1)$$

де v - 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. З ряду причин ця залежність може бути нелінійною, зокрема, якщо молекула ліганду займає більш, ніж одне місце зв'язування (а саме n місць) на матриці ДНК. Тоді рівняння виглядає як $v/c_f = K \cdot (1-nv)$, але і воно не завжди є коректним (зокрема, із-за заниження загальної кількості вільних місць зв'язування). МакГі та фон Хіппель [14] удосконалили підхід Скетчарда, поширивши його на випадок $n > 1$, та коректно визначивши кількість незайнятих місць зв'язування. Рівняння МакГі – фон Хіппеля для некооперативного (2) та кооперативного (3) зв'язування мають вигляд:

$$\frac{v}{c_f} = K(1-nv) \cdot \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v} \right)^{n-1} \quad (2)$$

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

де ω – параметр кооперативності,

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

Модифіковані рівняння

Один тип місць зв'язування. Вихідні рівняння МакГі-фон Хіппеля були перетворені від оригінальної форми (2,3) до форми, яка включала в себе лише змінні, що отримувались безпосередньо з експерименту. Як правило, експериментально вимірюється залежність певного оптичного параметра розчину від концентраційного співвідношення розчинених компонент, зазвичай, це співвідношення між загальною концентрацією місць зв'язування та загальною концентрацією лігандів, N/c (тут $N/c \equiv P/D$). Ці концентрації є відомими, на відміну від концентрацій зв'язаних чи вільних лігандів. Тому такі змінні як загальна концентрація лігандів, c , і кількість місць

зв'язування, N , є більш доцільними для процесу обчислень. В такому випадку залишається лише одна невідома змінна у рівнянні, яка може бути визначена чисельно. В результаті ряду простих перетворень рівняння МакГі – фон Хіппеля зводяться до рівнянь відносно змінної c_b – концентрації зв'язаних лігандів:

$$K \cdot (c - c_b) \cdot (N - nc_b) \cdot \left(\frac{N - nc_b}{N - (n-1)c_b} \right)^{n-1} - c_b = 0 \quad (4)$$

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

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

Ці рівняння були реалізовані в програмі і розв'язані чисельно. Це дозволило працювати з концентрацією c_b як з функцією $c_b = c_b(N, c; K, n)$.

Два типи місць зв'язування. У цьому випадку процеси зв'язування описуються системою двох рівнянь, яка повинна брати до уваги, чи є процеси зв'язування лігандів, які займають одне місце зв'язування (тобто пари основ і фосфатні групи), взаємозалежними чи ні. Якщо параметр N позначає концентрацію пар основ ДНК, то $2N$ – кількість місць зв'язування відповідає за перший тип зв'язування (з фосфатами) і N – кількість місць зв'язування, що відповідає інтеркаляції.

Для наших експериментальних даних найкращі результати апроксимації були отримані з використанням системи модифікованих рівняння Скетчарда (для зовнішнього зв'язування) і МакГі-фон Хіппеля (для інтеркаляції). Система описує два незалежні процеси зв'язування лігандів, що займають одне місце зв'язування. Інтеркаляція в інтервал між парами основ можлива лише при умові, що обидва фосфати не зв'язані з лігандом і навпаки, тобто зв'язування з фосфатами можливе лише тоді, якщо жоден ліганд не інтеркалював у відповідний інтервал. Вважається неможливим процес прямого переходу зв'язаного ліганду між місцями зв'язування різних типів, крім того, повинно бути не менше ніж $n-1$ вільних інтервалів між двома лігандами, що інтеркалювали. Така модель описується наступною системою рівнянь:

$$\begin{cases} c_b^{(1)} = K_1 (c - c_b^{(1)} - c_b^{(2)}) \cdot (2N - c_b^{(1)}) \cdot \left(1 - \frac{c_b^{(2)}}{N}\right) \\ c_b^{(2)} = K_2 (c - c_b^{(1)} - c_b^{(2)}) \cdot (N - nc_b^{(2)}) \times \\ \times \left(\frac{N - nc_b^{(2)}}{N - (n-1)c_b^{(2)}}\right)^{n-1} \cdot \left(1 - \frac{c_b^{(1)}}{2N}\right)^2 \end{cases} \quad (6)$$

де $c_b^{(1)}$ і $c_b^{(2)}$ – концентрації лігандів, зв'язаних з місцями першого (зовнішнє зв'язування) і другого (інтеркаляція) типів, K_1 і K_2 – константи зв'язування - для зовнішнього зв'язування та інтеркаляції відповідно. Важливо, що в рівняннях для незалежних процесів виникає додатковий множник; були і деякі важливі обмеження [4]. Крім того, у програмі було враховано значення рН розчину (тобто вміст йонів H^+), що дало можливість визначити кількість зовнішніх місць зв'язування більш точно (не тільки $2N$). В цілому, рівняння мають декілька розв'язків, але, як виявилось, лише один з них задовольняє необхідним обмеженням у робочому діапазоні параметрів.

