

УДК: 577.323

## АНАЛИЗ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ И МИТОКСАНТРОНА С ДНК ПО ИЗОТЕРМАМ АДсорбЦИИ

© 2017 г. П. О. Вардеванян<sup>a,\*</sup>, М. А. Парсаданян<sup>a</sup>, А. П. Антонян<sup>a</sup>, С. Н. Акопян<sup>b</sup><sup>a</sup> Ереванский государственный университет, Факультет биологии, Ереван, Армения<sup>b</sup> Государственный инженерный университет Армении, Ереван, Армения

\* e-mail: p.vardevanyan@ysu.am

Поступила в редакцию 03.03.2016 г.

Проведен анализ изотерм адсорбции на основании экспериментально полученных данных по связыванию противоопухолевого соединения митоксантрона и бромистого этидия с ДНК. Полученные результаты показывают, что с помощью сравнительно простой линейной изотермы получаются наиболее точные значения константы связывания  $K$  и числа нуклеотидов  $n$ , приходящих на одно место связывания. На основании значений  $K$  получены величины изменения энтальпии при комплексообразовании этих лигандов с ДНК.

**Ключевые слова:** изотермы адсорбции, митоксантрон, бромистый этидий, ДНК, комплексообразование

DOI: 10.7868/S0044453717060322

В исследованиях по обратимому связыванию лигандов с нуклеиновыми кислотами (НК) используют различные модели [1–5], однако, для анализа экспериментальных данных важным является достижение состояния, когда все места связывания на НК полностью заняты молекулами лиганда при существовании только одного способа связывания. Тем не менее, необходимо отметить, что в основном низкомолекулярные соединения с НК связываются более чем одним способом, так как многие из них в растворе обычно находятся в ионной (в основном катионной) форме [2, 3].

Несмотря на этот факт, анализ изотерм адсорбции в координатах Скотчарда обычно проводится с помощью формулы, предложенной МакГи и фон Хиппелем. В этом случае НК рассматривается как линейная решетка бесконечной длины, состоящей из идентичных и невзаимодействующих центров связывания. При заполнении такой структуры, в случае некооперативного взаимодействия, учитывается модель исключенных центров заполнения (соседние с местом связывания потенциальные центры становятся исключенными для других молекул лиганда), поэтому изотермы адсорбции описываются следующим уравнением [4]

$$\frac{r}{C_f} = K \frac{(1 - nr)^n}{[1 - (n - 1)r]^{n-1}}, \quad (1)$$

где  $K$  – константа связывания лиганда одним типом,  $n$  – число оснований НК, приходящих на одно место связывания,  $C_f$  – концентрация свободных,  $C_b$  – концентрация связанных молекул лиганда соответственно,  $C_p$  – концентрация фосфатных групп НК;  $r = C_b/C_p$ .

В случае учета взаимодействий между связанными молекулами лиганда (кооперативное связывание) вводится соответствующий параметр кооперативности  $\omega$ . В рамках кооперативной модели “исключенных мест связывания, изотерма адсорбции описывается следующим уравнением [5]

$$\frac{r}{C_f} = K(1 - nr) \times \left[ \frac{(2\omega - 1)(1 - nr) + r - R}{2(\omega - 1)(1 - nr)} \right]^{n-1} \times \left[ \frac{1 - (n + 1)r + R}{2(1 - nr)} \right]^2, \quad (2)$$

где  $R = \left( [1 - (n + 1)r]^2 + 4\omega r(1 - nr) \right)^{1/2}$ .

Параметр  $\omega$  может быть больше 1 (кооперативное связывание) или меньше 1 (антикооперативное связывание). При кооперативном связывании лиганда с НК изотерма адсорбции в области низких заполнений получается выпуклой, при

**Таблица 1.** Термодинамические параметры связывания митоксантрона с ДНК

<i>T</i> , К	Формула	<i>n</i>	$K \times 10^{-5}$ , М <sup>-1</sup>	$-\Delta G$ , ккал/моль	$-\Delta H$ , ккал/моль	$-\Delta S$ , кал/(К моль)
298	(1)	2.8	$6.7 \pm 0.5$ [10]	$8.2 \pm 0.1$	10.4	7.2
308		2.8	$3.3 \pm 0.4$ [10]	$8.0 \pm 0.1$		
318		3.0	$3.0 \pm 0.4$ [10]	$8.1 \pm 0.2$		
298	(2)	3.0	$7.3 \pm 0.4$	$8.2 \pm 0.1$	10.1	6.3
308		3.1	$3.5 \pm 0.5$	$8.0 \pm 0.2$		
318		2.8	$3.1 \pm 0.3$	$8.1 \pm 0.2$		
298	(3)	2.8	$2.3 \pm 0.1$	$7.5 \pm 0.1$	10.9	10.9
308		2.9	$1.3 \pm 0.2$	$7.4 \pm 0.2$		
318		2.9	$1.0 \pm 0.1$	$7.4 \pm 0.1$		

антикооперативном связывании — непрямолинейной (гиперболической).

