

УДК 577.32:5396.199

## СВЯЗЫВАНИЕ ТЕОФИЛЛИНА С ТИМУСНОЙ ДНК В ПРИСУТСТВИИ КОНКУРИРУЮЩИХ ЛИГАНДОВ

Е.Л. Ермак<sup>1,2</sup>, Е.Б. Круглова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина  
61077, г. Харьков, пл. Свободы, 4

<sup>2</sup>Институт радиопластики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины  
61085, г. Харьков, ул. Ак. Проскуры, 12  
e-mail: e\_ermak@ire.kharkov.ua  
Поступила в редакцию 4 мая 2007 г.

Проведено спектрофотометрическое исследование связывания теофиллина с тимусной ДНК в присутствии окрашенных лигандов-меток. В качестве меток были выбраны лиганды, поглощающие в видимой области спектра и взаимодействующие с ДНК с образованием различных типов комплексов – актиноинового производное ActII и бромистый этидий. Показано, что теофиллин образует с указанными лигандами гетероассоциаты. Константы связывания теофиллина с ActII ( $943 \pm 124 \text{ M}^{-1}$ ) и бромистым этидием ( $177 \pm 36 \text{ M}^{-1}$ ) значительно выше, чем у кофеина в комплексах с теми же лигандами. Исследование конкурентного связывания теофиллина и лигандов-меток с тимусной ДНК показало, что теофиллин является конкурентом ActII и бромистого этидия за места связывания на ДНК в основном в области низких концентраций ДНК, т.е. когда в растворе присутствует большое количество свободных лигандов. В области больших концентраций ДНК теофиллин препятствует образованию комплексов ActII и бромистого этидия с ДНК по типу интеркаляции. С помощью программ оптимизации спектрофотометрических концентрационных зависимостей DALSCOMP и COMPHET получены константа ( $185 \pm 20 \text{ M}^{-1}$ ) и величина места связывания ( $n=1$ ) теофиллина с ДНК. Показано, что константа связывания теофиллина с ДНК совпадает в пределах ошибки с константой связывания кофеина с ДНК ( $190 \pm 15 \text{ M}^{-1}$ ). На основании проведенных исследований делается вывод о большей активности теофиллина по сравнению с кофеином как перехватчика плоских ароматических молекул лигандов в растворе, что необходимо учитывать при совместном использовании этих лекарственных соединений в медицине и биологии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** теофиллин, ДНК, спектрофотометрия, конкурентное связывание, гетероассоциация, константы связывания.

### ВВЕДЕНИЕ

Теофиллин (Trh) и кофеин (CAF) являются наиболее распространенными представителями метилксантинов и широко используются в виде компонентов многих диет и лекарственных препаратов [1, 2]. Также известно, что Trh и CAF уменьшают эффективность биологического действия ряда лекарственных соединений: даунорубицина, доксорубицина и митоксантрона, непосредственно взаимодействуя с ними путем стекинга ароматических хромофоров лигандов [3]. Понижение активности лекарственных препаратов в присутствии метилксантинов может быть связано не только с непосредственным взаимодействием лигандов друг с другом, но и с их конкуренцией за места связывания на матрицах нуклеиновых кислот (НК). Авторы работы [4] указывают на способность теофиллина и кофеина приводить к де-интеркаляции бромистого этидия и акридинового оранжевого из тимусной ДНК. Известно, что Trh и CAF непосредственно взаимодействуют с РНК путем образования водородных связей с основаниями НК, причем сродство Trh к РНК значительно выше, чем у CAF [5]. В литературе практически отсутствуют данные по взаимодействию метилксантинов с нуклеиновыми кислотами. Так, в работе [6] методом ЯМР-спектроскопии была получена константа связывания CAF с 5'-d(TGCA) ( $K = 246 \pm 18 \text{ M}^{-1}$ ). Ранее нами было изучено взаимодействие CAF с ДНК ( $K = 190 \pm 20 \text{ M}^{-1}$ ) [7]. В связи с этим представляет интерес изучить, как связывание теофиллина с ДНК, так и влияние теофиллина на процессы связывания других биологически активных лигандов с ДНК. Поскольку спектры поглощения теофиллина и ДНК в УФ-области практически совпадают, мы исследовали связывание Trh с ДНК с помощью окрашенных меток в видимой области спектра по разработанной нами ранее методике конкурентного связывания [7-9].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали коммерческую ДНК из тимуса теленка, теофиллин фирмы "Serva" и бромистый этидий фирмы "Fluka". Антибиотик актиноинового ряда ActII был синтезирован Глибиным

и др. [10]. Все препараты использовались без дополнительной очистки. Структурные формулы лигандов приведены на рис. 1. При определении концентраций веществ использовали следующие значения молярных коэффициентов экстинкции:  $\varepsilon_{260} = 6,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  для тимусной ДНК ( $C_p$ , в молях фосфатов) [11],  $\varepsilon_{480} = 5,85 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  для этидиума бромида [12] и  $\varepsilon_{400} = 1,61 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  для актиноинового производного ActII (выбранная длина волны соответствует изобестической точке в спектрах поглощения ActII при мономер-димерном равновесии) [13]. Концентрацию теофиллина определяли весовым методом. Величины P/D рассчитывали как отношения общих концентраций ДНК ( $C_p$ ) и лиганда ( $C_D$ ). Спектрофотометрические измерения в видимой и УФ - областях проводили в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 2, 10 и 20 мм на спектрофотометре Spesord M40 (Германия) в фосфатном ( $2,5 \times 10^{-2} \text{ M KN}_2\text{PO}_4$ ,  $2,5 \times 10^{-2} \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ ) буферном растворе с pH=6,86.