Детальніше про модифіковані рівняння зв'язування див. [4].

4. Експериментальні результати

Взаємодія алкалоїдів з ДНК характеризується рядом характерних ознак, які проявляються у спектрах поглинання та флюоресценції. Такими ознаками є гіпохромізм смуги поглинання алкалоїду, «червоний» та «синій» зсув максимумів смуг поглинання та флюоресценції, зміна квантового виходу флюоресценції. Показовими є також зміни в спектрах поляризованої флюоресценції. Ці та інші прояви зв'язування сангвінаріну з ДНК були спостережені в оптичних спектрах; побудовано залежності відповідних спектральних характеристик від P/D .

4.1. *Зміни у спектрах поляризованої флюоресценції сангвінаріну у присутності молекул ДНК.* Для аналізу зв'язування сангвінаріну з ДНК було отримано ряд спектрів поляризованої флюоресценції розчинів Sa^+ ДНК при різних значеннях P/D . Для прикладу деякі з них наведено на рис. 2 та рис. 3.

Ступінь анізотропії флюоресценції визначається виразом [15]:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}} \quad (7)$$

де I_{\parallel} та I_{\perp} – відповідно паралельна та перпендикулярна до напрямку збуджуючих

коливань (вертикальних) складові інтенсивності флюоресценції. Оскільки дифракційна ґратка монохроматора має різну чутливість до світла вертикальної та горизонтальної поляризацій, експериментально ступінь анізотропії флюоресценції визначався згідно виразу:

$$r = \frac{I_{vv} - G \cdot I_{vh}}{I_{vv} + 2 \cdot G \cdot I_{vh}} \quad (8)$$

де I_{vv} та I_{vh} – інтенсивності флюоресценції при вертикальній поляризації світла збудження та відповідно вертикальній та горизонтальній поляризації флюоресцентного випромінювання, G -фактор є відношенням чутливостей каналу детекції до вертикально та горизонтально поляризованого світла, експериментально визначається як $G = I_{hv} / I_{hh}$. Із врахуванням G -фактора формула (7) набуває вигляду:

$$r = \frac{I_{vv} - (I_{hv} / I_{hh}) \cdot I_{vh}}{I_{vv} + 2 \cdot (I_{hv} / I_{hh}) \cdot I_{vh}} \quad (9)$$

де I_{hv} та I_{hh} – інтенсивності флюоресценції при горизонтальній поляризації світла збудження та відповідно вертикальній та горизонтальній поляризації флюоресцентного випромінювання.

Ступінь анізотропії обчислювався за результатами чотирьох сканувань необхідного інтервалу довжин хвиль при чотирьох можливих взаємних положеннях поляризаторів збудження та випромінювання згідно виразу (9).

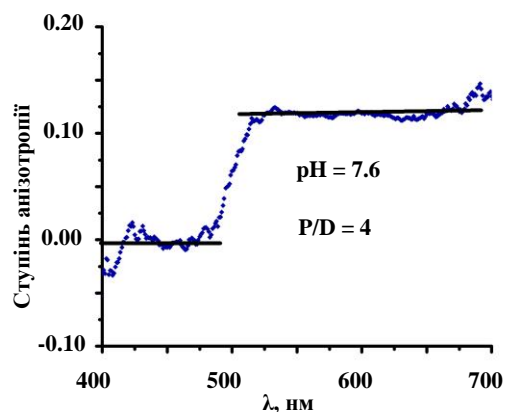


Рис. 2. Залежність ступеня анізотропії r від довжини хвилі.