Необходимо отметить, что в большинстве случаев для достижения полностью связанного состояния требуются высокие концентрации НК [6], поэтому изотермы адсорбции анализируются в области малых заполнений. Однако, в этом случае результаты будут достоверными, если места связывания одним способом будут полностью насыщены молекулами лиганда, что, однако, не всегда реализуется. С другой стороны, поскольку большинство лигандов с НК связывается более чем одним способом, то изотермы адсорбции также становятся непрямолинейными. Учитывая это, непрямолинейные изотермы адсорбции целесообразнее линеаризовать, поэтому в работе [7] была разработана модель, позволяющая получить прямолинейные изотермы адсорбции при малых заполнениях:

$$\frac{r}{C_f} = K(1 - (2n - 1)r). \quad (3)$$

Определение  $K$  и  $n$  с помощью формулы (3), по сравнению с (2) относительно просто и не требует высоких концентраций лиганда и НК.

Основываясь на вышеприведенное, в данной работе изотермы адсорбции лиганда на ДНК анализировались по формулам (1)–(3) и в каждом случае были определены величины  $K$  и  $n$ , а также значения изменений термодинамических параметров (свободной энергии —  $\Delta G$ , энтальпии —  $\Delta H$ , энтропии —  $\Delta S$ ) при связывании классического интеркалятора бромистого этидия (БЭ) и митоксантрона (МК) с двуспиральной ДНК.

Связывание БЭ и МК с ДНК тимуса теленка исследовалось в водном растворе содержащем 0.1 М NaCl, 0.01 М *трис*-HCl, pH 7.4. Концентрации ДНК, БЭ и МК были определены спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции,  $\epsilon_{260}(P) = 6600 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$  для ДНК т.т.;  $\epsilon_{480} = 5800 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$  для БЭ;  $\epsilon_{682} = 8360 \text{ М}^{-1}$

$\text{см}^{-1}$  для МК [8]. Спектрофотометрическое титрование водных растворов лигандов растворами ДНК проводилось на спектрофотометре РУЕ UNICAM SP 8-100. Концентрация лигандов была приблизительно  $C_0 \approx 10^{-5} \text{ М}$ , при таких концентрациях оба лиганда в основном находятся в мономерном состоянии [9]. Измерения проводились в термостатированных ячейках с использованием 1 см кварцевых кювет с герметически закрывающимися крышками.

При анализе результатов полуинтеркаляционного связывания противоопухолевого соединения МК с ДНК тимуса теленка использовали экспериментальные данные, приведенные в работах [10, 11]. Изотермы адсорбции построены на основании анализа спектров поглощения указанных лигандов с ДНК в координатах Скэтчарда [6, 8, 9]. Для определения величин  $\Delta H$  комплексов БЭ-ДНК и МК-ДНК исследования проводились в интервале изменения температуры  $25 \leq T \leq 45^\circ\text{C}$ , (в этих условиях ДНК находится в двуспиральном состоянии). Методом наименьших квадратов через экспериментальные точки проведены теоретические кривые по формулам (1)–(3) и определены значения  $K$  и  $n$  (табл. 1 и 2).