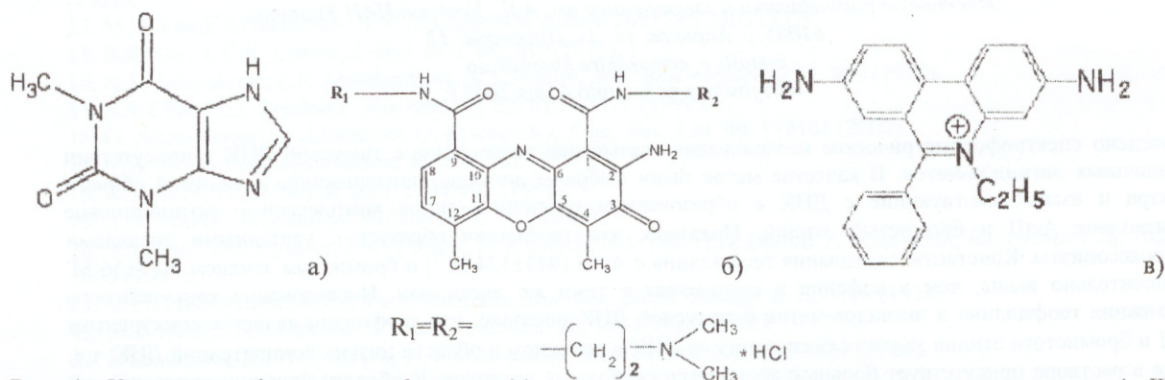


Рис. 1. Химические формулы теофиллина (а), актиноинового производного ActII (б) и этидиума бромид (в).

Для анализа комплексообразования в тройной системе Trh – ДНК – ЭБ мы использовали две модели связывания, по-разному описывающие взаимодействие этих лигандов с ДНК.

*Модель 1* (уравнения для расчета равновесного состава (1)-(4)) описывают процесс комплексообразования в системе Trh-ЭБ-ДНК с учетом образования только одного типа комплексов каждого из лигандов с НК. Величины мест связывания Trh и ЭБ –  $n_1$  и  $n_2$  могут варьироваться в широкой области значений. Отметим, что в уравнениях (1)-(4) индекс 1 мы используем для обозначения теофиллина, а индекс 2 – для ЭБ.

$$\frac{R_1}{m_1} = K_1 \left[ \frac{1 - R_1 \times n_1 - R_2 \times n_2}{1 - R_1 \times n_1 - R_2 \times n_2 + R} \right]^{n_1} (1 - R_1 \times n_1 - R_2 \times n_2 + R) \quad (1)$$

$$\frac{R_2}{m_2} = K_2 \left[ \frac{1 - R_1 \times n_1 - R_2 \times n_2}{1 - R_1 \times n_1 - R_2 \times n_2 + R} \right]^{n_2} (1 - R_1 \times n_1 - R_2 \times n_2 + R) \quad (2)$$

$$C_{D1} = m_1 + R_1 \times C_p + K_{12} \times m_1 \times m_2 \quad (3)$$

$$C_{D2} = m_2 + R_2 \times C_p + K_{12} \times m_1 \times m_2 \quad (4)$$

В этой модели мы учитываем также образование гетероассоциатов Trh-ЭБ (слагаемое 3 в уравнениях (3) и (4), константа гетероассоциации  $K_{12}$ ), и димеризацию ЭБ (слагаемое 4 в уравнении (4), константа димеризации  $K_D$ ). В уравнениях (1)-(4) использованы следующие обозначения:  $R_1$  и  $R_2$  – доли связанных лигандов 1 и 2, определяемые как частное от деления концентраций соответствующих комплексов на общую концентрацию оснований (фосфатов) ДНК,  $m_1$  и  $m_2$  – равновесные концентрации свободных лигандов.  $K_1$ ,  $K_2$  – константы ассоциации лигандов 1 и 2 со своим местом связывания, характеризующимся размером  $n_1$ ,  $n_2$  нуклеотидов ДНК.  $R$  обозначает сумму ( $R_1 + R_2$ ).  $C_D$ ,  $C_p$  – общие концентрации лигандов и ДНК, соответственно.