Для сангвінаріну при малих P/D характерним є зовнішній тип зв'язування, при більших – інтеркаляція. Оскільки рухливість молекули барвника зменшується незалежно від способу фіксації на матриці ДНК, то ступінь анізотропії мав би монотонно зростати. Проте, як виявилось, при $P/D \sim 1$ крива має мінімум (рис. 3). Можливою причиною такої залежності може бути те, що при малих P/D зв'язування з ДНК міняє початкову орієнтацію дипольних

моментів переходу при поглинанні та флюоресценції; проте питання вимагає додаткових досліджень. Швидкий вихід на насичення залежності r (P/D) вказує на те, що вже при P/D = 5 з ДНК зв'язалась максимально можлива в даних умовах кількість молекул алкалоїду. При цьому більше значення ступеня анізотропії для більших P/D означає збільшення рівня фіксації сангвінаріну на матриці ДНК, що є характерним для зв'язування за інтеркаляційним механізмом. Крім того, ступінь анізотропії для імінної форми сангвінаріну значно вищий (рис. 2), це означає, що алканоламінна форма зв'язується суттєво слабше.

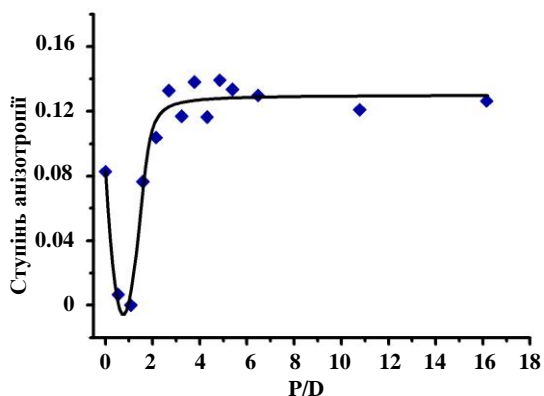


Рис. 3. Залежність ступеня анізотропії (r) смуги 587 нм (SaI) від P/D.

4.2. Вплив pH розчину на спектральні властивості сангвінаріну. При дослідженні розчинів сангвінаріну, важливо знати pH розчинника (у нашому випадку води), оскільки в залежності від pH середовища сангвінарін може існувати у двох різних формах: імінній (SaI, pH = 1-6), та алканоламінній (SaII, pH = 8-12). Відповідно, при значеннях pH водних розчинів, близьких до нейтральних (pH = 6-8), сангвінарін в розчинах присутній в обох формах. Оскільки, як показано в попередніх дослідженнях, з ДНК

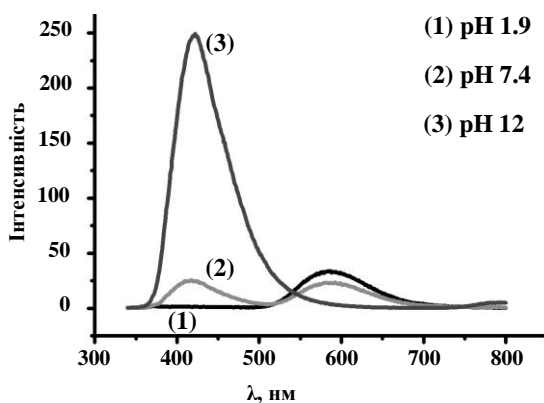


Рис. 4. Спектри флюоресценції сангвінаріну при різних pH.

взаємодіють обидві форми сангвінаріну, для визначення параметрів зв'язування необхідно знати концентрації обох форм SaI та SaII, наявних в розчині.

Для їх визначення було проведено певні додаткові експерименти і виконано деякі розрахунки. По-перше, було отримано ряд (~10) спектрів флюоресценції водних розчинів сангвінаріну при різних значеннях pH, в діапазоні від 2 до 12 (деякі з них показано на рис. 4); pH розчинів забезпечувалось додаванням певної кількості лугу NaOH або кислоти HCl. Реєструвалась інтенсивність смуг ФЛ, відповідних кожній формі сангвінаріну (587 нм для SaI, та 419 нм для SaII).

Далі, за результатами цих вимірювань була побудована "концентраційна" залежність (рис. 5). Концентраційна залежність – нормовані до одиниці залежності від pH інтенсивностей (а оскільки інтенсивність флюоресценції лінійно залежить від концентрації, то можна замінити відношення інтенсивностей на відношення концентрацій) максимумів кожної із смуг флюоресценції (для двох форм Sa).

