

УДК 544.72:547.835

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПРОФЛАВИНОМ НА ПОВЕРХНОСТИ КРЕМНЕЗЕМА

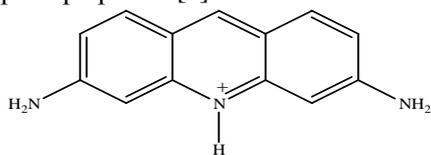
Н.Н. Власова*, Л.П. Головкова, Н.Г. Стукалина

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина*

Изучена адсорбция адениновых нуклеотидов из водных растворов на поверхности кремнезема, адсорбционно модифицированного профлавином, в зависимости от pH и концентрации адсорбата. Показано, что анионы нуклеотидов взаимодействуют с профлавином, который связан с нейтральной силанольной группой кремнезема водородными связями. Рассчитаны константы равновесия реакций комплексообразования между различными анионами нуклеотидов и профлавином, закрепленным на поверхности кремнезема. Высказано предположение, что при адсорбции нуклеотидов возможно не только взаимодействие между ароматическими кольцами профлавина и аденина, но и дополнительное электростатическое связывание анионов фосфорной кислоты с протонированными атомами азота профлавина.

ВВЕДЕНИЕ

Аминопроизводные акридина обладают антимикробными и противовирусными свойствами [1]. Еще в начале прошлого века они нашли широкое применение в качестве бактерицидных средств. Проведенные в то время исследования показали, что антибактериальная активность акридинов повышается при увеличении степени их катионной ионизации: акридины, которые при физиологических значениях pH оставались протонированными, оказались более активными по отношению к бактериям. Одним из наиболее активных оказался профлавин, токсичный по отношению ко многим грамположительным и грамотрицательным бактериям, но безопасный для тканей человека. Профлавин – диаминозамещенный акридин, который представляет собой гетероциклическое соединение, в его антраценовом цикле один из атомов углерода замещен на атом азота. При введении двух аминогрупп в молекулу акридина его основность существенно повышается: для акридина константа протонирования составляет $\lg K = 5,7$, для профлавина соответственно 9,5 [1]. При этом основность аминогрупп значительно меньше, они протонируются только в кислых растворах при $\text{pH} < 2$ [2].



Профлавин (PFH⁺)

Наличие протонированной формы при физиологическом значении pH являлось первым необходимым условием антибактериального действия акридинов. Вторым условием было плоское строение молекулы, вследствие чего акридины способны взаимодействовать с молекулами ДНК за счет интеркаляции между двумя слоями пар нуклеиновых оснований. При этом первичные аминогруппы профлавина образуют ионные связи с остатками фосфорной кислоты, а плоский скелет акридинового кольца удерживается на молекулах пурина и пиримидина ван-дер-ваальсовыми силами. Необходимость большой плоской поверхности и высокой степени ионизации молекул, которые проявляют антибактериальную активность, вероятно, и объясняет образование таких структур. Возникает вопрос, сохраняется ли способность профлавина взаимодействовать с нуклеотидами при закреплении его на поверхности твердого тела, например, кремнезема? Известно, что нуклеиновые основания и их нуклеотиды практически не адсорбируются на поверхности кремнезема из водных растворов [3]. Возможно, путем адсорбционного закрепления профлавина на поверхности кремнезема будет создан адсорбент, который способен сорбировать нуклеотиды или даже проявлять селективность по отношению к разным по природе компонентам нуклеиновых кислот.

* контактный автор natalie.vlasova@gmail.com

Целью работы было исследование адсорбции из водных растворов адениновых нуклеотидов на поверхности кремнезема, адсорбционно модифицированного профлавином.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы высокодисперсный аморфный кремнезем А-300 (удельная поверхность $300 \pm 20 \text{ м}^2/\text{г}$, Калуш, Украина), профлавин (3,6-диаминоакридин гемисульфат гидрат, "чда", Fluka, Швейцария), аденозин-5'-монофосфат (АМР), аденозин-5'-дифосфат (АДР), аденозин-5'-трифосфат (АТР), в виде натриевых солей ("хч" Reanal, Венгрия), стандарттитры NaOH и HCl (Titrisol, Merck, Германия), хлорид натрия ("хч", Merck, Германия).