*Модель 2* (уравнения для расчета равновесного состава (5)-(9)) рассматривает связывание ЭБ с ДНК в присутствии Trh с учетом образования двух типов комплексов ЭБ с ДНК (лиганда, имеющего соседей на ДНК и лиганда, не имеющего соседей) с различными молярными коэффициентами экстинкции и фактором кооперативности, но на одинаковых местах связывания  $n_2$  с константой связывания  $K_2$ . Теофиллин связывается с ДНК по одному типу комплексов с константой комплексообразования  $K_1$  на месте связывания  $n_1=1$ . В этой модели также учитывается гетероассоциация ЭБ и Trh. Расчет равновесного состава смесей и оптимизация соответствующих спектрофотометрических концентрационных зависимостей по *Модели 2* проводились нами в программе

DALSCOMP [8]. Программы оптимизации COMPHET и DALSCOMP были составлены нами на основе оригинальной программы оптимизации DALС, предложенной Хартли и др. [14], путем изменений в алгоритме процедуры расчета равновесных концентраций в соответствии с уравнениями (1) – (4) для Модели 1 и уравнениями (5) – (9) для Модели 2.

$$\frac{R_1}{m_1} = K_1 \times (1 - R_1 - R_2 \times n_2) \quad (5)$$

$$\frac{R_2}{m_2} = K_2 \cdot \left[ \frac{1 - R_1 - R_2 \times n_2}{1 - R_2 \times n_2 + R_2 - \gamma \times \frac{\omega - 1}{\omega}} \right]^{n_2} \cdot \frac{\omega \times R_2^2}{\gamma} \quad (6)$$

$$\left( R_2 - \gamma \times \frac{\omega - 1}{\omega} \right)^2 = \frac{\gamma}{\omega} \left( 1 - R_2 \times n_2 + R_2 - \gamma \times \frac{\omega - 1}{\omega} \right) \quad (7)$$

$$C_{Tph}^0 = m_1 + R_1 \times C_p^0 + K \times m_1 \times m_2 \quad (8)$$

$$C_D^0 = m_2 + R_2 \times C_p^0 + K \times m_1 \times m_2 \quad (9)$$

Уравнение (5) описывает связывание Трф с ДНК. Уравнения (6), (7) и (9) при  $K_1=0$  и  $K=0$  (где  $K_1$  – константа связывания Трф с ДНК) описывают связывание ЭБ с полимерной матрицей в отсутствие Трф. Константы связывания лигандов с ДНК вычисляются в программе с учетом взаимодействия ЭБ с Трф (слагаемое  $K \times m_1 \times m_2$  в уравнениях (8) и (9)). Величина места связывания Трф с ДНК была выбрана как 1 молекула Трф на 1 основание ДНК. Уравнения (8) и (9) отражают закон сохранения общих концентраций.

В уравнениях (5) – (9):  $K_2$  – константа мономерно связанного лиганда на месте связывания  $n_2$ ,  $\omega$  – фактор кооперативности, характеризующий образование агрегатов на тех же местах связывания;  $R_1$  и  $R_2$  – доли связанных Трф и ЭБ, равные частному от деления соответствующих равновесных концентраций комплексов на  $C_p^0$ ;  $C_{Tph}^0$ ,  $C_D^0$ ,  $C_p^0$ , – общие концентрации Трф, ЭБ и оснований ДНК;  $m_1$  и  $m_2$  – концентрации несвязанного Трф и ЭБ;  $\gamma$  – характеризует вероятность расположения молекул ЭБ на соседних местах связывания [15]. Величина места связывания  $n_2$  равна количеству оснований, занятых ЭБ на матрице ДНК.

В программах COMPHET и DALSCOMP оптимальные значения молярных коэффициентов экстинкции образующихся комплексов лигандов с ДНК ( $\epsilon_{ij}$ ) и соответствующие константы связывания определяются путем минимизации суммы квадратов отклонений наблюдаемых поглощений  $A_{ij}^0$  от расчетных  $A_{ij}$ , одновременно для всех  $i$ -тых смесей в широком интервале длин волн. Выход из программ оптимизации осуществляется в случае, когда дальнейшие итерации по оптимизируемым параметрам  $K_i$  и  $\epsilon_{ij}$  уже не приводят к уменьшению значения суммы квадратов отклонений. При выходе из программ оптимизации рассчитывались значения факторов Гамильтона  $Q$  и  $Q_{lim}$ :

$$Q = \left\{ \left( \sum_{ij} A_{ij}^0 - A_{ij} \right)^2 / \left( \sum_{ij} A_{ij}^0 \right)^2 \right\}^{1/2} \quad (10)$$

$$Q_{lim} = \left\{ \left( \sum_{ij} \epsilon_{ij}^2 \right) / \left( \sum_{ij} A_{ij}^0 \right)^2 \right\}^{1/2}, \quad (11)$$

где  $\epsilon_{ij}$  – отклонение в поглощении смесей. При приготовлении общих концентраций реагирующих компонентов учитывалась погрешность в 1% и при измерении поглощения учитывалась ошибка в 0.005 оптических единиц. Рассматриваемая модель удовлетворительно описывает концентрационные спектральные зависимости для тех значений параметров (оптимальные значения параметров), при которых  $Q < Q_{lim}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние одного из лигандов на связывание другого с матрицами НК можно представить как:

- (1) их непосредственную конкуренцию за одни и те же места связывания на матрице и/или
- (2) за счет взаимодействия этих лигандов друг с другом в растворе.

