

СТАБИЛИЗАЦИЯ ДВУНИТЕВОГО POLY(A)·POLY(U) МЕТАЛЛОПОРФИРИНОМ ZnTMPyP4 В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

© 2020 г. А. Г. Кудрев*

Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб. 7–9, Санкт-Петербург, 190034 Россия
*e-mail: kudrevandrei@mail.ru

Поступило в Редакцию 20 июля 2020 г.

После доработки 7 августа 2020 г.

Принято к печати 14 августа 2020 г.

Проведен анализ УФ спектров поглощения водных растворов, содержащих одновременно металлопорфирин Zn(X)TMPyP4 [H₂ TMPyP4 – 5,10,15,20-тетракис(1-метилпиридин-4-ил)-21*H*,23*H*-порфирин] и синтетическую полиадениловую-полиуридилловую кислоту Poly(A)·Poly(U), в интервале температур 20–70°C (рН = 7.0, I = 0.15 М.). Деконволюция матрицы спектрометрических данных, без постулирования физико-химической модели равновесия, позволила оценить вклад комплекса Poly(A)·Poly(U)*(ZnTMPyP4)_n в суммарное изменение спектров. Хемометрический анализ показал, увеличены температуры плавления этого тройного комплекса на 9.4°C по сравнению со свободным полирибонуклеотидом, что указывает на стабилизацию связей между нуклеиновыми основаниями в полинуклеотиде Poly(A)·Poly(U) под действием связанного порфирина.

Ключевые слова: стабилизация биополимера, Poly(A)·Poly(U), ZnTMPyP4, хемометрический анализ, спектрофотометрия

DOI: 10.31857/S0044460X2012????

С целью проверки возможности стабилизации нативной структуры двуспирального биополимера путем комплексообразования с металлопорфирином методом УФ спектроскопии исследовано поведение полиадениловой-полиуридилловой кислоты Poly(A)·Poly(U) в присутствии комплекса 5,10,15,20-тетракис(1-метилпиридин-4-ил)-21*H*,23*H*-порфирина (H₂ TMPyP4) с цинком. Способность водорастворимого H₂ TMPyP4 и его металлопроизводных Me(X)TMPyP4 взаимодействовать с нативной ДНК и синтетическими полинуклеотидами является предметом большого числа исследований на протяжении ряда лет [1–9]. Введение металлоцентра позволяет создавать на основе порфирина лиганды, стабилизирующие специфические структуры ДНК, а также имеющие селективность по отношению к отдельным формам [10].

Катионный металлопорфирин Zn(X)TMPyP4 в водном растворе имеет заряд 4+ и квадратнопи-

рамидальную геометрию. Ион металла занимает некомпланарное положение, таким образом, вызывая куполообразное искажение, так как Zn(II) координирует аксиальный лиганд (X) только с одной стороны от плоскости порфирина. Связывание этого производного с ДНК и РНК может носить характер частичной интеркаляции, связывания в бороздке, а также и поверхностного присоединения [11–14]. Вполне вероятно, что пяти координационные свойства Zn(II) должны препятствовать интеркаляции металлопорфирина между основаниями dsДНК и РНК. Указанное соединение является наиболее эффективным при стабилизации специфических структур ДНК среди многих протестированных порфиринов [15]. Хотя примеров исследований взаимодействий достаточно много, тем не менее, механизм связывания еще не установлен до конца. Было показано, что большая плоская π-система Zn(X)TMPyP4 способна обеспечить сильные π–π-взаимодействия, а катионные

функциональные группы вместе с центральным ионом $Zn(II)$ обеспечивают электростатические взаимодействия с фосфатными группами на поверхности РНК [14].