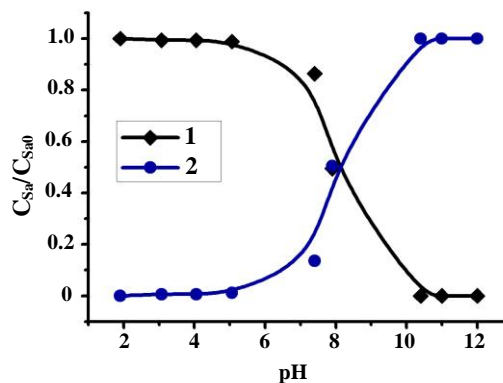


Рис. 5. "Концентраційна" залежність.

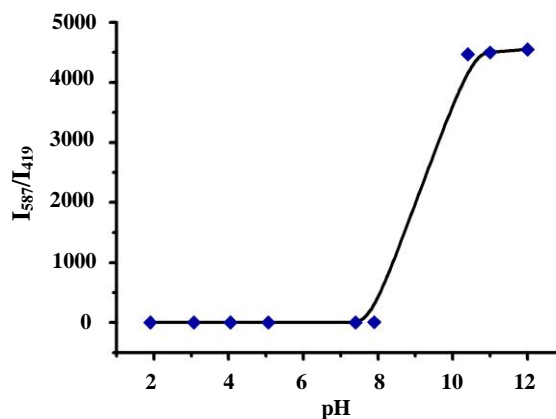


Рис. 6. Крива для визначення pH.

Також було побудовано залежність величини відносної інтенсивності флюоресценції

(відношення інтенсивності флюоресценції смуги 587 нм до інтенсивності флюоресценції смуги 419 нм) від рН (рис. 6).

"Концентраційна" залежність необхідна для визначення концентрації кожної з форм сангвінаріну у розчині при відомому рН, якщо відома загальна концентрація алкалоїду. В свою чергу, рН визначалось зі спектрів флюоресценції за допомогою залежності відносної інтенсивності від рН середовища (знаючи відношення інтенсивностей смуг флюоресценції сангвінаріну розчину із $P/D=0$).

4.3. *Зміни у спектрах флюоресценції сангвінаріну у присутності молекул ДНК.* У наших експериментах рН був близько 7.6, отже, обидві форми були присутні. Спектр флюоресценції складається з двох смуг з максимумами на 587 нм (SaI) та 419 нм (SaII), (рис. 7), яким відповідають різні спектри збудження.

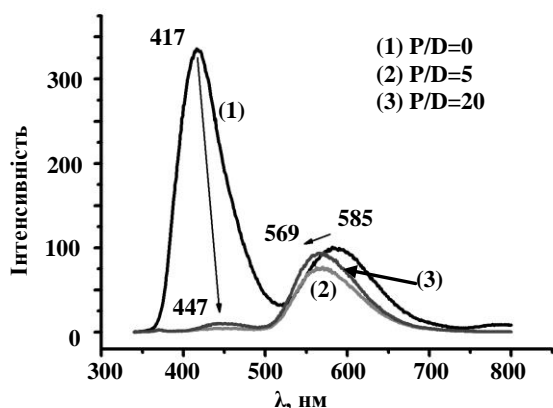


Рис. 7. Спектри флюоресценції сангвінаріну при різних P/D .

З додаванням ДНК у спектрах флюоресценції сангвінаріну спостерігається зміна інтенсивності флюоресценції і зсув максимуму смуги (блакитний ~ 20 нм для SaI і червоний ~ 30 нм для SaII). Зміна інтенсивності флюоресценції (та оптичної густини) для сангвінаріну від співвідношення P/D – нетипова. А саме – відповідні криві мають мінімум (рис. 8), і така поведінка спостерігається для обох форм. Така ж залежність була отримана у роботі [5] без пояснення.

Цю нетипову зміну оптичного параметру ліганду можна пояснити як прояв двох типів зв'язування сангвінаріну та ДНК: зовнішнього та інтеркаляції. Мінімум у залежностях відповідає найбільш компактному розміщенню молекул сангвінаріну на матриці ДНК, що призводить до гіпохромізму у смугах поглинання та гасіння

флюоресценції. При малих значеннях P/D найбільш ймовірним механізмом зв'язування є механізм зовнішнього стекінгу. Коли концентрація ДНК зростає – зростає також і кількість місць зв'язування, тому найбільш ймовірним стає інтеркаляційний тип зв'язування.