Во втором случае за счет уменьшения количества свободных лигандов, уменьшается количество лигандов, связанных с полинуклеотидами. Для оценки влияния процессов гетероассоциации на комплексообразование в тройных системах Трф-ДНК-АктII и Трф-ДНК-ЭБ мы исследовали изменения спектров лигандов-меток при добавлении в раствор Трф.

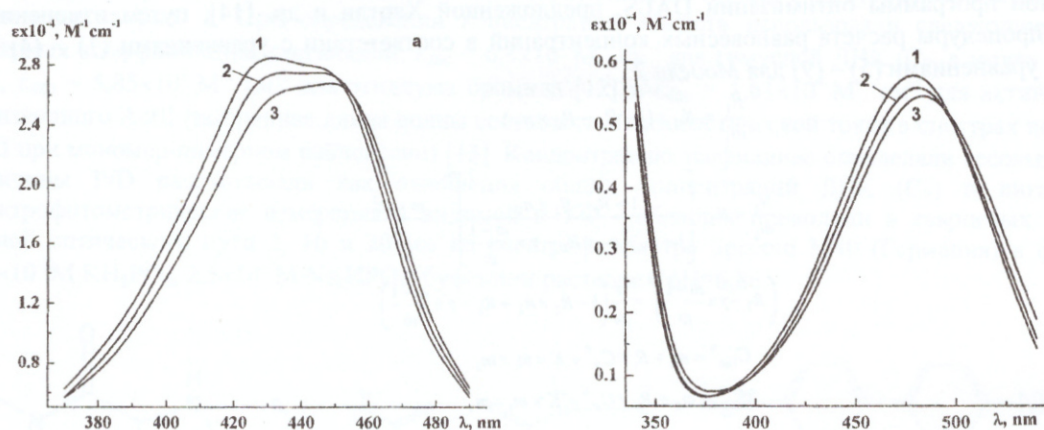


Рис. 2. Кажущиеся молярные коэффициенты экстинкции смесей Трп – ActII ( $C_{\text{ActII}}=2,04 \times 10^{-5}$  М,  $C_{\text{Трп}}=0$  (1),  $C_{\text{Трп}}=1,06 \times 10^{-3}$  М (2),  $C_{\text{Трп}}=2,96 \times 10^{-3}$  М (3)) (а) и Трп – ЭБ ( $C_{\text{ЭБ}}=1,12 \times 10^{-4}$  М,  $C_{\text{Трп}}=0$  (1),  $C_{\text{Трп}}=1,10 \times 10^{-3}$  М (2),  $C_{\text{Трп}}=3,14 \times 10^{-3}$  М (3)) (б).

Из рис. 2 видно, что Трп связывается и с ActII, и с ЭБ, и спектры поглощения гетероассоциатов отличаются от спектров поглощения свободных лигандов-меток. Поскольку все спектры поглощения проходят через одни и те же изобестические точки ( $\lambda \sim 455$  нм для смесей ActII-Трп;  $\lambda \sim 390$  нм и  $\lambda \sim 500$  нм для смесей ЭБ-Трп) в широкой области добавляемых концентраций Трп, в каждой из систем ActII-Трп и ЭБ-Трп образуется по одному типу комплексов. Молярные коэффициенты экстинкции образующихся комплексов, рассчитанные по программе оптимизации DALIS и уравнениям  $\text{ActII} + \text{ActII} = (\text{ActII})_2$ ,  $\text{ActII} + \text{Трп} = \text{ActII-Трп}$  и  $\text{ЭБ} + \text{Трп} = \text{ЭБ-Трп}$  приведены на рис.3, а соответствующие значения констант гетероассоциации – в таблице 1. В таблице 1 для сравнения приведены также значения констант гетероассоциации CAF с ActII [7] и CAF с ЭБ [16].

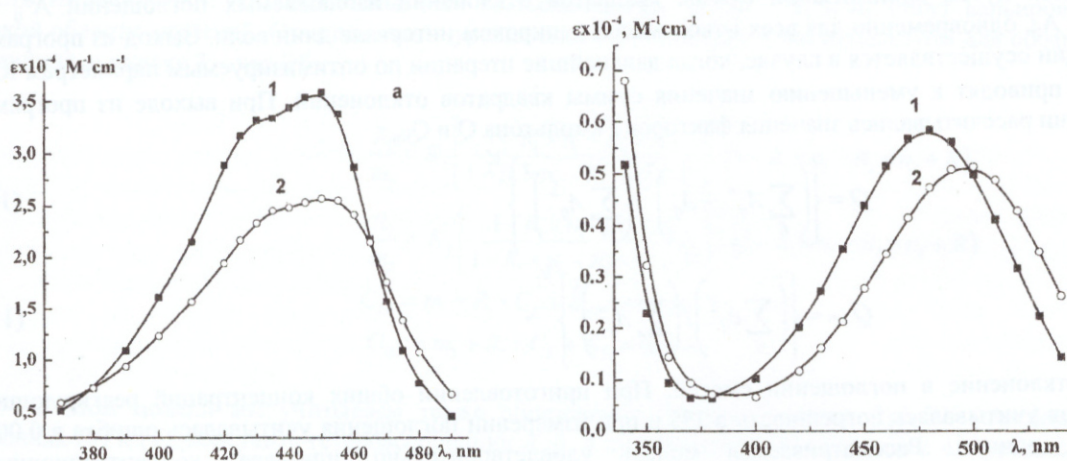


Рис. 3. Молярные коэффициенты экстинкции мономера ActII (1) и его комплекса с Трп (2) (а), ЭБ (1) и его комплекса с Трп (2) (б), рассчитанные по программе DALIS.

