

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 8, № 3
2023**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 8, № 3
2023**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 8, No. 3, 2023**

Севастополь
2023

КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА (III) С КАТЕХИНОМ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ДНК

Касьяненко Н.А., Ролич В.И., Никитин Д.А.

Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7-9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: st075754@student.spbu.ru

Поступила в редакцию 21.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0619

Аннотация. Современные препараты для лечения онкозаболеваний обладают повышенной токсичностью для организма. Также известны случаи, когда клетки опухолей проявляют резистентность к определённым классам препаратов. Поэтому поиск и исследование новых соединений, обладающих противоопухолевыми свойствами, остаётся актуальной задачей. В последние годы возник интерес к антиоксидантной и противоопухолевой активности катехинов, которые относятся к растительным флавоноидам, а потому их применение в терапии, а также их совместное использование с более токсичными соединениями может снизить негативное воздействие лечения на организм в целом. Обычно противоопухолевая активность определяется возможностью связывания соединений с ДНК. В работе проводится изучение взаимодействия ДНК с катехином в растворе, а также рассматривается влияние на ДНК одновременного введения в раствор катехина и ионов железа. Показано, что молекулы катехина с ДНК не взаимодействуют, тогда как присутствие ионов железа способствует формированию комплексов ДНК-катехин-железо, в которых, как ожидается, катехин сможет проявить свою биологическую активность. При достаточно больших концентрациях хлорида железа в растворах катехина образуются дискретные наночастицы. Использовали методы УФ-спектрофотометрии, низкоградиентной вискозиметрии, динамического рассеяния света и атомной силовой микроскопии.

Ключевые слова: (+)-катехин, ДНК, ионы железа (III), комплексы ДНК-катехин-ионы железа.

В настоящее время одним из наиболее широко используемых методов в терапии различного рода патологий является комбинированное использование различных препаратов и биологических добавок для снижения негативных последствий для организма от приёма активного вещества. При этом важную роль продолжает играть и синтез новых веществ, но он требует намного больших ресурсов и временных затрат. Крайне важным является выявление механизмов совместного действия различных агентов *in vivo*. Для этого используют модельные системы (*in vitro*) – растворы, содержащие основной объект терапии (для онкологических заболеваний это обычно молекула ДНК) и компоненты терапевтического композита, исследование которых позволяет получить информацию о молекулярных основах действия различных веществ.

Большой интерес вызывает использование флавоноидов, который имеют растительное происхождение. Они содержатся в чае, кофе, некоторых ягодах и фруктах. Это гарантируют низкую токсичность и частичное или полное отсутствие побочных эффектов при их использовании в медицине. В частности, катехины показывают антиоксидантные свойства и обладают высокой биологической активностью, что определяет их использование при лечении заболеваний бактериального и вирусного происхождения [1]. Существуют данные, что катехины защищают ДНК от поражающего действия активных форм кислорода, что снижает риск развития онкологических заболеваний. Кроме того, катехины способны влиять на активность гена p53, что стимулирует гибель клеток опухолей [2]. Усиление биологической активности катехинов, в связи с этим стало одной из актуальных задач в последнее время. Так, например существуют данные, что совместное действие катехинов с ионами трёхвалентного железа усиливает терапевтические свойства катехинов [3]. В работе была проверена возможность формирования трёхкомпонентного комплекса ДНК-ионы железа (III)-катехин.

Для приготовления исследуемых систем использовали соль хлорида железа (III), (+)-катехин и натриевую соль высокомолекулярной тимусной ДНК (препараты фирмы Sigma Aldrich). Все растворы содержали 0,005 М NaCl для стандартизации ионных условий (изменяющаяся концентрация собственных противоионов ДНК в этих условиях не вносит заметного вклада в ионную силу раствора). Использовали спектрофотометр СФ-56 (Россия), низкоградиентный ротационный вискозиметр оригинальной конструкции, принципиальная схема которого приведена в работе [4], установку для изучения динамического рассеяния света PhotoCor с программным обеспечением DynaLS, атомный силовой микроскоп Nanoscope IV Bruker.

