

КОНКУРЕНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ХЛОРОФИЛЛИНА НА СВЯЗЫВАНИЕ ЛИГАНДОВ С ДНК

А. А. Скуратовская^{1*}, Е. Г. Березняк¹, Н. А. Гладковская¹,
Е. В. Духопельников^{1,2}, А. С. Хребтова¹

УДК 547.979.731

¹ Институт радиофизики и электроники им. О. Я. Усикова НАН Украины,
61085, Харьков, Украина; e-mail: anastasiia.skuratovska@gmail.com

² Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина,
61022, Харьков, Украина

(Поступила 10 декабря 2020)

Методом спектрофотометрии изучено влияние хлорофиллина на связывание профлавина, доксорубина, бромистого этидия и берберина с ДНК. Для анализа данных титрования использован метод разрешения многомерных кривых с помощью чередующихся наименьших квадратов (MCR-ALS). Получены спектры всех поглощающих частиц в исследуемых системах и их вклады в общий экспериментальный спектр. Показано, что хлорофиллин образует комплексы со всеми рассмотренными лигандами. Получены равновесные параметры комплексообразования лигандов с хлорофиллином и с ДНК в двойных (лиганд—хлорофиллин и лиганд—ДНК) и тройных (лиганд—хлорофиллин—ДНК) системах. Обнаружено, что в присутствии хлорофиллина количество связанного с ДНК лиганда уменьшается. Поскольку рассчитанные константы взаимодействия лиганда с ДНК и с хлорофиллином близки, основной причиной данного эффекта является гетероассоциация. Для проверки существования других механизмов конкурентного действия хлорофиллина проведено сравнение теоретических изотерм связывания лигандов с ДНК в тройных системах с соответствующими изотермами, полученными непосредственно из данных разложения. Показано, что для описания экспериментальных изотерм достаточно учесть только гетероассоциацию лигандов с хлорофиллином (интерцепторный механизм). Протекторных свойств хлорофиллин в изученных тройных системах не проявляет, следовательно, хлорофиллин не взаимодействует с ДНК.

Ключевые слова: хлорофиллин, ДНК, конкурентное связывание, интерцепторный механизм, протекторный механизм, лиганд.

Herein, the chlorophyllin effect on the binding of proflavine, doxorubicin, ethidium bromide, and berberine to the DNA was studied by the spectrophotometry technique. For the titration data analysis, the multivariate curve resolution-alternating least squares method (MCR-ALS) was used. The pure spectra of all the absorbing particles in the systems and their concentration profiles were obtained. It was shown that chlorophyllin forms complexes with all the studied ligands. The equilibrium parameters of the ligand interactions with chlorophyllin and the DNA in the binary (ligand-chlorophyllin and ligand-DNA) and ternary (ligand-chlorophyllin-DNA) systems were obtained. It was found that in the presence of chlorophyllin, the number of ligand molecules bound to the DNA decreases. The main reason for this effect is heteroassociation since the calculated values of the constants for the interactions of the ligand with the DNA and chlorophyllin are similar. A comparison of the theoretical isotherms of ligands binding to the DNA in the ternary systems with ones obtained directly from the decomposition data was performed to test the presence of other mechanisms of the chlorophyllin competitive action. It is shown that taking into account only the heteroassociation of ligands is enough when describing the experimental isotherms. The protector action of chlorophyllin is not realized in the studied ternary systems; consequently, chlorophyllin does not interact with the DNA.

Keywords: chlorophyllin, DNA, competitive binding, interceptor mechanism, protective mechanism, ligand.

THE CHLOROPHYLLIN COMPETITIVE EFFECT ON LIGANDS BINDING TO DNA

A. A. Skuratovska^{1*}, E. G. Bereznjak¹, N. A. Gladkovskaya¹, E. V. Dukhopelnykov^{1,2}, A. S. Khrebtova¹
(¹ O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 61085, Ukraine; e-mail: anastasiia.skuratovska@gmail.com; ² V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 61022, Ukraine)

Введение. Хлорофиллы — порфириновые вещества, широко распространенные в природе. Как природные хлорофиллы, так и многие их производные обладают антиоксидантными, антиканцерогенными, антимуtagenными свойствами и широко используются в медицине [1, 2]. В частности, они являются перспективными фотосенсибилизаторами и могут применяться для фотодинамической терапии раковых заболеваний [3, 4]. Хлорофиллы применяются также для снижения токсического действия ДНК-связывающихся лекарственных препаратов и мутагенов [5].

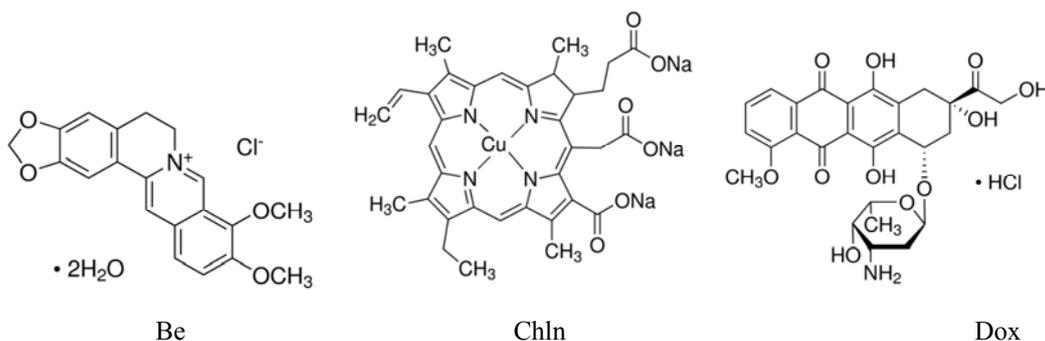
Наиболее используемым производным хлорофилла является хлорофиллин (Chln). Основные преимущества Chln для медицинского применения — водорастворимость и высокая стабильность его молекул [5]. Антимуtagenное действие Chln реализуется в основном благодаря его конкурентным свойствам, т. е. в присутствии Chln уменьшается концентрация мутагена, связанного с ДНК. Одним из механизмов конкурентного действия Chln является интерцепция. За счет стэкингных (π - π) взаимодействий между порфириновым кольцом Chln и планарной молекулой ароматического мутагена образуются гетерокомплексы, которые не взаимодействуют с ДНК [6—9]. Известно, что Chln формирует стабильные комплексы с акридиновыми и антрациклиновыми препаратами [10—12], гетероциклическими аминами [13, 14], афлатоксинами [15] и другими веществами [9].