Адсорбция профлавина была исследована в статических условиях при $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Растворы профлавина и их смеси с кремнеземом были приготовлены и хранились в полиэтиленовых пробирках. Ранее было установлено, что на поверхности полиэтилена наблюдается наименьшее осаждение профлавина из водных растворов [4]. Для изучения зависимости адсорбции от pH были приготовлены серии суспензий с различными значениями pH в интервале от 2 до 8, содержащие 2 г/л кремнезема, 50 мкмоль/л адсорбата и различные концентрации NaCl (0,01; 0,05 и 0,1 М). Доводили pH (иономер ЭВ-74, Беларусь) до необходимых значений добавлением кислоты или щелочи, при перемешивании выдерживали суспензии в течение 1 ч. Концентрации профлавина в равновесных растворах после отделения кремнезема центрифугированием (8000 об/мин, 20 мин) определяли спектрофотометрически (Спекорд М-40, Германия). Предварительно была исследована зависимость интенсивности и положения полос поглощения профлавина от pH и концентрации. В спектре поглощения профлавина наблюдается две полосы: в УФ-области при 261 нм (молярный коэффициент экстинкции $\epsilon = 54500 \text{ л/моль}\cdot\text{см}$) и в видимой области спектра при 444–445 нм ($\epsilon = 38600 \text{ л/моль}\cdot\text{см}$). Величины адсорбции профлавина рассчитывали по разности исходной и равновесной концентраций.

Адсорбционное модифицирование поверхности кремнезема проводили следующим образом: к 450 мл раствора профлавина (3 ммоль/л) добавляли 20 г кремнезема и доводили pH суспензии до 7,2. После перемешивания через 2 ч отделяли кремнезем центрифугированием, твердый остаток несколько раз промывали водой. Концентрацию адсорбированного профлавина

определяли спектрофотометрически двумя способами: по разности исходной и равновесной концентраций (с учетом всех промывных вод); и по концентрации профлавина, смытого с поверхности кремнезема в кислый водный раствор с pH 2. Полученные образцы содержали от 58 до 64 мкмоль профлавина на 1 г кремнезема.

Адсорбцию адениновых нуклеотидов проводили в статических условиях в зависимости от концентрации адсорбата (изотермы адсорбции) и от pH. Растворы нуклеотидов с концентрациями от 20 до 200 мкмоль/л (по 10 мл) добавляли к навескам кремнезема (0,2 г) и устанавливали необходимое значение pH раствора. Суспензии перемешивали (1 ч) и отделяли кремнезем. В равновесных растворах определяли концентрации "смытого" профлавина по полосе поглощения в видимой области, а потом рассчитывали интенсивность поглощения профлавина в УФ-области при длине волны, которая соответствует максимуму поглощения адсорбата (261 нм). Полосы поглощения адениновых нуклеотидов и профлавина в УФ-области перекрываются. Вычитая интенсивность поглощения профлавина из суммарного спектра поглощения, были рассчитаны равновесные концентрации нуклеотидов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены результаты исследования адсорбции профлавина.

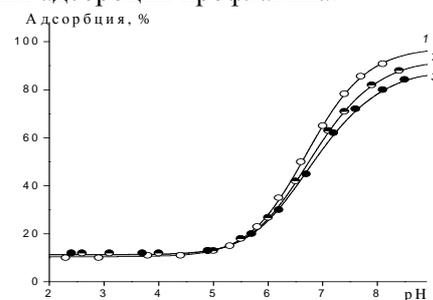


Рис. 1. Адсорбция профлавина на поверхности кремнезема (2 г/л) из водных растворов NaCl: 0,01 (1), 0,05 (2) и 0,1 М (3). Символы – экспериментальные значения адсорбции, линии – рассчитанные адсорбционные кривые

Видно, что величины адсорбции зависят от pH и практически не зависят от ионной силы в интервале pH от 2 до 5. Это позволило предположить, что катионы профлавина (а их концентрация составляет почти 100 % до pH 9) взаимодействуют с недиссоциированными силанольными группами. При повышении pH влияние ионной силы проявляется в уменьшении адсорбции профлавина при одном и том же значе-

нии рН. Возможно, катионы профлавина конкурируют с ионами натрия за ионизированные силанольные группы поверхности. При этом катионы профлавина, вероятно, размещаются в том же адсорбционном слое, что и катионы фонового электролита, т.е. образуют внешне-сферные поверхностные комплексы. Для количественной оценки адсорбционных данных была использована модель поверхностного комплексообразования Штерна [5] и программа GRFIT [6]. Профлавин, как и большинство аминокислот, склонен к самоассоциации, константа образования димеров, K , составляет 500 [7]. Расчет содержания димеров для концентрации профлавина 50 мкмоль/л показал, что их доля не превышает 5 %, а потому возможные реакции комплексообразования на поверхности с участием димеров не были приняты во внимание при моделировании адсорбционных кривых.