Вторым компонентом изучаемой системы является двунитевая полиадениловая-полиуридиловая кислота $Poly(A) \cdot Poly(U)$ стабилизация которой представляет практический интерес. Известно, что данный малотоксичный биополимер активно индуцирует интерферон *in vivo* [16–18]. Это свойство позволило применить его в качестве лекарственного препарата в глазных каплях «Полудан». Лиофилизат для приготовления глазных капель растворяют непосредственно перед применением. Однако даже при незначительном нагревании препараты на основе раствора $Poly(A) \cdot Poly(U)$ теряют свою активность. Это можно связать с тем, что при комнатной температуре $Poly(A) \cdot Poly(U)$ в растворе находится в виде двуспирального полимера, а при повышении температуры происходит разворачивание цепей полимера. Трансформацию между формами (фазовый переход или плавление) можно отнести к переходу мономеров из двуспиральной структуры в одноцепочные структуры в результате разрыва связывающих их водородных связей. Температуру фазового перехода T_m (температура плавления) определяют как температуру полупревращения нативной формы в высокотемпературную форму. В процессе плавления соседние нуклеиновые основания мономера меняют свою ориентацию. В результате изменения характера стэкинга меняется интенсивность и энергия π - π^* -переходов, что ведет к изменению ЭСП.

Данные о температуре плавления для $Poly(U) \cdot Poly(A)$ весьма противоречивы, что обусловлено чувствительностью данного полимера к условиям эксперимента [19]. Сообщалось, что разделение нитей происходит при $37^\circ C$ [20]. Причем в присутствии интеркалятора $[(terpy)Pt(HEt)]^+$ эта температура повышалась до $43^\circ C$ [20]. В более поздних работах были найдены температуры перехода от 46 до $47.5^\circ C$ [21–25]. Присутствие интеркалятора увеличивало температуру перехода приблизительно на 8 – $9^\circ C$. Исследование термического поведения $Poly(A) \cdot Poly(U)$ в присутствии неметаллизированного $H_2TMRyP4$ показало повышение температуры плавления на $1.2^\circ C$ [26]. Это указывает на то, что связывание порфирина спо-

собствует подавлению перехода между нативной упорядоченной структурой и неупорядоченным состоянием статистического клубка, для данного биополимера.

В случае плавления тройного комплекса $[Poly(A) \cdot Poly(U)](TMRyP4)_n$, причина, лежащая в основе стабилизации или дестабилизации биополимера лигандом, является комплексной функцией многих термодинамических параметров. К ним относятся константа связывания лиганда и изменения параметров связывания с сайтом биополимера вследствие кооперативности, а также энтальпия и энтропия разрыва цепей. Определение лиганд-индуцированного сдвига T_m с использованием жесткой физико-химической модели требует установление всех перечисленных параметров, что является нетривиальной задачей. Кроме того, в зависимости от степени насыщения лигандом, кривые плавления могут стать многофазными за счет перераспределения лигандов, что еще более усложняет возможность интерпретации, особенно с использованием данных калориметрии. Поэтому в настоящей работе в качестве физического метода исследования выбрана электронная спектроскопия поглощения, что позволяет различить соединения, участвующие в превращениях, по их характерному спектру. Математическая обработка данных измерений проведена с использованием мягкого моделирования, не требующего постулирования модели равновесных взаимопревращений [27].

Успешное применение мягкого моделирования стало возможным в результате разработки методов хемометрического анализа данных спектрометрических измерений MCR-ALS (Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares) [28] объединенных в пакет компьютерных процедур MCR-ALS [29]. Мягкое моделирование проводится с целью построения диаграмм концентрационных профилей абстрактных спектральных форм, участвующих во взаимопревращениях в системе. Наиболее эффективно использование данного подхода при изучении систем, в состав которых входят биополимеры. Для таких макромолекул трудно определить набор химических форм и конформаций, взаимопревращение которых вызывает наблюдаемые изменения спектров в процессе варьирования равновесных концентраций компонентов раствора. При мягком моделировании в ходе итерацион-