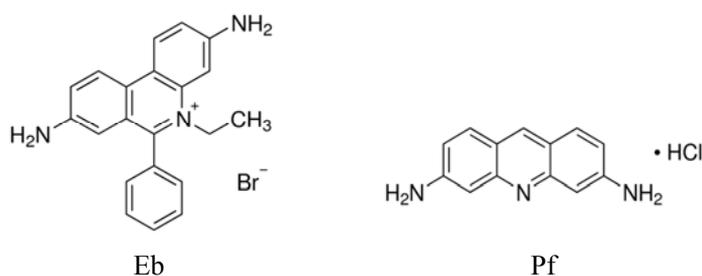
В системах лиганд—конкурент—ДНК также может проявляться протекторный механизм. Взаимодействие конкурента с ДНК снижает количество мест связывания на полимерной матрице, доступных для лиганда [16]. Однако возможность образования комплексов между Chln и ДНК является предметом дискуссии. Методом ИК-спектроскопии обнаружено комплексообразование Chln с ДНК с константой связывания $\sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ [17]. Однако, согласно спектрофотометрическим данным, Chln практически не образует комплексов с ДНК [10]. Исследования [18] также не показали изменений в спектрах Chln при добавлении ДНК. Тем не менее в некоторых случаях комплексообразование не сопровождается значительными изменениями спектров поглощения [19, 20]. Следовательно, для анализа процессов в тройной системе лиганд—Chln—ДНК необходима модель, которая учитывает все теоретически возможные взаимодействия, включая те, которые не проявляются спектрально.

Для исследования конкурентных свойств Chln можно использовать метод спектрофотометрического титрования. На основании данных титрования рассчитываются константы связывания лиганда с ДНК в присутствии и в отсутствие Chln, а также параметры гетероассоциации лиганда с Chln. Однако спектры Chln и лигандов часто существенно перекрываются, что усложняет анализ экспериментальных спектров, определение концентраций поглощающих частиц и расчет параметров связывания. Для решения таких проблем целесообразно использовать хемометрические методы. Этот подход позволяет выделять спектры и определять концентрации отдельных поглощающих частиц, что повышает точность расчетов [21]. В некоторых работах [22—24] хемометрические методы использованы для анализа связывания лигандов с ДНК в двойных системах. Однако такой подход не применялся для исследования взаимодействий в многокомпонентных ДНК-содержащих системах.

В настоящей работе с помощью хемометрического метода MCR-ALS [25] проанализированы данные спектрофотометрического титрования в тройной системе лиганд—Chln—ДНК. В качестве лигандов использованы акридиновый краситель профлавин, антрациклиновый препарат доксорубин, фенантридиновый лиганд бромистый этидий и изохолиновый алкалоид берберин. На основании полученных результатов сделаны выводы о механизме антимуtagenного действия Chln.

Материалы и методы. Коммерческая ДНК из молок лосося (Serva), хлорофиллин (Chln) (Sigma), профлавин (Pf) (Sigma), берберин (Be) (Alps Pharmaceutical), доксорубин (Dox) (Medac GmbH) и бромистый этидий (Eb) (Fluka) использованы без дополнительной очистки:





Измерения проводились в видимой области спектра на спектрофотометре Specord M40 (Германия) при $T=296$ К. Исходные растворы веществ готовились в фосфатном буфере ($2.5 \cdot 10^{-3}$ М KH_2PO_4 , $2.5 \cdot 10^{-3}$ М Na_2HPO_4 , pH 6.86) с ионной силой $I=0.025$ М. Концентрации растворов определялись с использованием молярных коэффициентов поглощения $\epsilon_{260} = 6.4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (в молях фосфатов) для ДНК [26], $\epsilon_{402} = 3.34 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для Chln [10], $\epsilon_{445} = 4.1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для Pf [27], $\epsilon_{344} = 2.25 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для Ве [28], $\epsilon_{480} = 1.15 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для Dox [29], $\epsilon_{480} = 5.68 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для Eb [30]. Погрешность измерения оптической плотности 0.005 опт. ед.

Эксперименты по титрованию проведены для систем лиганд—Chln, лиганд—ДНК и лиганд—Chln—ДНК. Полученные для каждого лиганда наборы данных анализировались с помощью алгоритма MCR-ALS (разрешение многомерных кривых с помощью чередующихся наименьших квадратов), реализованного в программе “The Unscrambler” [25]. При корректной декомпозиции должен быть получен набор данных, содержащий спектры свободных лиганда и Chln, которые совпадают с экспериментальными спектрами этих веществ по форме и положению максимума поглощения. Остальные спектры соответствуют поглощению комплексов, образованных между компонентами системы. Также в результате декомпозиции рассчитываются относительные вклады (x_i) всех индивидуальных спектров в общее поглощение системы. Спектры частиц, отсутствующих в двойных системах, имеют нулевые относительные вклады в поглощение этих систем.