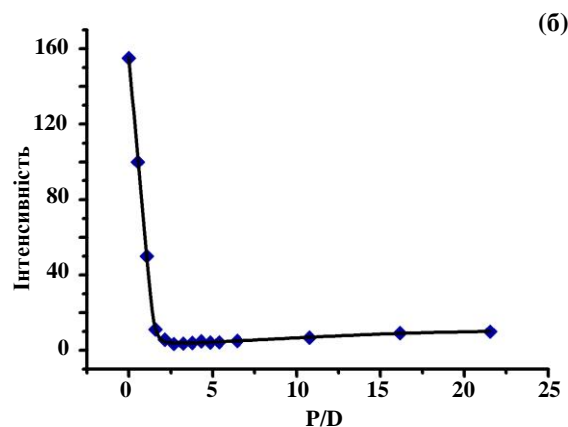
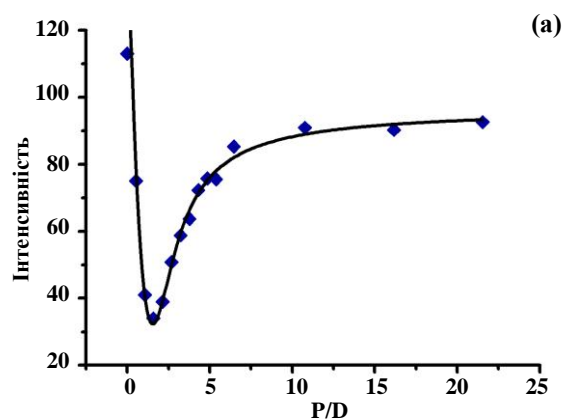


Рис. 8. Криві зв'язування для імінної SaI (а) та алканоламінної SaII (б) форм.

Оскільки у розчині одночасно присутніми є дві форми сангвінаріну, то для обрахунку параметрів зв'язування необхідно визначити концентрації SaI та SaII виходячи із значення загальної концентрації сангвінаріну у розчині (23.75 мкМ). Визначені концентрації сангвінаріну становлять 16.38 (SaI) і 7.37 (SaII) мкМ.

Оскільки залежності інтенсивності флюоресценції від концентрації ДНК у розчинах Sa+ДНК є нетривіальними, то застосовувати рівняння МакГі–фон Хіппеля безпосередньо не можна. Експериментальні дані найкраще описуються системою (6), яка враховує два незалежні процеси зв'язування ліганду, а саме зовнішнє зв'язування з фосфатами та інтеркаляція в подвійну спіраль ДНК.

Обчислені параметри зв'язування для SaI і SaII представлено у табл. 1.

Таблиця 1

	SaI (імінна)	SaII (алканоламінна)
K_1	$(2.5 \pm 0.4) 10^6 \text{ M}^{-1}$	$(1.8 \pm 0.4) 10^6 \text{ M}^{-1}$
K_2	$(26.7 \pm 5.7) 10^6 \text{ M}^{-1}$	$(4.5 \pm 0.7) 10^6 \text{ M}^{-1}$
n	2.3 ± 0.1	14.1 ± 0.3

У [11] представлено значення константи зв'язування (*caly thymus* ДНК) для імінної форми сангвінаріну, отримане з використанням рівняння МакГі-фон Хіппеля для некооперативного зв'язування: $K = 0.94 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, $n = 1.7$. У [9] константи визначено за допомогою рівняння Скетчарда: $K = 1.5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (у буфері рН=5.2) та $K_2 = 7.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (у буфері рН=10.4). У цих експериментах крива зв'язування сангвінаріну була стандартна (без мінімуму).

5. Висновки

Отже, на основі модифікованих рівнянь Скетчарда та МакГі-фон Хіппеля було визначено параметри зв'язування сангвінаріну з ДНК.

За результатами отриманих спектрів флюоресценції водних розчинів сангвінаріну при різних значеннях рН побудовано "концентраційну" залежність та залежність відносної інтенсивності фотолюмінесценції кожної з форм сангвінаріну від рН, що дозволило визначати концентрації обох форм сангвінаріну в розчині.

Отримано спектри флюоресценції розчинів Sa+ДНК при різних значеннях Р/D. При цьому зміна інтенсивності ФЛ в залежності від Р/D описується не типовою залежністю - криві

проходять через мінімум, і така поведінка спостерігається для обох форм сангвінаріну.