Адсорбционные кривые были использованы для расчета констант равновесия следующих реакций:



$$K_1^{\text{int}} = \frac{[\text{SiOH} \cdots \text{HPF}^+]}{[\text{SiOH}][\text{HPF}^+]} \exp(F\Psi_\beta / RT),$$

$$\lg K_1^{\text{int}} = 2,15 \pm 0,06$$



$$K_2^{\text{int}} = \frac{[\text{SiO}^- \text{HPF}^+][\text{H}^+]}{[\text{SiOH}][\text{HPF}^+]} \exp(F(\Psi_\beta - \Psi_0) / RT),$$

$$\lg K_2^{\text{int}} = -3,60 \pm 0,05.$$

Подбор констант равновесия реакций комплексообразования выполняется таким образом, чтобы рассчитанные адсорбционные кривые как можно лучше совпадали с экспериментальными зависимостями адсорбции от рН. Поверхностные комплексы, образовавшиеся в соответствии с ур. (1), формируются за счет водородных связей, в то время как образование комплексов по реакции (2) происходит за счет электростатического взаимодействия. Если учесть константу диссоциации силанольных групп [8] в ур. (2), то можно получить константу устойчивости комплекса $\text{SiO}^- \text{PFH}^+$, $\lg K = 3,90 \pm 0,05$. Сравнение констант устойчивости комплексов с нейтральными и ионизированными силанольными группами показывает, что электростатические комплексы прочнее. Рассчитанные константы равно-

весия реакций комплексообразования позволяют определить состав поверхностного слоя для различных исходных концентраций профлавина. На рис. 2 представлена диаграмма распределения поверхностных комплексов в зависимости от рН, рассчитанная для концентрации профлавина 64 мкмоль/г. Комплексы обоих типов образованы катионами профлавина. Это подтверждается спектрофотометрически: в спектрах поглощения профлавина, адсорбированного на поверхности кремнезема, наблюдаются полосы, характерные для его катионной формы.

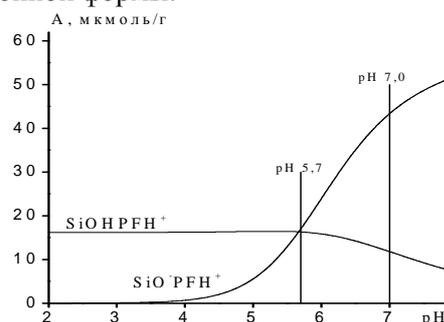
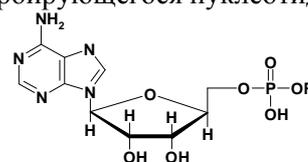


Рис. 2. Диаграмма распределения поверхностных комплексов профлавина (общая концентрация профлавина 64 мкмоль/г, концентрация кремнезема 20 г/л)

При добавлении растворов нуклеотидов к профлавинсодержащим образцам кремнезема было замечено, что часть профлавина переходит в водную фазу, при этом доля "смываемого" профлавина практически одинакова для всех концентраций адсорбатов и не зависит от природы адсорбирующегося нуклеотида.



$\text{R}=\text{H}$ – аденозин-5'-монофосфат,

$\text{R}=\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ – аденозин-5'-дифосфат,

$\text{R}=\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ – аденозин-5'-трифосфат.

Это свидетельствует о том, что взаимодействие профлавина и адениновых нуклеотидов в водном растворе не очень сильное. Действительно, спектры поглощения профлавина в видимой области спектра изменяются лишь при добавлении нуклеотидов в концентрациях, которые превышают концентрацию профлавина в 500–1000 раз. Максимум поглощения профлавина смещается при этом bathochromно, а интенсивность полосы поглощения увеличивается.