Концентрации каждой частицы в системе при различных соотношениях общих концентраций реагентов рассчитаны с использованием соответствующих значений x_i и законов сохранения общих концентраций:

для системы лиганд—ДНК

$$C_L = C_{L,\text{free}} + C_{L-\text{DNA}} = (x_{L,\text{free}} + x_{L-\text{DNA}})C_L, \quad (1)$$

для системы лиганд—Chln

$$C_L = C_{L,\text{free}} + C_{L-\text{Chln}} = (x_{L,\text{free}} + x_{L-\text{Chln}})C_L, \quad (2)$$

$$C_{\text{Chln}} = C_{\text{Chln},\text{free}} + n_h C_{L-\text{Chln}} = (x_{\text{Chln},\text{free}} + n_h x_{L-\text{Chln}})C_{\text{Chln}}, \quad (3)$$

для системы лиганд—Chln—ДНК

$$C_L = C_{L,\text{free}} + C_{L-\text{DNA}} + C_{L-\text{Chln}} = (x_{L,\text{free}} + x_{L-\text{DNA}} + x_{L-\text{Chln}})C_L, \quad (4)$$

$$C_{\text{Chln}} = C_{\text{Chln},\text{free}} + n_h C_{L-\text{Chln}} + C_{\text{Chln}-\text{DNA}} = (x_{L,\text{Chln}} + n_h x_{L-\text{Chln}} + x_{\text{Chln}-\text{DNA}})C_{\text{Chln}}, \quad (5)$$

где C_L и C_{Chln} — общие концентрации лиганда и Chln; $C_{L,\text{free}}$ и $C_{\text{Chln},\text{free}}$ — концентрации свободного лиганда и Chln; $C_{\text{Chln}-\text{DNA}}$ — концентрация Chln в составе комплексов с ДНК; $C_{L-\text{DNA}}$ и $C_{L-\text{Chln}}$ — концентрации лиганда, связанного с ДНК и Chln; n_h — усредненное количество молекул хлорофиллина, связанных с одной молекулой лиганда.

Следует отметить, что спектральных изменений в системе Chln—ДНК при титровании не наблюдается. Даже в случае взаимодействия Chln с ДНК спектр комплекса не отличается от спектра свободного Chln. Таким образом, относительный вклад $x_{\text{Chln}-\text{DNA}}$ и концентрация комплекса $C_{\text{Chln}-\text{DNA}}$ в (5) считались равными нулю.

Рассчитаны отношения концентрации связанного лиганда к общим концентрациям ДНК (r) и Chln (r_h):

$$r = C_{L-\text{DNA}}/C_{\text{DNA}}, \quad (6)$$

$$r_h = C_{L-\text{Chln}}/C_{\text{Chln}}, \quad (7)$$

где C_{DNA} — общая концентрация ДНК.

Расчетные данные использовались для построения экспериментальных изотерм связывания в координатах Скэтчарда. Для определения равновесных параметров связывания лиганда с Chln и

с ДНК в двойных системах полученные зависимости аппроксимированы уравнениями Скэтчарда (8) и МакГи (9) [31, 32]:

$$r_h / C_{L,\text{free}} = K_h (1 - n_h r_h), \quad (8)$$

$$r / C_{L,\text{free}} = K_{\text{bound,DNA}} (1 - nr) \left(\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right)^{n-1}, \quad (9)$$

где K_h — константа гетероассоциации лиганда с Chln; $K_{\text{bound,DNA}}$ — константа связывания лиганда с ДНК; n — количество нуклеотидов ДНК, занимаемых одной молекулой лиганда.

Для описания экспериментальных изотерм в тройных системах уравнение (9) модифицировано:

$$r / (C_{L,\text{free}} + C_{L-\text{Chln}}) = K_{\text{eff}} (1 - n_{\text{eff}} r) \left(\frac{1 - n_{\text{eff}} r}{1 - (n_{\text{eff}} - 1)r} \right)^{n_{\text{eff}} - 1}, \quad (10)$$

где K_{eff} — эффективная константа связывания лиганда с ДНК в присутствии Chln; n_{eff} — эффективный размер места связывания лиганда с ДНК.

Для тройных систем определяли и впоследствии использовали не общую концентрацию свободного лиганда $C_{L,\text{free}}$, а концентрацию лиганда, не связанного с ДНК ($C_{L,\text{free}} + C_{L-\text{Chln}}$). Сравнение эффективных констант связывания (K_{eff}) с соответствующими равновесными значениями ($K_{\text{bound,DNA}}$), полученными для систем лиганд—ДНК, позволяет оценить влияние конкурента на взаимодействие лиганда с ДНК.

Результаты и их обсуждение. Для изучения влияния Chln на связывание лигандов с ДНК получены спектрофотометрические кривые титрования в системах лиганд—Chln, лиганд—ДНК и лиганд—Chln—ДНК. При апробации метода MCR-ALS проведена декомпозиция результатов титрования для каждой системы в отдельности. При анализе спектров систем лиганд—Chln—ДНК и лиганд—Chln, в которых содержится три и более поглощающих частиц с перекрывающимися спектрами, стабильные и корректные результаты удалось получить только при совместном разложении данных для систем лиганд—Chln—ДНК, лиганд—ДНК и лиганд—Chln. Таким образом, метод MCR-ALS может использоваться для обработки данных титрования в системах лиганд—конкурент—ДНК, но требует наличия большого массива экспериментальных данных для систем различной сложности с общими составляющими.