На первом этапе исследования были изучены попарные взаимодействия компонентов. Различными методами было показано, что свободные катехины с молекулой ДНК в растворе не взаимодействуют. Ни вязкость растворов ДНК, ни спектр поглощения макромолекулы не меняются. При изучении взаимодействия ионов трёхвалентного железа с катехином методов УФ спектрофотометрии было показано, что спектр поглощения катехина в 0,005 М NaCl немного изменяется с ростом концентрации FeCl₃ (концентрация катехина в этом опыте оставалась постоянной), что указывает на формирование комплексов.

Согласно данным работы [5], взаимодействие катехинов с ионами железа в водном растворе приводит к образованию наночастиц. При этом необходимо использовать существенно большие концентрации компонентов, чем были приготовлены при изучении спектральных свойств катехина в растворах, содержащих соль железа. Для проверки возможности формирования наночастиц катехин-железо в наших экспериментах использовали метод динамического светорассеяния, который позволяет получить информацию о размерах частиц и в молекулярных,

и в коллоидных растворах. Иными словами, фазовое разделение в растворе при формировании наночастиц не мешает корректной оценке распределения частиц по размерам.

Были приготовлены растворы 0,005 М NaCl, содержащие 5×10^{-5} М катехина и различные концентрации FeCl_3 в диапазоне от 3×10^{-3} до 6×10^{-2} М. На рисунке 2 для примера приведено распределение частиц по размерам в растворе, содержащем 0,005 М NaCl, 5×10^{-5} М катехина и 3×10^{-2} М FeCl_3 , полученное при угле рассеяния 60° . Бимодальное распределение сохранялось в широком диапазоне концентраций FeCl_3 для всех углов рассеяния. Две моды в распределениях с учетом усреднения по всем углам и по всем используемым концентрациям соли железа соответствуют частицам с гидродинамическим радиусом (35 ± 10) нм и (180 ± 50) нм.

Те же растворы использовали для анализа изображений, полученных методом атомной силовой микроскопии. Для приготовления образцов каплю соответствующего раствора наносили на поверхность свежесколотой слюды и высушивали. Затем методом прямого сканирования на воздухе были получены изображения, одно из которых приведено на рисунке 3.

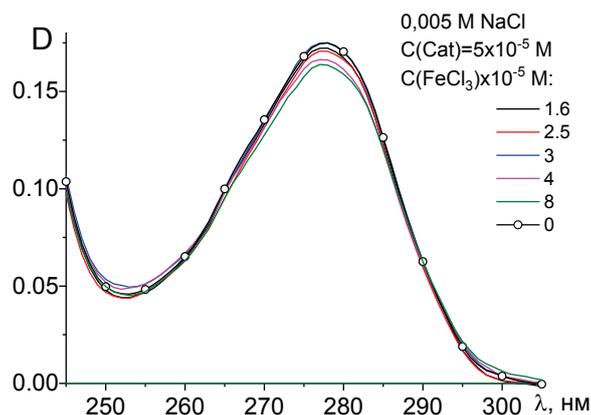


Рисунок 1. Спектры поглощения катехина в растворах, содержащих 0,005 М NaCl и разные концентрации FeCl_3 (концентрации указаны на рисунке). Спектры скорректированы с учетом вклада соли железа в оптическую плотность растворов

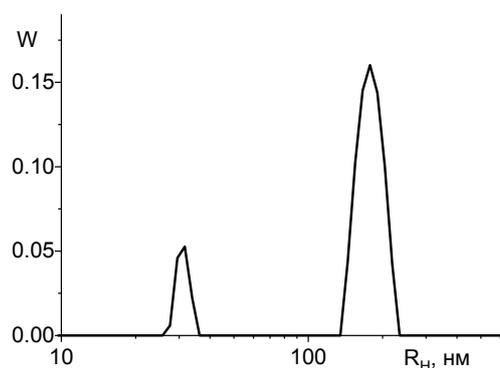


Рисунок 2. Пример распределения частиц по размерам в растворах, содержащих 0,005 М NaCl, 5×10^{-5} М катехина и 3×10^{-2} М FeCl_3 . Угол рассеяния – 60°