На рис. 3 приведены спектральные изменения, которые наблюдаются в спектре профлавина при увеличении концентрации АМР. Эти данные были использованы для расчета константы устойчивости комплекса профлавино-нуклеотид по уравнению Кетелара [9]

$$\frac{1}{\varepsilon_a - \varepsilon_A} = \frac{1}{KC_D(\varepsilon_{DA} - \varepsilon_A)} + \frac{1}{\varepsilon_{DA} - \varepsilon_A},$$

где ε_a – "кажущийся" коэффициент поглощения, который определяется как оптическая плотность, деленная на исходную концентрацию вещества А (профлавин) и толщину кюветы; C_D – концентрация нуклеотида; ε_A , ε_{DA} – коэффициенты поглощения вещества А и его комплекса DA при одной длине волны соответственно. Условием "правильности" выполненного расчета является пересечение в одной точке на оси абсцисс нескольких прямых, построенных для разных длин волн в координатах $(1/\varepsilon_a - \varepsilon_A) = f(1/C_D)$. Таким образом, была рассчитана константа устойчивости комплекса профлавина с АМР ($\lg K = 2,2$) и коэффициент молярного поглощения комплекса $\varepsilon = 39700$ при длине волны 454 нм (максимум поглощения комплекса).

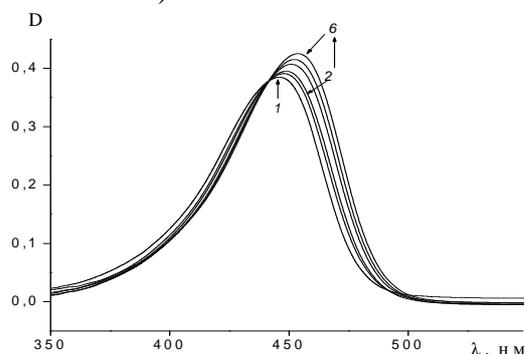


Рис. 3. Спектры поглощения профлавина (1) (10 мкмоль/л) в зависимости от концентрации АМР: 0,5 (2); 2,5 (3); 12,5 (4); 25 (5) и 50 (6) мМ, $l = 1$ см

Константы устойчивости комплексов профлавина с ди- и трифосфатом, по-видимому, примерно такие же по величине. Об этом свидетельствуют аналогичные изменения в спектре поглощения профлавина в присутствии аденозинди- и трифосфатов.

Изотермы адсорбции адениновых нуклеотидов при рН 5,7 и 7,0 представлены на рис. 4, из которого видно, что нуклеотиды по величинам адсорбции располагаются в ряд АТР > АДР > АМР, однако для всех нуклеотидов величины адсорбции очень незначительны.

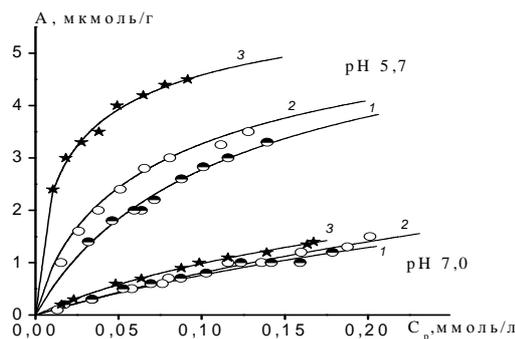
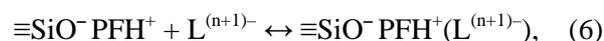
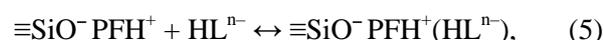
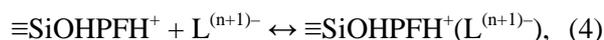
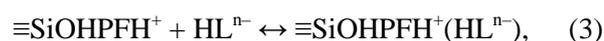


Рис. 4. Изотермы адсорбции АМР (1), АДР (2) и АТР (3) на поверхности кремнезема, модифицированного профлавином, при рН 5,7 и 7

Для того чтобы количественно оценить прочность связывания нуклеотидов с профлавином на поверхности кремнезема, необходимо выяснить, в каких формах присутствуют эти соединения в растворе. Все нуклеотиды подвергаются в растворе нескольким протолитическим реакциям: центрами связывания протонов являются атом азота аденинового кольца N-3 и остатки фосфорной, пирофосфорной и трифосфорной кислот соответственно. В интервале рН от 4 и 8 для аденозинмонофосфата в равновесии находятся два аниона HAMP^- и AMP^{2-} ; для аденозиндифосфата – анионы HADP^{2-} и ADP^{3-} ; для аденозинтрифосфата – HATP^{3-} и ATP^{4-} . Нами была рассмотрена возможность взаимодействия обоих анионов, которые присутствуют в растворе, с обоими комплексами профлавина на поверхности кремнезема в соответствии со следующими реакциями:



где HL^{n-} и $\text{L}^{(n+1)-}$ – анионы нуклеотидов с одним протоном и полностью депротонированные соответственно. При количественной интерпретации экспериментальных данных с использованием модели комплексообразования Штерна и программы GRFIT оказалось, что невозможно сделать однозначный выбор из 4 возможных реакций. С одной стороны, меньшие величины адсорбции нуклеотидов при рН 7, чем при рН 5,7, указывают на то, что связывание нуклеотидов определяется взаимодействием с профлавином, присутствующим на поверхности в виде комплекса с

нейтральной силанольной группой. Если бы нуклеотиды взаимодействовали с профлавином, связанным с ионизированной силанольной группой, то величины адсорбции при рН 7 должны были бы быть выше, поскольку концентрация такого комплекса повышается при увеличении рН. С другой стороны, большие величины адсорбции при рН 5,7 свидетельствуют об участии в комплексообразовании протонированных анионов нуклеотидов, так как концентрация протонированных анионов гораздо больше при рН 5,7, чем при рН 7 (рис. 5).

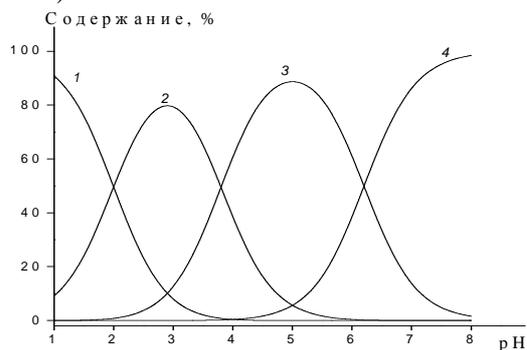


Рис.5. Диаграмма распределения форм аденозинмонофосфата в водном растворе в зависимости от рН: H_3AMP^+ (1), H_2AMP^\pm (2), $НАМР^-$ (3) и AMP^{2-} (4)

Были проведены исследования зависимости адсорбции нуклеотидов от рН, по которым и были окончательно выбраны реакции комплексообразования между различными анионами нуклеотидов и профлавином на поверхности кремнезема, а также рассчитаны константы устойчивости соответствующих поверхностных комплексов (рис. 6). Наилучшее соответствие между экспериментальными и рассчитанными адсорбционными кривыми было получено в предположении, что оба аниона нуклеотида образуют комплексы с профлавином, который связан с нейтральными силанольными группами водородными связями (реакции 3 и 4). Константы связывания нуклеотидов с профлавином на поверхности кремнезема представлены в таблице.

Таблица. Константы связывания анионов нуклеотидов с профлавином на поверхности кремнезема ($lgK \pm 0,05$)

Реакция на поверхности	AMP	ADP	ATP
$\equiv SiOHPFH^+ + HL^{n-} \leftrightarrow$	3,83	4,50	5,42
$\equiv SiOHPFH^+(HL^{n-})$			
$\equiv SiOHPFH^+ + L^{(n+1)-} \leftrightarrow$	5,05	5,65	6,35
$\equiv SiOHPFH^+(L^{(n+1)-})$			

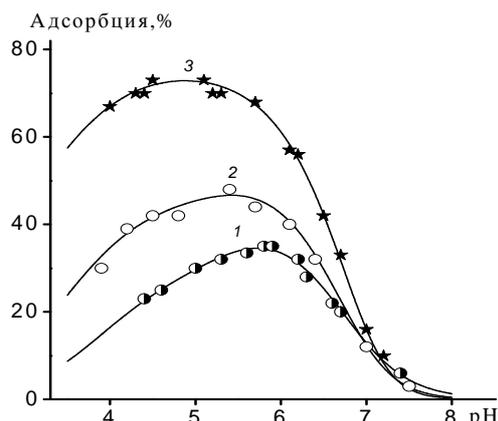


Рис. 6. Зависимость адсорбции AMP (1), ADP (2) и ATP (3) от рН. (Символами обозначены экспериментальные, а линиями – рассчитанные адсорбционные кривые)

Сравнение констант связывания показывает, что полностью депротонированные анионы всех нуклеотидов образуют более прочные комплексы с профлавином, чем протонированные анионы. Чем длиннее фосфатная цепь, тем более устойчивые комплексы образуются, т.е. трифосфат-анионы наиболее прочно связываются с профлавином на поверхности кремнезема. Пуриновое кольцо всех нуклеотидов может взаимодействовать с акридиновым кольцом профлавина (стэкинг-взаимодействие), а фосфатные остатки могут образовывать ионные связи с протонированными атомами азота гетероцикла или водородные связи с первичными аминогруппами профлавина.