На рис. 1 показаны спектры, полученные при совместном разложении полного набора экспериментальных данных для каждого исследуемого лиганда. Для идентификации спектров и расчета параметров связывания между компонентами системы рассмотрим отдельно каждую из подсистем.

Системы лиганд—ДНК. На рис. 2 представлены спектры поглощения систем лиганд—ДНК при фиксированной концентрации лиганда и различных концентрациях ДНК. Увеличение концентрации ДНК приводит к длинноволновому сдвигу спектров лигандов и появлению изобестических точек, что свидетельствует об образовании комплексов лиганд—ДНК.

В экспериментальные спектры систем лиганд—ДНК вносят отличные от нуля вклады спектры только двух поглощающих частиц. Один из них соответствует поглощению свободного лиганда (рис. 1, кривая 1). Второй спектр можно отнести к поглощению лиганда в составе комплекса с ДНК ($\lambda_{\text{max, Pf-DNA}} = 462$ нм, $\lambda_{\text{max, Be-DNA}} = 352$ нм, $\lambda_{\text{max, Dox-DNA}} = 509$ нм, $\lambda_{\text{max, Eb-DNA}} = 523$ нм).

Из результатов разложения получены концентрации свободного и связанного лиганда при различных соотношениях общих концентраций ДНК и лиганда (P/D). Оптимальные параметры связывания лиганда с ДНК определялись путем аппроксимации зависимостей $r/C_{L,\text{free}}$ от r по уравнению (9). Рассчитанные значения представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Параметры взаимодействия лигандов с хлорофиллином и с ДНК в двойных системах и эффективные константы связывания лигандов с ДНК в тройных системах

Лиганд	Лиганд—ДНК		Лиганд—Chln		Лиганд—Chln—ДНК
	$K_{\text{bound,DNA}}, \text{M}^{-1}$	n	K_h, M^{-1}	n_h	$K_{\text{eff}}, \text{M}^{-1}$
Be	$(5.7 \pm 1) \cdot 10^4$	10.3 ± 0.6	$(4.7 \pm 0.4) \cdot 10^4$	0.6 ± 0.3	$(2.1 \pm 0.2) \cdot 10^4$
Dox	$(2.7 \pm 0.4) \cdot 10^5$	4.7 ± 0.3	$(5.3 \pm 0.7) \cdot 10^5$	1.03 ± 0.3	$(4.3 \pm 0.5) \cdot 10^4$
Pf	$(2.7 \pm 0.2) \cdot 10^5$	5.1 ± 0.2	$(2.9 \pm 0.3) \cdot 10^5$	0.8 ± 0.3	$(4.2 \pm 0.2) \cdot 10^4$
Eb	$(1.0 \pm 0.3) \cdot 10^6$	4.9 ± 0.2	$(4.7 \pm 0.3) \cdot 10^5$	0.8 ± 0.1	$(3.4 \pm 0.1) \cdot 10^5$

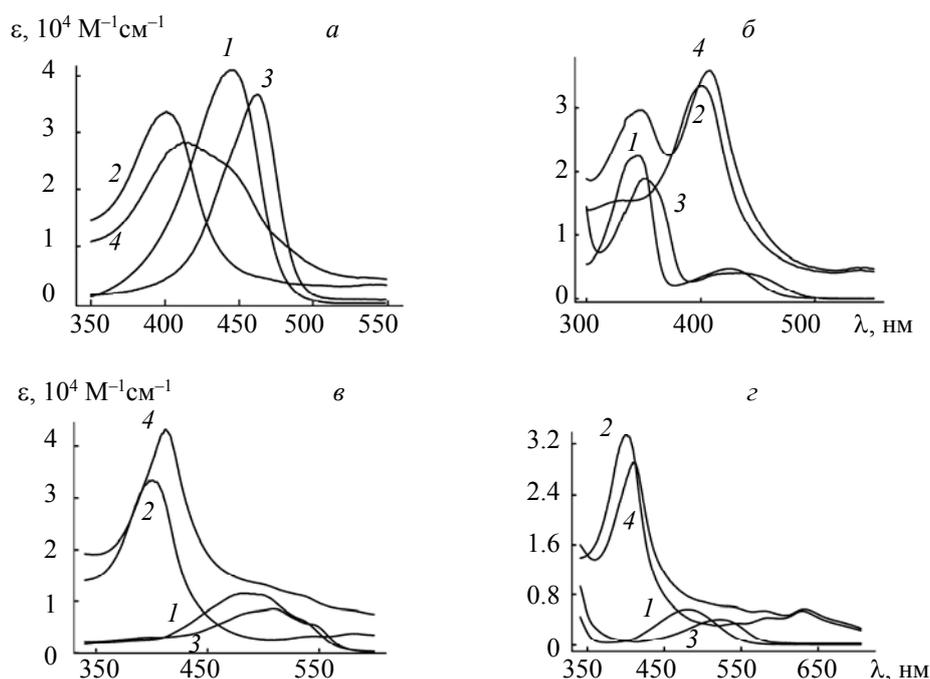


Рис. 1. Спектры, полученные при совместном разложении данных титрования в системах лиганд—Chln—ДНК, лиганд—Chln и лиганд—ДНК для лигандов: Pf (а), Be (б), Dox (в), Eb (г); 1—4 — спектры лиганда, Chln, комплексов лиганда с ДНК и с Chln соответственно; 1 — спектр свободного лиганда ($\lambda_{\max, Pf} = 445$ нм, $\lambda_{\max, Be} = 344$ нм, $\lambda_{\max, Dox} = 480$ нм, $\lambda_{\max, Eb} = 480$ нм), 2 — спектр свободного хлорофиллина ($\lambda_{\max, Chln} = 402$ нм)