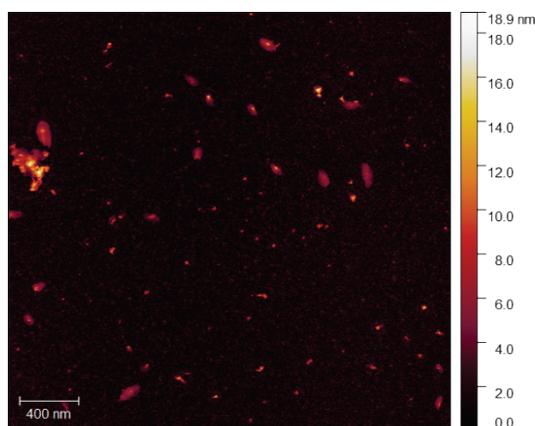


Рисунок 3. Изображение, полученные при помощи АСМ для раствора FeCl_3 с катехином в 0,005 М NaCl

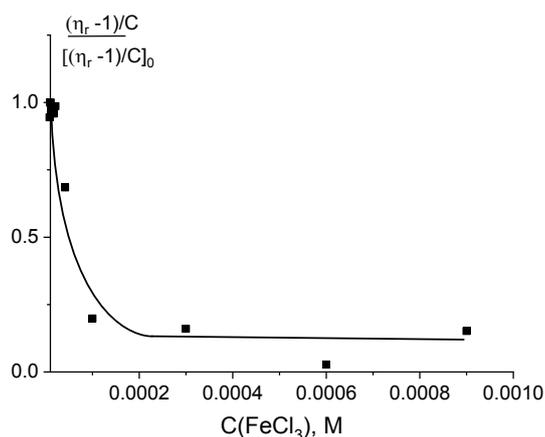


Рисунок 4. Зависимость относительного изменения приведённой вязкости растворов ДНК от концентрации FeCl_3 в растворе. $C(\text{ДНК})=0,0066\%$

Анализ рисунка 3 показывает, что на подложке присутствуют малые плотные частицы размером порядка 40–60 нм и более рыхлые частицы размером чуть ниже 200 нм, что в целом согласуется с данными, полученными методом динамического рассеяния света.

Анализируя на основании полученных данных взаимодействие катехина с ионами железа в растворе, можно заключить, что формирование комплексов идет во всех используемых растворах. При больших концентрациях соли железа в растворах формируются дискретные наночастицы. Ранее было показано, что ионы различных металлов увеличивают антиоксидантную активность катехинов, которая оставалась высокой и постоянной при pH 6–12, но снижалась в кислых и сильнощелочных растворах [6]. Это указывает на формирование комплексов катехинов с ионами металлов.

Рассмотрим результат взаимодействия молекулы ДНК с ионами железа в растворе. Такое взаимодействие подробно изучалось ранее [7]. Для используемых растворов методом вискозиметрии было показано, что взаимодействие ДНК с ионами железа в растворе 0,005 М NaCl приводит к уменьшению объема её молекулярного клубка, а при достаточно больших концентрациях ионов железа – к компактизации макромолекулы и выпадению ДНК в осадок. Это следует из зависимости приведённой вязкости растворов ДНК от концентрации хлорида железа (III) в растворе. Объем молекулярного клубка ДНК достигает своего минимального значения при концентрации ионов $[\text{Fe}^{3+}] = 10^{-4}$ М. В наших экспериментах при рассмотрении взаимодействия катехина с ДНК в присутствии ионов железа мы использовали концентрацию $[\text{Fe}^{3+}] = 5 \times 10^{-5}$ М, когда компактизация макромолекулы уже наблюдается, но раствор остается молекулярным и появления и не происходит конденсации ДНК.

О компактизации молекулы ДНК в присутствии ионов железа говорят и данные динамического светорассеяния (рис. 5).

Полученные для растворов ДНК функции распределения частиц по размерам бимодальны. На основе расчёта радиуса инерции невозмущенной молекулы ДНК известной молекулярной массы (в эксперименте $M = 12 \times 10^6$ г/моль была определена вискозиметрически) было принято решение медленную моду считать ответственной за поступательное движение молекулярного клубка и использовать ее для оценки