ной подгонки используются ограничения, позволяющие придать физический смысл получаемому абстрактному математическому решению. Наряду с обычными ограничениями на одномодальность, неотрицательность, баланс и равенство концентраций, связанное с селективностью, недавно в алгоритмы MCR-ALS была добавлена физико-химическая модель [28]. Основное преимущество нового подхода состоит в возможности вычитания из общей экспериментальной дисперсии некоторой части, описываемой известной физико-химической моделью. В настоящей работе также использован данный подход. Следует отметить, что при наличии в системе концентрационной селективности параметры равновесных реакций в сложной системе можно вычислять непосредственно из диаграмм, построенных с помощью ALS-MCR. В отсутствие селективности, параметры взаимодействий полидентатной молекулы вычисляются из диаграмм ALS-MCR с систематической ошибкой. Неопределенность при вычислениях профилей частично удается снять путем анализа сшитой из параллельных экспериментов матрицы данных, включающей область концентрационной селективности для чистых компонент системы. Указанный хемометрический подход на основе мягкого моделирования показал свою эффективность для описания протонирования некоторых коротких последовательностей ДНК [30], а также при изучении плавления дуплекса Poly(A)·Poly(U) в водном растворе и для описания его взаимодействия с интеркалирующим лигандом [31, 32].

Добавление к водному раствору дуплекса Poly(A)·Poly(U) (10 мкМ., pH = 7.0) металлопорфирина Zn(X)TMPyP4 при комнатной температуре ведет к присоединению последнего на поверхности полинуклеотида с образованием трехкомпонентного комплекса Poly(A)·Poly(U)*(ZnTMPyP4)_n [14]. Термическое разрушение данного соединения, стабилизированного электростатическим взаимодействием центрального иона Zn(II) с фосфатными группировками дуплекса, сопровождается изменением оптического поглощения не только в области поглощения полинуклеотидов (250–300 нм), но и в области поглощения металлопорфирина (300–700 нм). Для ответа на вопрос о том, как комплексообразование с металлопорфирином влияет на термическую устойчивость дуплекса (рис. 1а), были изучены водные рас-