Таблица 1. Константы связывания Трп и CAF с ЭБ и ActII, рассчитанные по программе DALIS.

	Трп – ActII	Трп – ЭБ	CAF – ActII [7]	CAF – ЭБ [16]
$K, \text{M}^{-1}$	$943 \pm 124$	$177 \pm 36$	$337 \pm 17$	$84.5 \pm 3.5$

Как видно из таблицы 1, константы связывания Трп с ActII и Трп с ЭБ значительно превышают такие же для CAF. Можно предположить, что это связано с отсутствием в молекуле Трп метильной группы, присутствующей у CAF, что уменьшает стерические препятствия при  $\pi$ - $\pi$  взаимодействии ароматических колец хромофоров лигандов и Трп.

## Связывание теofilлина с тимусной ДНК в присутствии конкурирующих лигандов

Также мы провели исследования конкурентного связывания ActII и ЭБ с ДНК в присутствии Trp. Спектры поглощения соответствующих смесей приведены на рис. 4.

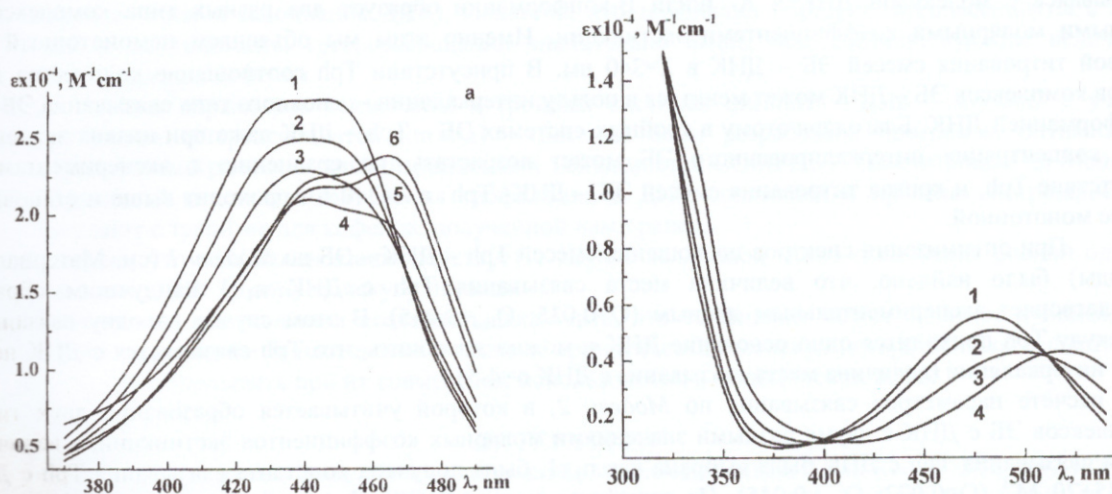


Рис. 4. Кажущиеся молярные коэффициенты экстинкции смесей Trp – ДНК – ActII ( $C_{\text{ActII}}=1,91 \times 10^{-5}$  М,  $C_{\text{Trp}}=1,17 \times 10^{-3}$  М,  $P/D=0$  (1), 1.7 (2), 3.3 (3), 6.6 (4), 21.1 (5), 84.6 (6)) (а) и Trp – ДНК – ЭБ ( $C_{\text{ЭБ}}=4,6 \times 10^{-5}$  М,  $C_{\text{Trp}}=1,45 \times 10^{-3}$  М,  $P/D=0$  (1), 0.9 (2), 2.8 (3), 9.3 (4)) (б).

Можно отметить, что спектры поглощения смесей Trp – ДНК – ActII (рис. 4, а) и Trp – ДНК – ЭБ (рис. 4, б) похожи на спектры поглощения смесей ДНК – ActII и ДНК – ЭБ в отсутствие Trp [17, 18]. Однако при сравнении кривых титрования смесей ДНК – ActII и ДНК – ЭБ в присутствии и в отсутствии Trp (рис. 5), хорошо видно влияние теofilлина на связывание этих лигандов с ДНК. Кривые титрования смесей ДНК – ActII и ActII – ДНК – Trp были построены в длине волны, соответствующей максимуму поглощения комплекса ActII с ДНК по типу интеркаляции, а смесей ДНК – ЭБ и ЭБ – ДНК – Trp – в длине волны, в которой изменения при титровании видны наилучшим образом.