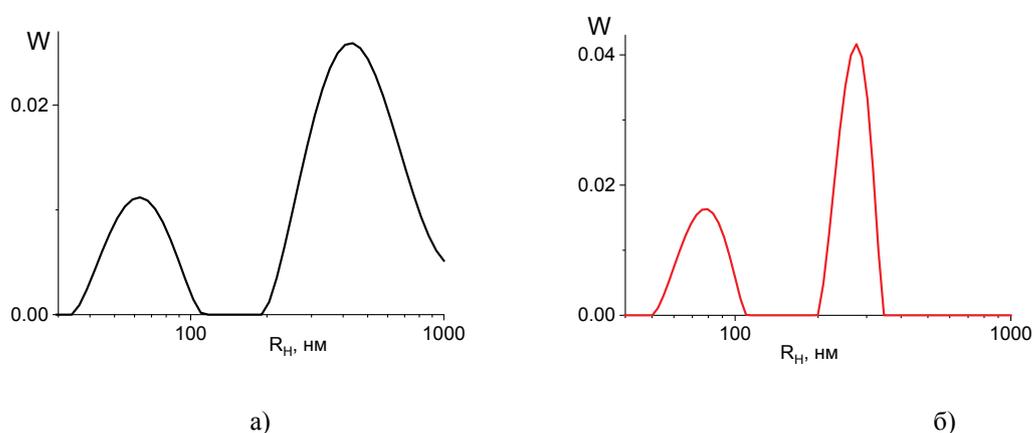


Рисунок 5. Распределение частиц по размерам в растворах свободной ДНК (а) и ДНК в комплексах с ионами железа (б), $C(\text{DNA}) = 0,006\%$, $C(\text{FeCl}_3) = 50 \mu\text{M}$. Угол рассеяния 60°

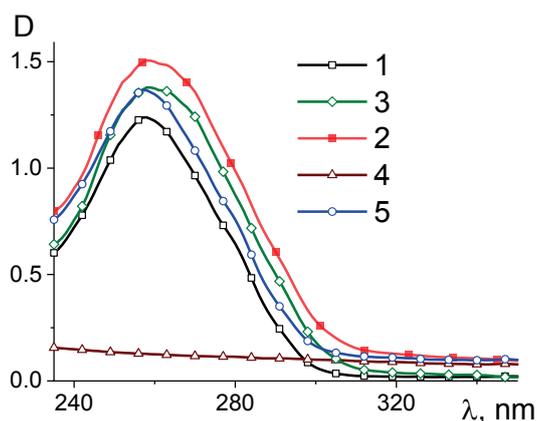


Рисунок 6. Спектры поглощения ДНК (1), комплекса ДНК с ионами железа (2), вычисленный спектр поглощения ДНК в комплексе с учетом оптической плотности раствора хлорида железа (3), оптическая плотность раствора хлорида железа используемой концентрации (4), сумма спектров поглощения ДНК и раствора хлорида железа (5)

гидродинамического радиуса макромолекулы. Таким образом, данные динамического рассеяния света показывают, что гидродинамический радиус клубка ДНК уменьшается с (430 ± 90) нм до (280 ± 50) нм, что согласуется с данными вискозиметрии.

Связывание ионов железа с молекулой ДНК фиксируется и по изменению спектра поглощения ДНК (рис. 6).

Перейдём к рассмотрению взаимодействия ДНК с катехином и ионами железа при их совместном добавлении в раствор ДНК. Были приготовлены растворы с одной и той же концентрацией ДНК (0,006%), катехина (50 μ M) и хлорида железа (50 μ M). Спектры поглощения полученных растворов при разном порядке смешивания компонентов, а также вычисленные спектры поглощения ДНК в этих растворах, представлены на рисунке 7. На рисунке введены обозначения: спектры поглощения растворов, содержащих только ДНК, только катехин и только соль железа в 0,005 M NaCl обозначены как DNA, Cat и Fe соответственно; спектр поглощения смеси катехина и соли железа обозначен как Cat+Fe, спектры поглощения тройных комплексов обозначены (DNA+Cat)+Fe, (DNA+Fe)+Cat при введении в раствор ДНК сначала катехина, а потом Fe³⁺ и наоборот. Предварительное смешивание растворов катехина и FeCl₃ с последующим соединением смеси с раствором ДНК обозначено как (Fe+Cat)+DNA.

Спектры поглощения ДНК в трёхкомпонентных системах отличаются как от спектра поглощения свободной ДНК, так и от спектра поглощения ДНК в комплексах с ионами железа (при добавлении катехина в раствор ДНК ее спектр не меняется, так как взаимодействие компонентов отсутствует). При добавлении ДНК к раствору, содержащему комплексы катехина с ионами железа, спектр поглощения ДНК совпадает со спектром поглощения ДНК в комплексах с железом, что говорит о связывании ДНК с ионами железа в представленной системе. Если сравнить результат разного порядка смешивания, то можно однозначно сказать, что присутствие катехина влияет на спектральные свойства систем. Иными словами, формируются комплексы ДНК-Fe-Cat.