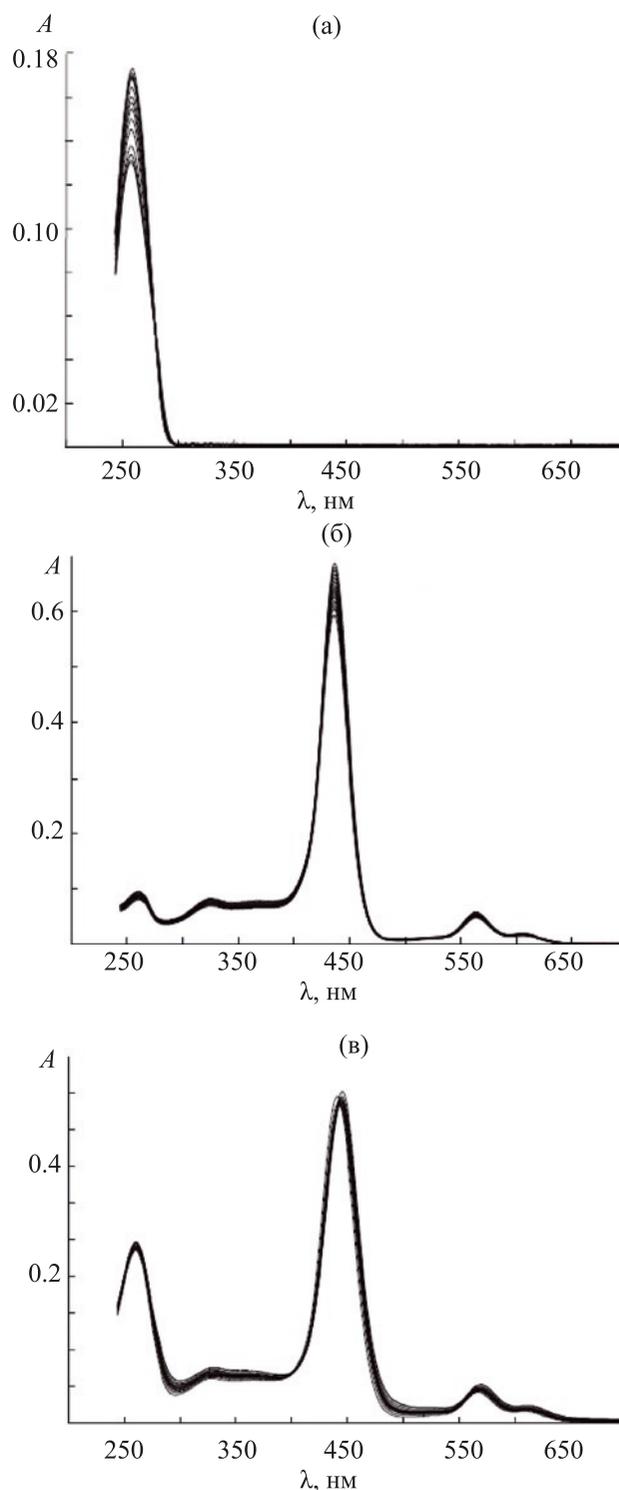


Рис. 1. Изменения электронных спектров поглощения водных растворов (pH = 7.0) дуплекса Poly[A]·Poly[U] (а), металлопорфирина Zn(X)TMPyP4 (б) и их смеси Poly[A]·Poly[U]–Zn(X)TMPyP4 (в) при варьировании температуры.

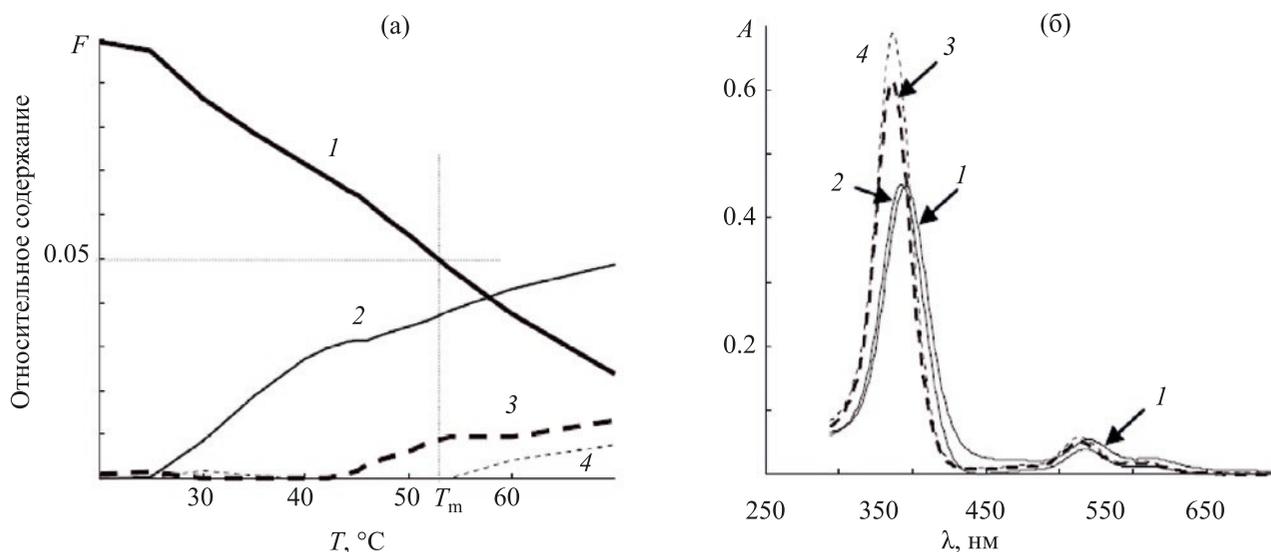


Рис. 2. Диаграмма распределения форм металлопорфирина в зависимости от температуры (а) и спектры форм (б) для спектральной области поглощения лиганда, вычисленные с помощью процедуры KALS деконволюции матрицы A_1 . 1 – Poly[A]·Poly[U]*(ZnTMPyP4)_n, 2 – частично диссоциированная форма ZnPPA_U, 3 – высокотемпературная форма Zn(X)TMPyP4^{HT}, 4 – Zn(X)TMPyP4.