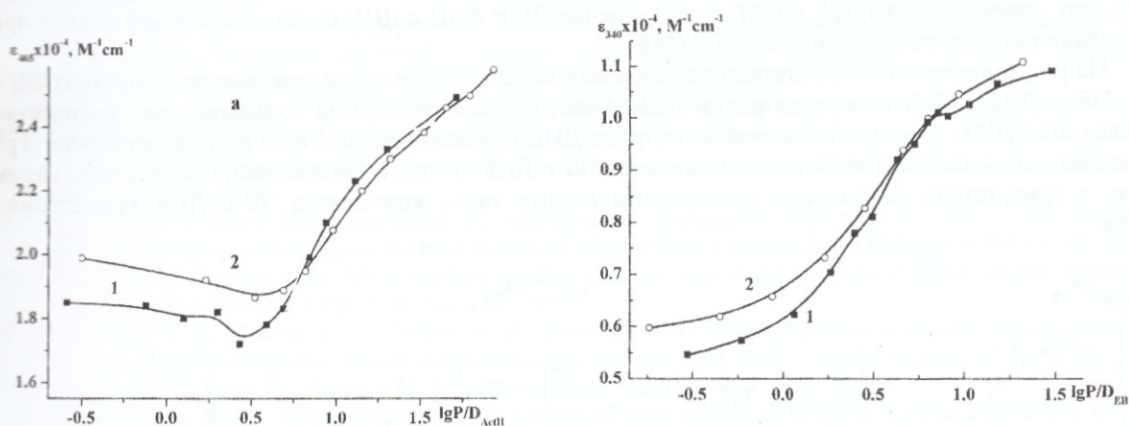


Рис. 5. Зависимость кажущихся молярных коэффициентов экстинкции смесей ActII – ДНК ( $C_{\text{ActII}}=1,51 \times 10^{-5}$  М) (1) и ActII – ДНК – Trp ( $C_{\text{ActII}}=1,91 \times 10^{-5}$  М,  $C_{\text{Trp}}=1,17 \times 10^{-3}$  М) (2) в  $\lambda=465$  нм от  $P/D_{\text{ActII}}$  (а). Зависимость поглощения смесей ЭБ–ДНК ( $C_{\text{ЭБ}}=4,65 \times 10^{-5}$  М) (1) и ЭБ–ДНК–Trp ( $C_{\text{ЭБ}}=4,6 \times 10^{-5}$  М,  $C_{\text{Trp}}=1,45 \times 10^{-3}$  М) (2) в  $\lambda=340$  нм от  $P/D_{\text{ЭБ}}$  (б).

Из рис.5 видно, что Trp изменяет ход кривых титрования смесей ДНК – ActII и ДНК – ЭБ в основном в области низких значений  $P/D$ , когда в растворах еще много свободного красителя. Это можно объяснить тем, что в присутствии Trp с одной стороны, уменьшается количество свободных молекул лиганда-метки в растворе за счет гетероассоциации; а с другой стороны Trp может выступать конкурентом для молекул ActII и ЭБ за места связывания на ДНК. Так, в присутствии Trp кривая титрования смесей ЭБ – ДНК – Trp в  $\lambda=340$  нм становится более монотонной. Следуя выводам ряда работ [17-20], при достаточно больших концентрациях ЭБ и малых значениях  $P/D$  (высокая степень

заполнения матрицы ДНК лигандом) ЭБ переводит ДНК в *A*-подобную конформацию, а при увеличении *P/D* происходит постепенный обратный переход ДНК в *B*-конформацию. Можно предположить, что ЭБ, связываясь с молекулой ДНК в *A*- и/или *B*-конформации образует два разных типа комплексов с разными молярными коэффициентами экстинкции. Именно этим мы объясняем немонотонный ход кривой титрования смесей ЭБ – ДНК в  $\lambda=340$  нм. В присутствии Trh соотношение количества двух типов комплексов ЭБ – ДНК может меняться в пользу интеркаляции – основного типа связывания ЭБ с *B*-конформацией ДНК. Благодаря этому в тройных системах ЭБ – Trh – ДНК даже при низких значениях *P/D* концентрация интеркалированного ЭБ может возрастать, по сравнению с экспериментами в отсутствие Trh, и кривая титрования смесей ЭБ – ДНК- Trh в  $\lambda=340$  нм проходит выше и становится более монотонной.

При оптимизации спектров поглощения смесей Trh – ДНК – ЭБ по *Модели 1* (см. Материалы и методы) было найдено, что величина места связывания Trh с ДНК  $n_1=1$  наилучшим образом удовлетворяет экспериментальным данным ( $Q=0,035$ ;  $Q_{lim}=0,045$ ). В этом случае на одну связанную молекулу Trh приходится одно основание ДНК и можно заключить, что Trh связывается с ДНК не по типу интеркаляции (величина места связывания с ДНК  $n=4-5$ ).