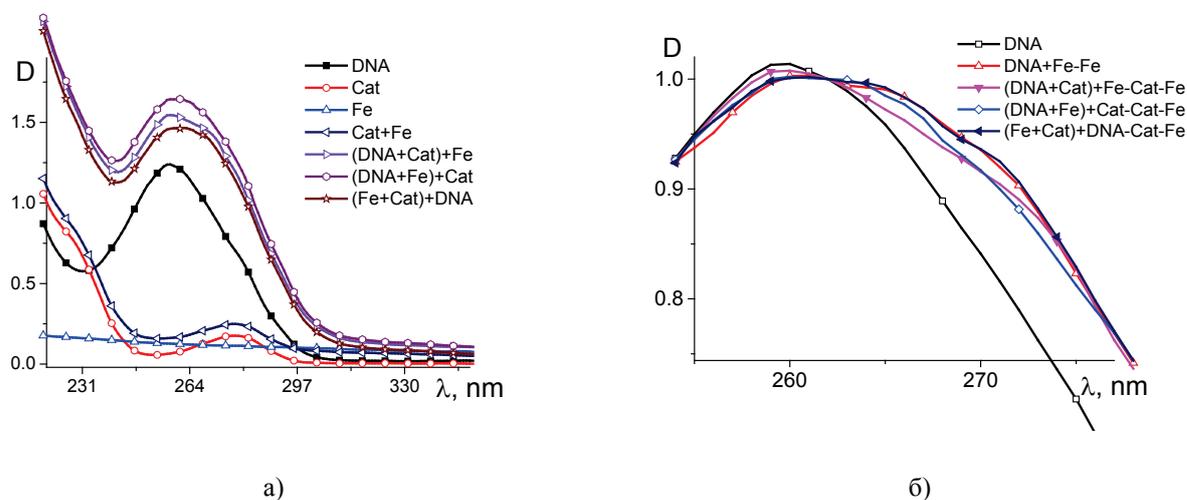


Рисунок 7. Спектры поглощения растворов в 0,005 M NaCl (а) и вычисленные нормированные спектры поглощения ДНК в этих растворах (б). Пояснения в тексте

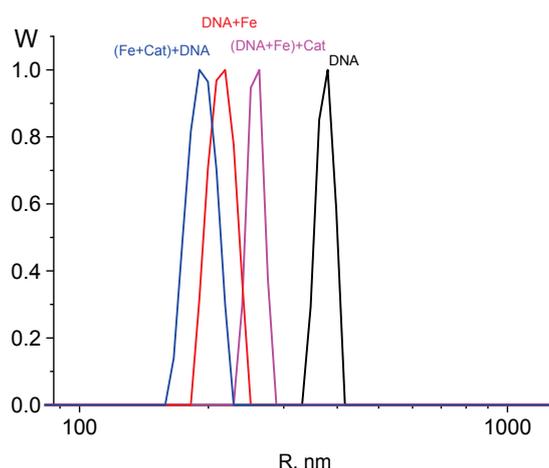


Рисунок 8. Распределение частиц по размерам в трёхкомпонентных растворах, полученное методом динамического светорассеяния. Угол рассеяния 60°

Таблица 1. Значение приведенной вязкости растворов ДНК, содержащих катехин и ионы железа при разном порядке их добавления. Обозначения – как на рисунках 7 и 8

Раствор	$\eta_{пр}$, дл/г
DNA	110 ± 8
DNA+Cat	115 ± 9
DNA+Fe	50 ± 4
(DNA+Cat)+Fe	40 ± 7
(DNA+Fe)+Cat	35 ± 3
DNA+(Fe+Cat)	27 ± 2

Методом динамического рассеяния света были исследованы аналогичные системы с концентрацией катехина $25 \mu\text{M}$ (рис. 8). Хорошо видно, что положение главного пика распределения отражает изменение размера молекулярного клубка ДНК в комплексах. Этот результат демонстрирует, что формирование комплексов ДНК с катехином и ионами железа зависит от порядка добавления компонентов в раствор ДНК.