Встановлено, що для обох форм сангвінаріну характерними способами зв'язування з ДНК є як інтеркаляція (при $P/D \geq 6$) так і, при малих $P/D (\leq 2)$, зовнішнє зв'язування. При цьому, алканоламінна форма зв'язується з ДНК суттєво слабше ніж імінна; це впливає також з аналізу спектрів поляризованої флюоресценції.

З використанням спеціальної програми за результатами аналізу спектрів флюоресценції визначено параметри зв'язування: константи зв'язування K_1 , K_2 для зовнішнього зв'язування та інтеркаляції, відповідно, та n – кількість місць зв'язування, які займає ліганд при фіксації на матриці ДНК.

На підставі цієї та інших наших робіт [4,16] можна зробити досить загальний висновок щодо впливу форми молекули ліганду на криву зв'язування, а отже і на механізми зв'язування, які можуть реалізуватися: якщо молекула ліганду пласка, вона інтеркалює в подвійну спіраль ДНК "більш повно"; це означає, що можуть реалізуватись обидва механізми зв'язування – зовнішнє та інтеркаляція. Якщо ж частина ліганду не лежить в основній площині молекули, то ця частина розміщується в малій борозенці, тим самим виключаючи зовнішні місця зв'язування при малих Р/D. Ми спостерігали зовнішнє зв'язування і інтеркаляцію для пласких молекул сангвінаріну і акридину оранжевого та лише інтеркаляцію для частково пласких молекул берберину та етидію броміду.

Список використаних джерел

1. Орехов А. П. Химия алкалоидов. / А. П. Орехов.– Москва: Изд. АН СССР, 1955.–863 с.
2. Jang B.-C. Sanguinarine induced apoptosis in A549 human lung cancer cells primarily via cellular glutathione depletion / B.-C. Jang, J.-G. Park, D.-K. Song, W.-K. Baek, S. K. Yoo, K.-H. Jung, G.-Y. Parke, T.-Y. Lee, S.-I. Suh // *Toxicology in Vitro*. – 2009.– **23**.– P.281-287.
3. Maiti M. Molecular aspects on the interaction of protoberberine, benzophenanthridine, and aristolochia group of alkaloids with nucleic acid structures and biological perspectives / M. Maiti, G. S. Kumar// *Medicinal research reviews* – 2007. – **27**. – P.649-695.
4. Gumeniuk V. Binding Parameters of Alkaloids Berberine and Sanguinarine with DNA / V.Gumeniuk, N. Bashmakova, S. Kutovyuy, V. Yashchuk, L. Zaika // *Ukr. J. Phys.* – 2011. – **56**. – P.524-533.
5. Urbanova J. Fluorescence properties of selected benzo[c]phenanthridine alkaloids and studies of their interaction with CT DNA / J. Urbanova, P. Lubal, I. Slaninova, E. Taborska, P. Taborsky // *Anal. Bioanal. Chem.*–2009.– **394**. – P.997-1002.
6. Smekal E. Interaction of benzophenanthridine alkaloid sanguinarine with DNA / E. Smekal, N. Kubova, V. Kleinwachter // *Stud. Biophys.* – 1984. – **114**. – P. 125-132.
7. Maiti M. Circular dichroism of sanguinarine DNA complex: Effect of base composition pH and ionic strength / M. Maiti, R. Nandi // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 1987. – **5**. – P.159-175.
8. Sen A. Thermodynamics of the interactions of sanguinarine with DNA: Influence of ionic strength and base composition / A. Sen, A. Ray, M. Maiti // *Biophys.Chem.*–199.–**59**.– P.155-170.