При расчете параметров связывания по *Модели 2*, в которой учитывается образование двух типов комплексов ЭБ с ДНК с двумя разными значениями молярных коэффициентов экстинкции, а величина места связывания Trh с ДНК была выбрана как  $n_1=1$ , была получена константа связывания Trh с ДНК  $K=185\pm 20$   $M^{-1}$  ( $Q=0,022$ ;  $Q_{lim}=0,045$ ). Из сравнения значений  $Q$  и  $Q_{lim}$ , полученных при расчетах по *Модели 1* и *Модели 2* видно, что *Модель 2* лучше описывает одни и те же экспериментальные данные, т.к. значение фактора Гамильтона  $Q$ , рассчитанного по *Модели 2*, значительно ниже, чем по *Модели 1*. В таблице 2 приведена константа связывания Trh с ДНК, а также константы связывания CAF с ДНК [7] и poly(C) [8].

Таблица 2. Константы связывания Trh и CAF с нуклеиновыми кислотами, рассчитанные по *Модели 1*<sup>а)</sup> и *Модели 2*<sup>б)</sup>.

	Trh – ДНК	CAF – ДНК [7]	CAF – poly(C) [8]	ЭБ – ДНК [17-20]	ActII – ДНК [21]
$K, M^{-1}$	$220\pm 50$ <sup>а)</sup> $185\pm 20$ <sup>б)</sup>	$190\pm 15$ <sup>б)</sup>	$170\pm 18$ <sup>б)</sup>	$10^4-10^6$	$4.5\times 10^4$ $2.8\times 10^5$

Сравнивая приведенные в таблице 2 данные, можно заключить, что и Trh, и CAF связываются с НК практически с одинаковыми по величине константами ассоциации. Также можно отметить, что эти константы значительно меньше по величине, чем константы связывания ЭБ или ActII с ДНК. Отсюда следует, что эффект влияния Trh и CAF на связывание ЭБ и ActII с ДНК будет проявляться только при относительно высоких концентрациях Trh и CAF.

На рис. 6 приведены зависимости равновесных концентраций типов комплексов в системах ЭБ – ДНК и ЭБ – ДНК – Trh от концентрации ДНК, рассчитанные по *Модели 2*. Видно, что количество комплекса ЭБ с ДНК, имеющего соседей на матрице ДНК (кривые 2 на рис. 6, а, б), в присутствии Trh значительно уменьшается, а количество комплекса ЭБ с ДНК по типу интеркаляции возрастает. Таким образом, в присутствии теofilлина соотношение разных типов комплексов ЭБ с ДНК существенно меняется.

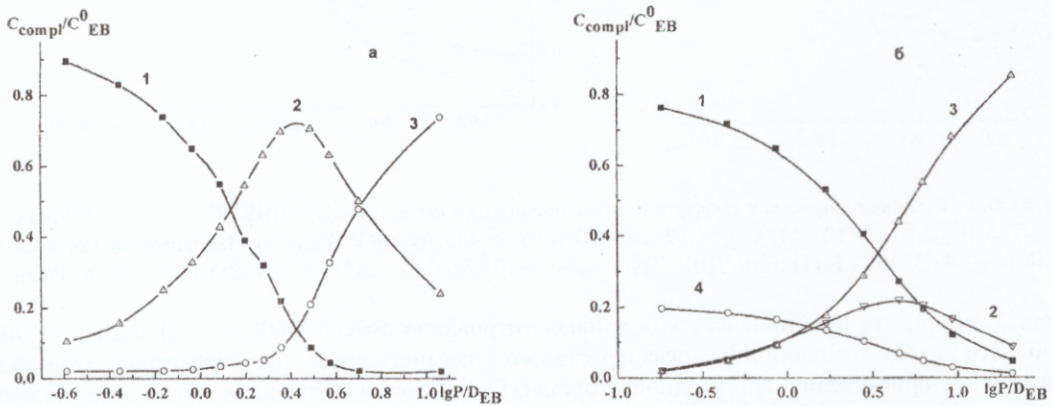


Рис. 6. Равновесный состав смесей ЭБ – ДНК (а) и ЭБ – ДНК – Trh (б), рассчитанный по *Модели 2*. 1 – свободный ЭБ; 2 – комплекс ЭБ с ДНК, имеющий соседей на матрице ДНК; 3 – комплекс ЭБ с ДНК, не имеющий соседей на матрице ДНК; 4 – комплекс ЭБ – Trh.