При этом во всех растворах присутствие ионов железа обеспечивает компактизацию ДНК. Данные низкоградиентной вискозиметрии согласуются с результатами, полученными при исследовании систем методом динамического светорассеяния. В таблице 1 указаны приведенные вязкости растворов трёхкомпонентных систем при разном порядке добавления компонентов в раствор ДНК.

Действительно, а основании изменения приведенной вязкости растворов ДНК можно заключить, что объём клубка ДНК в трёхкомпонентных системах уменьшается по сравнению с таковым для свободной ДНК.

На основе полученных результатов можно заключить, что при взаимодействии ионов трёхвалентного железа с катехинами в водном растворе при достаточно больших концентрациях соли железа образуются дискретные наночастицы. В растворах ДНК при добавлении катехина и ионов железа в концентрациях менее 10^{-4} М формируются комплексы ДНК-ионы железа-катехин. На формирование комплексов слабо влияет порядок добавления катехина и ионов железа в раствор ДНК. Взаимодействие ДНК с молекулами катехина в растворе происходит исключительно в присутствии ионов трёхвалентного железа.

Список литературы / References:

- Vinson J.A., Su X., Zubik L., Bose P. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, vol. 49, pp. 5315-5321, doi: 10.1021/jf0009293.
- Cadona F.C., Dantas R.F., de Mello G.H., Silva-Jr F.P. Natural products targeting into cancer hallmarks: An update on caffeine, theobromine, and (+)-catechin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, pp. 1-20, doi: 10.1080/10408398.2021.1913091.
- Manna M.S., Saha P., Ghoshal A.K. Iron complexation of pharmaceutical catechins through selective separation. *RSC Adv.*, 2014, vol. 4, 26247-26250, doi: 10.1039/c4ra03683b.
- Frisman E.V., Schagina L.V., Vorobiev V.I. A glass rotation viscometer. *Biorheology*, 1965, vol. 2, pp. 189-194.
- Wang Z., Fang C., Mallavarapu M. Characterization of iron-polyphenol complex nanoparticles synthesized by Sage (*Salvia officinalis*) leaves. *Environmental Technology & Innovation*, 2015, vol. 4, pp. 92-97, doi: 10.1016/j.eti.2015.05.004.

6. Kumamoto M., Sonda T., Nagayama K., Tabata M. Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 2001, vol. 65, pp. 126-132, doi: 10.1271/bbb.65.126.
7. Kasyanenko N., Arikainen N., Frisman E. Investigation of DNA complexes with iron ions in solution. *Biophysical Chemistry*, 1998, vol.70, pp. 93-100, doi: 10.1016/s0301-4622(97)00111-7.

COMPLEXES OF IRON (III) WITH CATECHIN AND THEIR INTERACTION WITH DNA

Nikitin D.A., Kasyanenko N.A., Rolich V.I.

Saint-Petersburg State University

Universitetskaya emb., 7-9, St. Petersburg, 199034, Russia; e-mail: st075754@student.spbu.ru

Received 21.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0619

Abstract. Modern anticancer drugs have increased toxicity to the human body. There are also cases when tumor cells show resistance to certain classes of drugs. Therefore, the search and study of new compounds with antitumor properties remains an urgent task. In recent years, interest has arisen in the antioxidant and antitumor activity of catechins, which belong to plant flavonoids, and therefore their use in therapy, as well as their combined use with more toxic compounds, can reduce the negative impact of treatment on the body as a whole. Typically, antitumor activity is determined by the ability of compounds to bind to DNA. The paper studies the interaction of DNA with catechin in solution, and also considers the effect DNA of the simultaneous introduction of catechin and iron ions into the solution on DNA conformation. It has been shown that catechin molecules do not interact with DNA, while the presence of iron ions promotes the formation of DNA-catechin-iron complexes, in which catechin is expected to be able to exhibit its biological activity. The discrete nanoparticles are formed at sufficiently high concentrations of Fe^{3+} ions in catechin solutions. The methods used were UV spectrophotometry, low-gradient viscometry, dynamic light scattering, and atomic force microscopy.

Key words: (+)-catechin, DNA, iron ions (III), DNA-iron ions-catechin complexes.