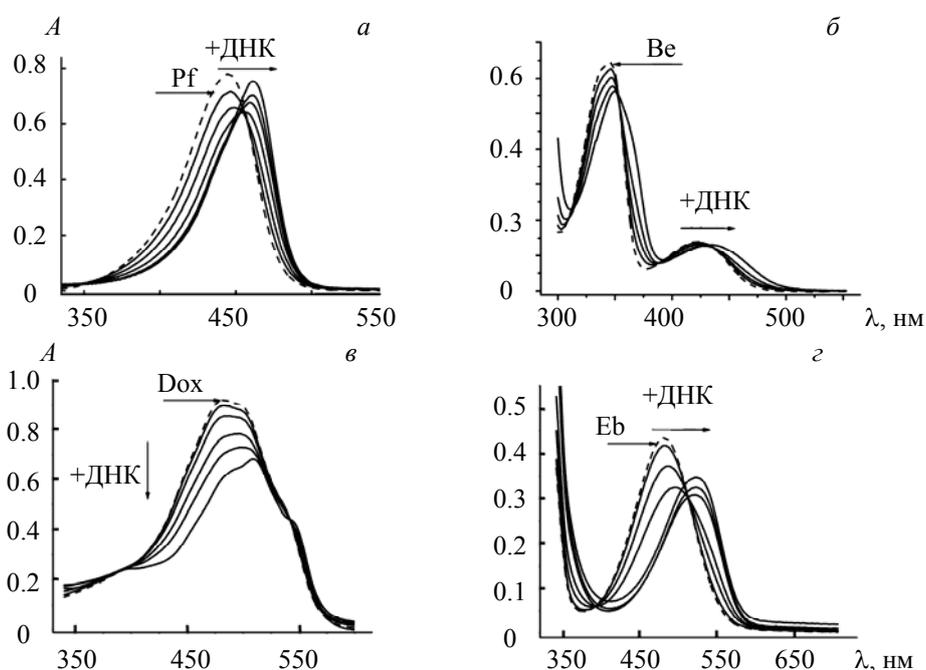


Рис. 2. Спектры поглощения систем лиганд—ДНК при постоянной концентрации лиганда и возрастающей концентрации ДНК (сплошные линии): $C_{Pf} = 1.96 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{DNA} = (0 \div 6.9) \cdot 10^{-4}$ М (а); $C_{Be} = 2.87 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{DNA} = (0 \div 8.1) \cdot 10^{-4}$ М (б); $C_{Dox} = 7.97 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{DNA} = (0 \div 1.3) \cdot 10^{-3}$ М (в); $C_{Eb} = 7.86 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{DNA} = (0 \div 2.76) \cdot 10^{-3}$ М (г); штриховая линия — спектр поглощения свободного лиганда

Системы лиганд—Chln. Для изучения процесса гетероассоциации проведены эксперименты по титрованию в системах лиганд—Chln как при постоянной концентрации хлорофиллина (прямое титрование), так и при фиксированной концентрации лиганда (обратное титрование). Результаты прямого титрования представлены на рис. 3.

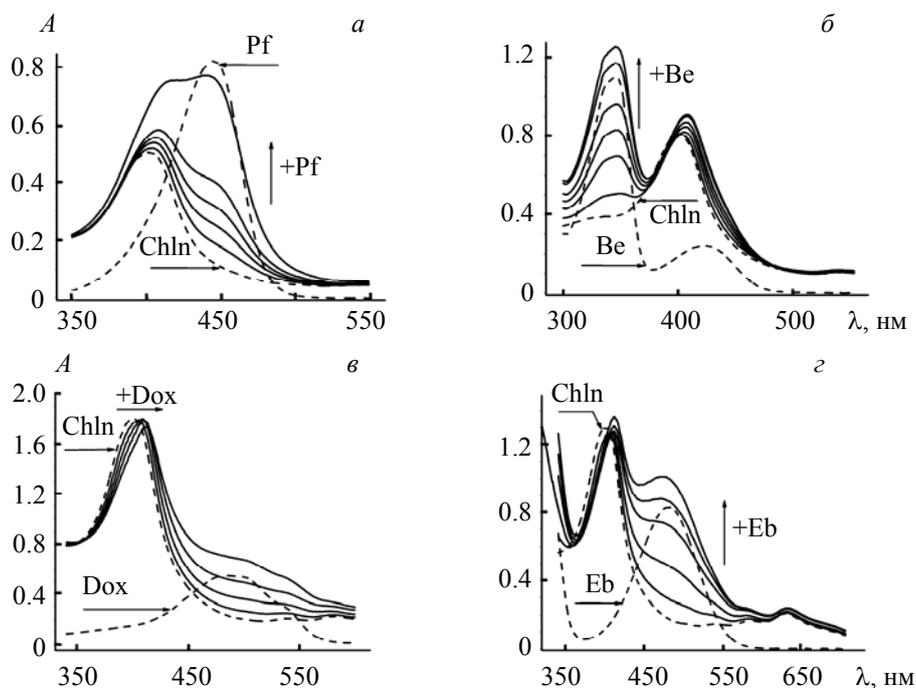


Рис. 3. Спектры поглощения систем лиганд—Chln при постоянной концентрации Chln и возрастающей концентрации лиганда (сплошные линии): $C_{\text{Chln}} = 1.51 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{\text{Pf}} = (0 \div 2.02) \cdot 10^{-5}$ M (а); $C_{\text{Chln}} = 2.42 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{\text{Be}} = (0 \div 4.88) \cdot 10^{-5}$ M (б); $C_{\text{Chln}} = 5.38 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{\text{Dox}} = (0 \div 4.74) \cdot 10^{-5}$ M (в); $C_{\text{Chln}} = 3.9 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{\text{Eb}} = (0 \div 1.46) \cdot 10^{-5}$ M (г); штриховые линии — спектры поглощения Chln и свободного лиганда

Результаты разложения показывают, что в общем поглощение систем лиганд—Chln вносят вклад свободные лиганд и Chln, а также их гетерокомплекс ($\lambda_{\text{max, Pf-Chln}} = 413$ нм, $\lambda_{\text{max, Be-Chln}} = 409$ нм, $\lambda_{\text{max, Dox-Chln}} = 413$ нм, $\lambda_{\text{max, Eb-Chln}} = 410$ нм) (рис. 1, спектры 1, 2 и 4).