Изотермы адсорбции нуклеотидов при двух значениях рН были рассчитаны с использованием полученных констант связывания обоих анионов. На рис. 4 эти рассчитанные адсорбционные кривые представлены линиями. Как видно, соответствие этих кривых с экспериментальными довольно хорошее, что подтверждает правильность выбора реакций, протекающих на поверхности между адсорбированным профлавином и нуклеотидами.

ВЫВОДЫ

Таким образом, модифицирование поверхности кремнезема молекулами профлавина приводит к адсорбции на его поверхности нуклеотидов. Недостатком такого модифицирования является образование 2 типов комплексов профлавина, средство которых по отношению к нуклеотидам, по-видимому, отли-

чается. Проведение адсорбции нуклеотидов из растворов с величиной рН, при которой на поверхности преобладает комплекс профлавина, связанного с силанольными группами посредством водородных связей, позволяет достичь большей степени извлечения нуклеотидов из растворов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Альберт А. Избирательная токсичность. – Т. 2. – Москва: Медицина, 1989. – 432 с.
2. Schulman S.G., Naik D.V., Carotacchia A.C. *et al.* Electronic spectra and electronic structures of antimicrobials derived from proflavine // J. Pharm. Sci. – 1975. – V. 64, N 6. – P. 982–986.
3. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / под ред. А.А. Чуйко. – Киев: Наукова думка, 2003. – 414 с.
4. Lamm M.E., Neville D.M., Jr. The dimer spectrum of acridine orange hydrochloride // J. Phys. Chem. – 1965. – V. 69. – P. 3872–3877.
5. Westall J.C., Hohl H. A comparison of electrostatic models for the oxide/solution interface // Adv. Colloid Interface Sci. – 1980. – V. 12. – P. 265–294.
6. Ludwig Chr. GRFIT, a Program for Solving Speciation Problems, Evaluation of Equilibrium Constants, Concentrations, and Other Physical Parameters: Internal Report. – Bern: University of Bern, 1992.
7. Haugen G.R., Melhuish W.H. Self-association of proflavine // Trans. Faraday Soc. – 1964. – V. 60. – P. 386–394.
8. Власова Н.Н., Головкова Л.П. Адсорбция аминокислот на поверхности высокодисперсного кремнезема // Коллоид. журн. – 2004. – Т. 66, № 6. – С. 733–738.
9. Свердлова О.В. Электронные спектры в органической химии. – Ленинград: Химия, 1985. – 248 с.

Поступила 30.05.2011, принята 06.06.2011

Взаємодія компонентів нуклеїнових кислот з профлавіном на поверхні кремнезему

Н.М. Власова, Л.П. Головкова, Н.Г. Стукаліна

Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, natalie.vlasova@gmail.com

Досліджено адсорбцію аденінових нуклеотидів з водних розчинів на поверхні кремнезему, адсорбційно модифікованого профлавіном, в залежності від рН та концентрації адсорбатів. Встановлено, що аніони нуклеотидів взаємодіють з профлавіном, який зв'язаний з нейтральними силанольними групами водневими зв'язками. Розраховано константи рівноваги реакції комплексоутворення між аніонами нуклеотидів та профлавіном. Припущено, що при адсорбції нуклеотидів можлива не лише взаємодія між ароматичними циклами аденіну та профлавіну, але й додаткова електростатична взаємодія між фосфатними залишками та протонуваним атомом нітрогену профлавіну.

Interaction of nucleic acid components with proflavine on silica surface

N.N. Vlasova, L.P. Golovkova, N.G. Stukalina

Chuiiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, natalie.vlasova@gmail.com

The adsorption of adenine nucleotides from aqueous solution onto silica modified with proflavine as functions of pH and adsorbate concentration has been studied. Nucleotide anions interact with proflavine bound with neutral surface silanol group by hydrogen bonds. The equilibrium reaction constants of complex formation between nucleotide anions and proflavine have been calculated. It has been assumed that, interaction between aromatic rings of adenine and proflavine as well as additional electrostatic interaction between phosphate anions and protonated nitrogen atom of proflavine are possible at the nucleotide adsorption.