Значение  $\Delta G$  вычислялось по формуле:

$$\Delta G = -RT \ln K, \quad (4)$$

где  $R$  — универсальная газовая постоянная,  $T$  — абсолютная температура. Значение  $\Delta H$  определено из анализа кривых Вант-Гоффа (при линейной зависимости  $\ln K$  от  $1/T$  получается величина —  $\Delta H/R$ ) и с помощью формулы рассчитано значение  $\Delta G$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (5)$$

Полученные значения  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  также приведены в табл. 1 и 2. Из табличных данных выявляется, что значения  $K$ , полученные с помощью анализа изотерм адсорбции по формулам (1)–(3) отличаются, в то время как значения  $n$  в пределах

**Таблица 2.** Термодинамические параметры связывания бромистого этидия с ДНК

$T, K$	Формула	$n$	$K \times 10^{-6}, M^{-1}$	$-\Delta G, \text{ ккал/моль}$	$-\Delta H, \text{ ккал/моль}$	$\Delta S, \text{ кал/(K моль)}$
298	(1)	2.1	$3.5 \pm 0.2$	$8.8 \pm 0.2$	7.5	4.4
308		2.0	$2.3 \pm 0.2$	$8.85 \pm 0.15$		
318		2.1	$1.55 \pm 0.1$	$8.9 \pm 0.2$		
298	(2)	2.1	$4.7 \pm 0.1$	$9.0 \pm 0.1$	7.4	5.4
308		2.2	$3.1 \pm 0.2$	$9.0 \pm 0.2$		
318		2.0	$2.1 \pm 0.1$	$8.5 \pm 0.1$		
298	(3)	2.2	$2.1 \pm 0.1$	$8.5 \pm 0.1$	7.8	2.4
308		2.0	$1.35 \pm 0.1$	$8.5 \pm 0.1$		
318		2.1	$0.9 \pm 0.1$	$8.55 \pm 0.15$		

погрешности эксперимента практически одинаковы.

При описании связывания указанных лигандов с ДНК по нелинейным формулам (1) и (2), значения  $\Delta H$  мало отличаются друг от друга. Значения же  $\Delta S$  друг от друга отличаются более значительно, несмотря на то, что величины  $K$ , полученные при соответствующих температурах по (1) и (2), практически совпадают друг с другом.

При анализе же данных по (3), в случае комплексов МК–ДНК, для одного и того же способа получены меньшие значения  $K$ , чем по нелинейным формулам (табл. 1). Аналогичные результаты получены и для комплексов БЭ–ДНК (табл. 2).

Этим обусловлено то, что вычисленные значения  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  и  $\Delta S$  различаются друг от друга, несмотря на то, что ошибка экспериментальных измерений составляет примерно 5%. Учитывая, что анализ данных по формуле (3) является более точным (вследствие прямолинейности изотермы адсорбции), мы полагаем, что значения термодинамических параметров связывания МК и БЭ с ДНК находятся в соответствии с результатами анализов по (1) и (2).

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что анализ экспериментальных данных с помощью прямолинейной изотермы адсорбции в случае взаимодействия лигандов с НК является достаточно точным при оценке термодинамических параметров связывания ( $K$ ,  $n$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ). Более того, полученные результаты на-

ходятся в хорошем соответствии с результатами, полученными прямым микрокалориметрическим способом [12].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vardevanyan P.O., Arakelyan V.B., Parsadanyan M.A. et al. // *Modern Physics Letters B*. 2014. V. 28. № 22. P. 1450178-1.
2. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A. et al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2008. V. 25. № 6. P. 641.
3. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A. et al. // *J. Braz. Chem. Soc.* 2012. V. 23. № 11. P. 2016.
4. McGhee J.D., von Hippel P.H. // *J. Mol. Biol.* 1974. V. 86. № 3. P. 469.
5. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. Т. 3. М.: Мир, 1985. 536 с.
6. Бабаян Ю.С., Манзини Дж., Квадриофолио Ф. // *Молекуляр. биология*. 1988. Т. 22. № 4. С. 898.
7. Arakelyan V., Babayan Yu., Polikyan G. // *J. Biomol. Str. Dyn.* 2000. V. 18. № 2. P. 231.
8. Евстигнеев М.П., Веселков Д.А., Дымант Л.Н. и др. // *Журн. структур. химии*. 2001. Т. 42. № 5. С. 928.
9. Vardevanyan P.O., Parsadanyan M.A., Minasyants M.V. // *Biophys. Reviews and Letters*. 2014. V. 9. № 3. P. 239.
10. Бабаян Ю.С., Манзини Дж. // *Молекуляр. биология*. 1990. Т. 24. № 4. С. 1084.
11. Agazwal Sh., Jangir D.K., Mehrotra R. // *J. Photochem. PhotoBiol. B. Biology*. 2013. V. 120. № 5. P. 177.
12. Delben F., Quadrioglio F., Giancotti V., Crescenzi V. // *Biopolymers*. 1982. V. 21. № 2. P. 331.