Параметры связывания лигандов с Chln, полученные путем аппроксимации зависимостей $r_h/C_{L, \text{free}}$ от r_h по уравнению (8), представлены в табл. 1. Рассчитанные константы связывания для систем лиганд—ДНК и лиганд—Chln согласуются с величинами, известными для некоторых из этих систем [10, 11, 33—36].

Системы лиганд—Chln—ДНК. Спектрофотометрическое титрование в системах лиганд—Chln—ДНК проводилось при фиксированных концентрациях лиганда и конкурента и различных концентрациях ДНК (рис. 4). Согласно результатам разложения экспериментальных данных для систем лиганд—Chln—ДНК в общем поглощение системы вносят вклад все спектры, приведенные на рис. 1. Таким образом, в растворе присутствуют как свободные лиганд и Chln, так и комплексы лиганда с Chln и с ДНК.

Для каждой системы определены значения r и концентрации не связанного с ДНК лиганда ($C_{L, \text{free}} + C_{L, \text{Chln}}$). Эффективные константы связывания лигандов с ДНК (K_{eff}) рассчитаны по уравнению (10). Полученные значения K_{eff} представлены в табл. 1.

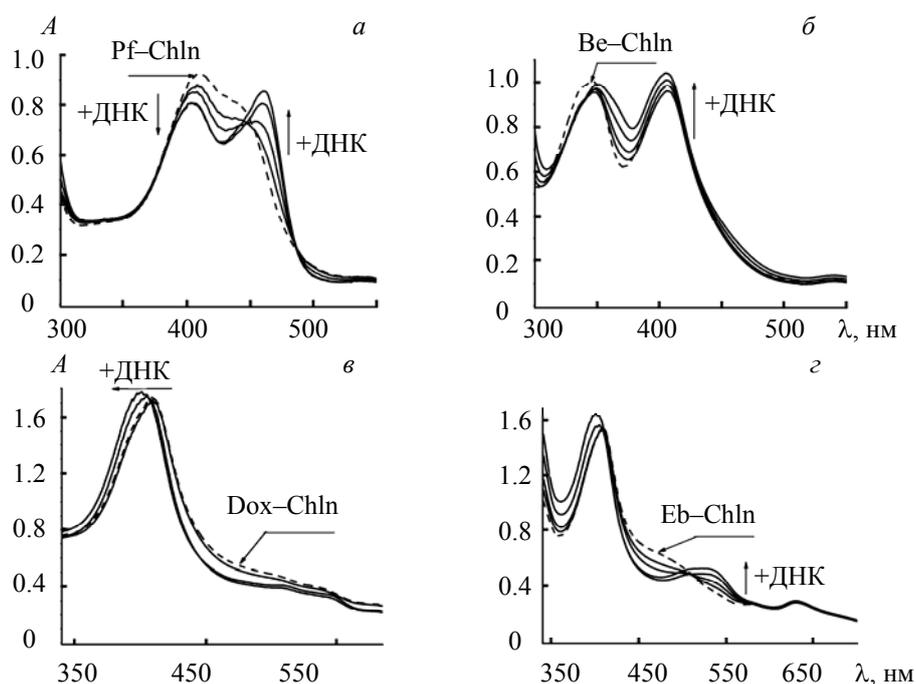


Рис. 4. Спектры поглощения систем лиганд—Chln—ДНК при постоянных концентрациях лиганда и Chln и возрастающей концентрации ДНК (сплошные линии): $C_{Pf} = 1.96 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{Chln} = 2.01 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{DNA} = (0 \div 6.9) \cdot 10^{-4}$ M (а); $C_{Be} = 2.87 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{Chln} = 2.84 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{DNA} = (0 \div 8.1) \cdot 10^{-4}$ M (б); $C_{Dox} = 2.46 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{Chln} = 4.76 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{DNA} = (0 \div 6.8) \cdot 10^{-4}$ M (в); $C_{Eb} = 7.86 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{Chln} = 4.43 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{DNA} = (0 \div 2.76) \cdot 10^{-3}$ M (г); штриховая линия — спектр поглощения системы лиганд—Chln

Влияние хлорофиллина на связывание лиганда с ДНК. Из табл. 1 видно, что эффективные константы связывания лигандов с ДНК (K_{eff}) существенно меньше соответствующих равновесных констант, полученных для двойных систем ($K_{bound,DNA}$). Это свидетельствует о том, что в присутствии хлорофиллина уменьшается концентрация связанного с ДНК лиганда. Таким образом, Chln проявляет конкурентное действие по отношению к исследуемым лигандам.