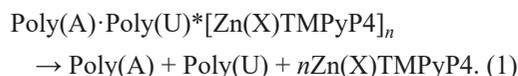
творы смеси Poly(A)·Poly(U)–Zn(X)TMPyP4 при различных мольных соотношениях компонентов. Электронные спектры поглощения (ЭСП) смеси Poly(A)·Poly(U)–Zn(X)TMPyP4 для мольного отношения компонентов 3:1, измеренные при температурах от 20 до 70°C, показаны на рис. 1в. Набору измеренных ЭСП соответствует матрица данных ZnPPAU. Ранг R_f матрицы ZnPPAU равен 3 (рис. 1б). Следовательно, дисперсию абсорбции определяют 3 спектральные формы. Аналогичный результат был получен при $M = 4$ и $M = 5$. Наличие области спектральной селективности металлопорфирина позволяет провести хемометрический анализ только для этой области спектра, показывающий изменение состояния металлопорфирина при температурных превращениях в системе. С целью проведения этого анализа также были получены данные для раствора чистого металлопорфирина.

ЭСП раствора Zn(X)TMPyP4 в условиях эксперимента заметно меняется при варьировании температуры (см. рис. 1б). Как видно из рисунка, наблюдается уменьшение интенсивности поглощения на 10% без изменения положения максимумов наиболее интенсивной полосы Core при 437 нм, а также Q-полос в области 550–650 нм и полосы поглощения в УФ спектре при 260 нм при повышении температуры от 20 до 70°C. Понижение

интенсивности полос поглощения возможно связано с изменением гидратной оболочки молекулы, вызывающей изменение вращательной свободы метилпиридиновых заместителей, аналогичное тому, что наблюдается при связывании производных порфиринов в комплексы с биомолекулами. Ранг матрицы данных ZnP, соответствующей набору ЭСП раствора металлопорфирина, равен 2. Следовательно, в термических превращениях Zn(X)TMPyP4 в растворе, можно допустить участие двух спектральных и соответствующих им химических форм: низкотемпературной Zn(X)TMPyP4 и высокотемпературной Zn(X)TMPyP4^{HT}.

Спектрофотометрические данные по температурному поведению раствора Poly(A)·Poly(U)–Zn(X)TMPyP4 и растворе чистого металлопорфирина объединены в матрице A_1 . Матрица $A_1 = [ZnPPAU \ ZnP]$ сшита из матрицы ZnPPAU и матрицы ZnP. Ранг матрицы A_1 равен 4. Однако сумма рангов матриц ZnPPAU и ZnP равна 5. Снижение ранга при сшивании матриц указывает, что в смеси имеется одна спектральная форма общая со спектральными формами свободного металлопорфирина. Для выяснения химической природы этой формы была использована процедура мягкого моделирования MCR-ALS [28]. MCR-ALS деконволюция матрицы A_1 дает матрицы C_f и S^T ,

произведение которых воспроизводит A_1 в пределах экспериментальной погрешности. Здесь матрица спектров спектральных форм $S^T = [S_{ZnPPAU} \ S_{ZnPPA_U} \ S_{ZnP} \ S_{ZnP_HT}]^T$, а матрица $C_f = [C_{ZnPPAU} \ C_{ZnPPA_U} \ C_{ZnP} \ C_{ZnP_HT}]$ в данном случае является сшитой матрицей долей форм металлопорфирина, находящихся в различных формах (состояниях), соответствующих спектральным формам свободного и координированного металлопорфирина). Число столбцов C_f равно рангу матрицы A_1 , а число строк равно $2N_T$ (N_T – число измерений температуры). Вычисленное распределение по формам, соответствующее первым N строкам C_f в зависимости от температуры показано на рис. 2А. На рис. 2Б показаны профили чистых спектральных форм, вычисленных с помощью MCR-ALS. На рис. 2Б виден гипсохромный сдвиг (4 нм) полосы Core для ZnPPA_U по сравнению с ZnPPAU. Как можно видеть из рис. 2А уменьшение доли формы ZnPPAU=Poly(A)·Poly(U)*(ZnTMPyP4)_n в интервале 20–45°C сопровождается ростом доли формы ZnPPA_U. Эту форму можно отнести к состоянию, в котором металлопорфирин связан с полинуклеотидом, но водородные связи между нуклеиновыми основаниями разорваны. Из диаграммы, показанной на рис. 2а, легко определить температуру полупревращения формы ZnPPAU, которая как было сказано во введении соответствует температуре плавления T_m . Из рисунка видно, что температуры плавления тройного комплекса составляет 53°C. Это на 9.4°C выше по сравнению с чистым полирибонуклеотидом. При температуре раствора выше 45°C наблюдается появление высокотемпературной формы свободного металлопорфирина (см. рис. 2а). Следовательно, спектральные изменения, наблюдаемые выше 45°C, можно объяснить процессом диссоциации (1).