9. Maiti M. Influence of DNA structures on the conversion of sanguinarine alkanolamine form to iminium form / M. Maiti, S. Das, A. Sen, A. Das, G. S. Kumar, R. Nandi // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2002. – **20**. – P.455-464.
10. Grycova L. Quaternary protoberberine alkaloids / L. Grycova, J. Dostal, R. Marek // *Phytochemistry*. – 2007. – **68**. – P.150-175.
11. Maiti M., Kumar, G.S., Polymorphic Nucleic Acid Binding of Bioactive Isoquinoline Alkaloids and Their Role in Cancer / M. Maiti, G. S. Kumar // *J. Nucl. Acids*, –2010;v.2010, Article ID 593408, 23 p. <http://dx.doi.org/10.4061/2010/593408>.
12. Pilch D. S. Minor groove-directed and intercalative ligand-DNA interactions in the poisoning of human DNA topoisomerase I by protoberberine analogs / D. S. Pilch, C. Yu, D. Makhey, E. J. LaVoie, A. R. Srinivasan, W. K. Olson, R. R. Sauers, K. J. Breslauer, N. E. Geacintov and L. F. Liu // *Biochemistry* – 1997. – **36**. – P.12542- 12553.
13. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions / G. Scatchard // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1949. – **51**. – P.660-672.
14. McGhee J.D. Theoretical aspects of DNA-Protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice / J. D. McGhee, P. H von Hippel // *J. Mol. Biol.* – 1974. – **86**. – P.469-489.
15. Лакович Дж.Р. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Р. Лакович. – Москва: Мир, 1986. – 496 с.
16. Кутувий С. Ю. Особливості зв'язування бромистого етидію та акридинового оранжевого з ДНК / С. Ю. Кутувий, Т. П. Сич, Л. А. Заїка // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, сер. фіз.-мат. науки* – 2014. – №3, цей випуск.
- of Alkaloids Berberine and Sanguinarine with DNA. *Ukr. J. Phys.* 56. p.524-533.
5. URBANOVA, J., LUBAL, P., SLANINOVA, I. et al. (2009) Fluorescence properties of selected benzo[c]phenanthridine alkaloids and studies of their interaction with CT DNA. *Anal. Bioanal. Chem.* 394. p.997-1002.
6. SMEKAL, E., KUBOVA, N., and KLEINWACHTER, V. (1984) Interaction of benzophenanthridine alkaloid sanguinarine with DNA. *Stud. Biophys.* 114. p. 125-132.
7. MAITI, M., NANDI, R. (1987) Circular dichroism of sanguinarine DNA complex: Effect of base composition pH and ionic strength. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 5. p.159-175.
8. SEN, A., RAY, A. and MAITI, M. (1999) Thermodynamics of the interactions of sanguinarine with DNA: Influence of ionic strength and base composition. *Biophys. Chem.* 59. p.155-170.
9. MAITI, M., DAS, S., SEN, A. et al. (2002) Influence of DNA structures on the conversion of sanguinarine alkanolamine form to iminium form. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 20. p.455-464.
10. GRYCOVA, L., DOSTAL, J., MAREK, R. (2007) Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*. 68(2), p.150-175.
11. MAITI, M. and KUMAR, G. (2010) Polymorphic Nucleic Acid Binding of Bioactive Isoquinoline Alkaloids and Their Role in Cancer. *J. Nucl. Acids* [Online] – v.2010, ID 593408, 23p. Available:<http://dx.doi.org/10.4061/2010/593408>.
12. PILCH, D.S., YU, C., MAKHEY, D. et al. (1997) Minor groove-directed and intercalative ligand-DNA interactions in the poisoning of human DNA topoisomerase I by protoberberine analogs. *Biochemistry*. 36. p.12542-12553.
13. SCATCHARD, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51. p.660-672.
14. MCGHEE, J. and VON HIPPEL, P. (1974) 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. p.469-489.
15. LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. – New York-London: Plenum Press, 1983.
16. KUTOVYY, S., SYCH, T. and ZAIKA, L. (2014) Peculiarities of ethidium bromide and acridine orange binding to DNA. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Series Physics and Mathematics*, No3, this issue.

References

1. OREKHOV, A. P. (1955) *Khimiya alkaloidov*. Moscow: Izdatyestvo akadyemii nauk SSSR.
2. JANG, B.-C., PARK, J.-G., SONG, D.-K. et al. (2009) Sanguinarine induced apoptosis in A549 human lung cancer cells primarily via cellular glutathione depletion. *Toxicology in Vitro*. 23. p.281-287.
3. MAITI, M. and KUMAR, G. (2007) Molecular aspects on the interaction of protoberberine, benzophenanthridine, and aristolochia group of alkaloids with nucleic acid structures and biological perspectives. *Medicinal research reviews*. 27. p.649-695.
4. GUMENIUK, V., BASHMAKOVA, N., KUTOVYY, S. et al. (2011) Binding Parameters

Надійшла до редколегії 22.05.2014