Одним из механизмов конкурентного действия Chln является гетероассоциация, поскольку константы связывания исследуемых лигандов с Chln и с ДНК (K_h и $K_{bound,DNA}$) близки. Кроме того, Chln может оказывать влияние на связывание лигандов с ДНК посредством протекторного механизма. Однако определить параметры взаимодействия хлорофиллина с ДНК непосредственно из эксперимента по титрованию в системе Chln—ДНК невозможно из-за отсутствия спектральных изменений. Поэтому для уточнения механизмов конкурентного действия Chln проведено сравнение экспериментальных и теоретических изотерм связывания в системах лиганд—ДНК и лиганд—Chln—ДНК (рис. 5). Экспериментальные изотермы получены непосредственно из разложения данных титрования. Видно, что присутствие Chln существенно изменяет форму изотерм связывания.

Для расчета теоретических изотерм в двойных системах использованы уравнение (9) и оптимальные параметры связывания лигандов с ДНК (табл. 1). Для тройных систем теоретические изотермы связывания лигандов с ДНК получены по уравнениям (4), (5), (8), (9) с использованием оптимальных значений $K_{bound,DNA}$, n , K_h , n_h (табл. 1). Эта система уравнений учитывает уменьшение концентрации лиганда, связанного с ДНК, только за счет образования гетерокомплексов, т. е. расчеты проводились без учета связывания Chln с ДНК.

Полученные теоретические и экспериментальные зависимости для всех лигандов хорошо согласуются (рис. 5). Для объяснения изменения связывания лигандов с ДНК в присутствии Chln достаточно учесть только образование гетерокомплексов. Следовательно, конкурентное действие Chln реализуется исключительно за счет интерцепторного механизма. Эти результаты подтверждают предположение, что Chln не связывается с ДНК [18].

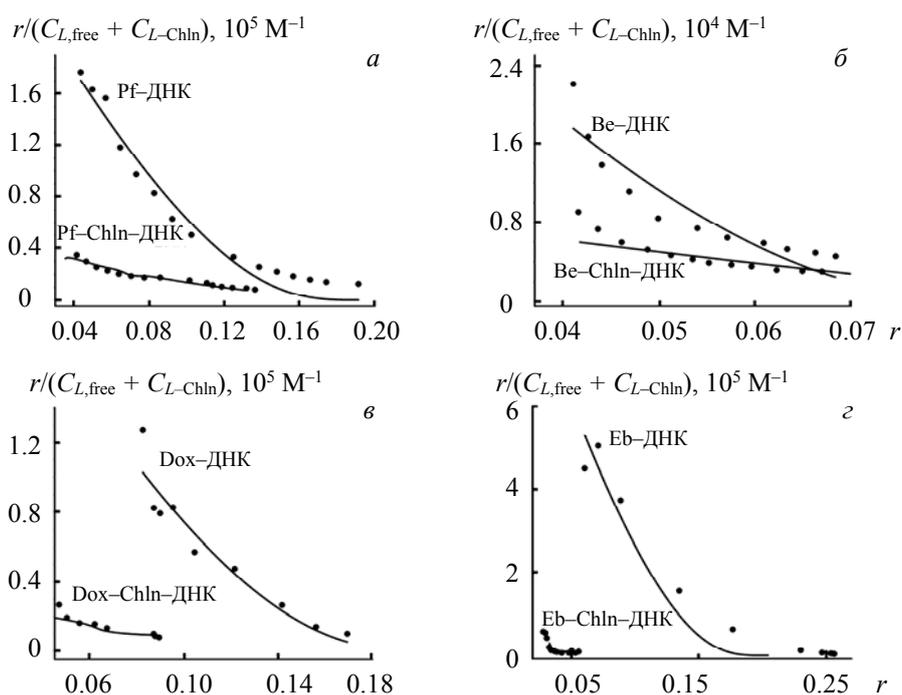


Рис. 5. Изотермы связывания лигандов с ДНК в координатах Скэтчарда в присутствии и в отсутствие Chln для Pf (а), Be (б), Dox (в), Eb (г); точки — расчет на основе разложения экспериментальных данных, сплошные линии — теоретические кривые

Заключение. Показано, что хлорофиллин оказывает влияние на взаимодействие профлафина, доксорубина, бромистого этидия и берберина с ДНК. Получены равновесные параметры связывания лигандов с хлорофиллином и с ДНК для двойных систем, а также эффективные параметры связывания лигандов с ДНК в тройных системах. Установлено, что в присутствии хлорофиллина количество связанного с ДНК лиганда в исследуемых системах существенно уменьшается. Сравнение экспериментальных и теоретических изотерм связывания показывает, что единственной причиной уменьшения количества комплексов лиганд—ДНК в тройных системах является гетероассоциация. Таким образом, конкурентное действие хлорофиллина реализуется за счет интерцепторного механизма. Протекторных свойств хлорофиллин не проявляет, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия хлорофиллина с ДНК.

Метод MCR-ALS может быть использован для обработки данных спектрофотометрического титрования в многокомпонентных системах. Однако корректная декомпозиция спектров возможна только при одновременном анализе большого набора экспериментальных данных для систем различного состава с общими компонентами.