## ВЫВОДЫ

- 1) Теофиллин препятствует связыванию ЭБ и ActII с ДНК в основном в области низких значений P/D (высокие степени заполнения ДНК). Показано, что теофиллин образует гетероассоциаты с ЭБ и ActII и их константы гетероассоциации значительно выше, чем соответствующие величины, полученные для кофеина.
- 2) Для расчета параметров связывания в тройных системах лиганд1 – ДНК – лиганд2 с учетом образования гетероассоциатов лиганд1 – лиганд2 была разработана программа оптимизации спектрофотометрических концентрационных зависимостей СОМРНЕТ. Рассчитанные по *Модели 1* и *Модели 2* константы связывания теофиллина с ДНК совпадают в пределах погрешности и совпадают с такой же для кофеина, полученной нами ранее.
- 3) Показано, что теофиллин взаимодействует с ДНК с величиной места связывания равной одному основанию ДНК на одну молекулу лиганда.
- 4) Проведенные исследования позволяют заключить, что теофиллин может являться лучшим, чем кофеин, акцептором биологически активных ароматических молекул лекарственных веществ, что необходимо учитывать при их совместном использовании в медицинских целях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Graham D.M. Caffeine-its identity, dietary sources, intake and biological effects // *Nutr Rev.* 1978;36(4):97-102.
2. Williams JF, Lowitt S, Polson JB, Szentivanyi A. Pharmacological and biochemical activities of some monomethylxanthine and methyluric acid derivatives of theophylline and caffeine. *Biochem. Pharmacol.* 1978;27(11):1545-50.
3. Piosik J., Gwizdek-Wisniewska A., Ulanowska K., Ochocinski J., Czyz A., Wegrzyn G. Methylxanthines (caffeine, pentoxifylline and theophylline) decrease the mutagenic effect of daunomycin, doxorubicin and mitoxantrone // *Acta Biochimica Polonica* Vol. 52 No. 4/2005, 923–926.
4. Johnson IM, Kumar SG, Malathi R. De-intercalation of ethidium bromide and acridine orange by xanthine derivatives and their modulatory effect on anticancer agents: a study of DNA-directed toxicity enlightened by time correlated single photon counting. // *J Biomol Struct Dyn.* 2003 Apr;20(5):677-86.
5. Johnson I. M., Kumar S.G. B., Malathi R. RNA Binding Efficacy of Theophylline, Theobromine and Caffeine // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, V. 20, N. 5, (2003) 687-692.
6. Evstigneev, M. P., Rybakova, K. A., Davies, D. B. (2006). Complexation of norfloxacin with DNA in the presence of caffeine. *Biophysical Chemistry* 121 (2) 84-95.
7. Круглова Е.Б., Ермак Е.Л. Исследование конкурентного связывания двух лигандов: актиноцинового антибиотика и кофеина с ДНК // *Вестник Харьковского университета. Биофизический вестник.* – 2003. – Вып.1(12) – С.64-69.
8. Круглова Е.Б., Ермак Е.Л. Конкурентное связывание двух лигандов: актиноцинового производного и кофеина с полирибонитидиловой кислотой в разных конформационных состояниях // *Вестник Харьковского университета. Биофизический вестник.* – 2004. – Вып.1-2(14) – С.32-37.
9. Ермак Е.Л., Круглова Е.Б. Влияние конкурирующих лигандов разного типа на связывание актиноцинового производного ActII с ДНК // «Вестник СевГТУ» (Физика и математика). – 2005. – т.70 – С. 118-126.
10. Глибин Е.Н., Овчинников Д.В., Плеханова Н.Г. Синтез аналогов актиномицина // *Ж. Орг. Х.* - 1997. - Т.33. - В.10. – С. 1573-1576.
11. Muller W., Crothers D.M. Interaction of heteroaromatic compounds with nucleic acids. 1. The influence of heteroatoms and polarizability on the base specificity of intercalating ligands // *Eur.J.Biochem.*-1975.- V.54.- P.267-277.
12. Bresloff J.L., Crothers D.M. DNA-ethidium reaction kinetics: demonstration of direct ligand transfer between DNA binding sites. *J.Mol.Biol.* 1975. V.95. 103-123.
13. Круглова Е. Б., Малеев В. Я., Глибин Е. Н., Веселков А. Н. Спектрофотометрический анализ димеризации производных актиномина с разной длиной боковых цепей // *Вісн. ХНУ. - Біофіз. Вісник* -2002.- 1(10). - С.12-20.
14. Harley F.R., Burgess C., Alcock R.M. *Solution equilibria* Ellis Horwood. 1980. 360 P.
15. Nechipurenko Yu. D. Cooperative effects on binding of large ligands to DNA. II. Contact cooperative interactions between bound ligand molecules. *Mol. Biol.* 1984. V.18. 1066-1079.
16. Larsen R.W., Jasuja R., Hetzler R.K., Muraoka P.T., Andrada V.G., Jameson D.M. Spectroscopic and molecular modeling studies of caffeine complexes with DNA intercalators. // *Bioph. J.* V. 70. 1996. 443-452.
17. Minasyan S.H., Tavadyan L.A., Antonyan A.P., Davtyan H.G., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA // *Bioelectrochemistry.* (2006). V.68. 48 – 55.
18. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetyan A.T. Study of ethidium bromide interaction peculiarities with DNA. *Experimental and Molecular Medicine.* 2001. V.33 (4). 205-208.
19. Benevides J.M., Thomas G.J. Jr. Local conformational changes induced in B-DNA by ethidium intercalation. *Biochemistry.* 2005. V.44 (8). 2993-2999.
20. Yuzaki K., Hamaguchi H. Interaction-induced structural change of DNA as studied 1064 nm near-infrared multichannel Raman spectroscopy. *J. Raman Spectroscopy.* (2004). V.35 (12). 1013-1015.
21. Круглова Е.Б., Гладковская Н.А., Малеев В.Я. Использование метода спектрофотометрического анализа для вычисления термодинамических параметров связывания в системах актиноциновые производные – ДНК // *Биофизика.* – 2005. – Т. 50. - В.2. - С. 253-264.