- [1] C. Galasso, A. Gentile, I. Orefice, A. Ianora, A. Bruno, D. M. Noonan, C. Sansone, A. Albini, C. Brunet. *Nutrients*, **11**, N 6 (2019) 1226
- [2] E. Wang, M. S. Braun, M. Wink. *Molecules*, **24**, N 16 (2019) 2968
- [3] D. K. Deda, B. A. Iglesias, E. Alves, K. Araki, C. R. S. Garcia. *Molecules*, **25**, N 9 (2020) 2080
- [4] Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. *Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*, Eds. B. Grimm, R. J. Porra, W. Rüdiger, H. Scheer, Dordrecht, Springer (2006) 603
- [5] K. Solymosi, B. Mysliwa-Kurziel. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **17**, N 13 (2017) 1194—1222
- [6] S. Arimoto-Kobayashi, N. Harada, R. Tokunaga, J. Odo, H. Hayatsu. *Mutat. Res.*, **381**, N 2 (1997) 243—249
- [7] H. Hayatsu, C. Sugiyama, S. Arimoto-Kobayashi, T. Negishi. *Cancer Lett.*, **143**, N 2 (1999) 185—187
- [8] S. Arimoto, S. Fukuoka, C. Itome, H. Nakano, H. Rai, H. Hayatsu. *Mutat. Res.*, **287**, N 2 (1993) 93—305

- [9] **S. Nagini, F. Palitti, A. T. Natarajan.** *Nutr. Cancer*, **67**, N 2 (2015) 203—211
- [10] **M. Pietrzak, Z. Wieczorek, J. Wieczorek, Z. Darzynkiewicz.** *Biophys. Chem.*, **123** (2006) 11—19
- [11] **M. Pietrzak, Z. Wieczorek, A. Stachelska, Z. Darzynkiewicz.** *Biophys. Chem.*, **104**, N 1 (2003) 305—313
- [12] **M. Pietrzak, H. D. Halicka, Z. Wieczorek, J. Wieczorek, Z. Darzynkiewicz.** *Biophys. Chem.*, **135**, (2008) 69—75
- [13] **J. Hernaez, M. Xu, R. Dashwood.** *Environ. Mol. Mutagen.*, **30**, N 4 (1997) 468—474
- [14] **C. E. Schwab, W. W. Huber, W. Parzefall, G. Hietsch, F. Kassie, R. Schulte-Hermann, S. Knasmüller.** *Crit. Rev. Toxicol.*, **30**, N 1 (2000) 1—69
- [15] **P. A. Egner, A. Munoz, T. W. Kensler.** *Mutat. Res.*, **523-524** (2003) 209—216
- [16] **A. S. Buchelnikov, A. A. Hernandez Santiago, M. Gonzalez Flores, R. Vazquez Ramirez, D. B. Davies, M. P. Evstigneev.** *Eur. Biophys. J.*, **41** (2012) 273—283
- [17] **J. F. Neault, H. A. Tajmir-Riahi.** *Biophys. J.*, **76** (1999) 2177—2182
- [18] **A. A. Herus, N. A. Gladkovskaya, E. G. Bereznyak, E. V. Dukhopelnikov.** *Biophys. Bull.*, **36**, N 2 (2016) 43—50
- [19] **M. Deiana, K. Matczyszyn, J. Massin, J. Olesiak-Banska, C. Andraud, M. Samoc.** *PLoS One*, **10**, N 7 (2015) e0133814
- [20] **E. Dukhopelnikov, E. Bereznyak, N. Gladkovskaya, A. Skuratovska, D. Krivonos.** *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **247** (2021) 119114
- [21] **M. Mirzaei, M. Khayat, A. Saeidi.** *Sci. Iran.*, **19**, N 3 (2012) 561—564
- [22] **J. Ghasemi, Sh. Ahmadi, A. I. Ahmad, S. Ghobadi.** *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **149**, N 1 (2008) 9—22
- [23] **Y. Ni, Y. Wang, S. Kokot.** *Electroanalysis*, **22**, N 19 (2010) 2216—2224
- [24] **M. Tao, G. Zhang, Ch. Xiong, J. Pan.** *New J. Chem.*, **39**, N 5 (2015) 3665—3674
- [25] **K. H. Esbensen, D. Guyot, F. Westad, L. P. Houmoller.** *Multivariate Data Analysis. In Practice: an Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design*, Oslo, CAMO (2002) 598
- [26] **F. Barcelo, D. Capo, J. Portugal.** *Nucl. Acids Res.*, **30**, N 20 (2002) 4567—4573
- [27] **M. Dourlent, C. Helene.** *Eur. J. Biochem.*, **23**, N 1 (1971) 86—95
- [28] **D. Bhowmik, S. Das, M. Hossain, L. Haq, G. S. Kumar.** *PLoS One*, **7**, N 5 (2012) e37939
- [29] **M. Airoldi, G. Barone, G. Gennaro, A. M. Giuliani, M. Giustini.** *Biochemistry*, **53**, N 13 (2014) 2197—2207
- [30] **S. A. Winkle, L. S. Rosenberg, T. R. Krugh.** *Nucl. Acids Res.*, **10**, N 24 (1982) 8211—8223
- [31] **C. R. Cantor, P. R. Schimmel.** *Biophysical Chemistry: Part III: The Behavior of Biological Macromolecules*, San Francisco, W. H. Freeman (1980) 597
- [32] **J. D. McGhee, P. H. von Hippel.** *J. Mol. Biol.*, **86**, N 2 (1974) 469—489
- [33] **V. G. Gumenyuk, N. V. Bashmakova, S. Yu. Kutovyy, V. M. Yashchuk, L. A. Zaika.** *Ukr. J. Phys.*, **56**, N 2 (2011) 524—533
- [34] **X. L. Li, Y. J. Hu, H. Wang, B. Q. Yu, H. L. Yue.** *Biomacromolecules*, **13**, N 3 (2012) 873—880
- [35] **W. Müller, D. M. Crothers.** *Eur. J. Biochem.*, **54**, N 1 (1975) 267—277
- [36] **L. A. Tavadyan, S. H. Minasyan, G. H. Kocharyan, A. P. Antonyan, V. G. Sahakyan, M. A. Parsadanyan, P. O. Vardevanyan.** *Biophys. Rev. Lett.*, **12**, N 3 (2017) 1—11