При нагревании выше 60°C появляется еще одна форма, спектр которой похож на спектр Zn(X)TMPyP4. Возможно, это другая высокотемпературная форма металлопорфирина, но более точная интерпретации требует проведение дополнительных экспериментов при высокой температуре, что выходит за рамки данной работы.

Чтобы проследить за превращениями цепей дуплекса были проанализированы ЭСП в диапа-

зоне 250–700 нм, включая матрицу данных PAU для свободного Poly(A)·Poly(U). Экспериментально наблюдаемые ЭСП свободного дуплекса Poly(A)·Poly(U) в водном растворе при (pH = 7.0, $I = 0.15$ M.) при температурах 20–70°C (рис. 1а) были описаны ранее в работе [31]. Форма кривых плавления Poly(A)·Poly(U), сохраняющаяся в широком диапазоне температур, свидетельствует о монофазном характере плавления исследуемого биополимера. Наличие линейного участка на зависимости величины логарифма $K_U = [\text{RNA}]_{\text{дестр}} / [\text{RNA}]_{\text{сверн}}$ от обратной температуры позволили определить термодинамические параметры плавления [31].

Для анализа плавления Poly(A)·Poly(U)*(ZnTMPyP4)_n использовали матрицу $A_2 = [\text{ZnPPAU} - \nu * \text{ZnP} - \gamma * \text{PAU} \ \text{ZnP} \ \text{PAU}]$, где коэффициенты γ и ν – мольные доли свободного порфирина и свободного биополимера в растворе. Указанные коэффициенты находили из диаграммы распределения в соответствие с отношением компонент смеси (см. рис. 3 в работе [14]). Ранг матрицы A_2 для всех изученных мольных отношений равен 6. Сумма рангов матриц ZnPPAU, ZnP и PAU равна 7. Снижение ранга при сшивании матриц обусловлено присутствием высокотемпературной формы свободного металлопорфирина в смеси Poly(A)·Poly(U)–Zn(X)TMPyP4. Таким образом, химический ранг 3 матрицы ZnPPAU обусловлен взаимопревращением трех химических форм: исходного комплекса Poly(A)·Poly(U)*(ZnTMPyP4)_n, его частично диссоциированной формы ZnPPA_U и высокотемпературной формы Zn(X)TMPyP4^{HT}. Деконволюция матрицы A_2 позволяет вычислить матрицы $C_f = [C_{ZnPPAU} \ C_{ZnPPA_U} \ C_{ZnP} \ C_{ZnP_HT} \ C_{PPAU} \ C_{PA_U}]$ и $S^T = [S_{ZnPPAU} \ S_{ZnPPA_U} \ S_{ZnP} \ S_{ZnP_HT} \ S_{PPAU} \ S_{PA_U}]^T$. Произведение матриц C_f и S^T воспроизводит A_2 в пределах экспериментальной погрешности. Диаграмма распределения по формам в зависимости от температуры для N строк C_f показана на рис. 3а. Спектральные профили чистых форм (рис. 3б), совпадают с соответствующими профилями, вычисленными для области спектральной селективности металлопорфирина. Из рис. 3а видно, что появление высокотемпературной формы Zn(X)TMPyP4^{HT} совпадает с появлением заметной доли формы, отвечающей денатурированной PA_U. Результат проведенного расчета подтверждает схему процесса представленного уравнением (1).

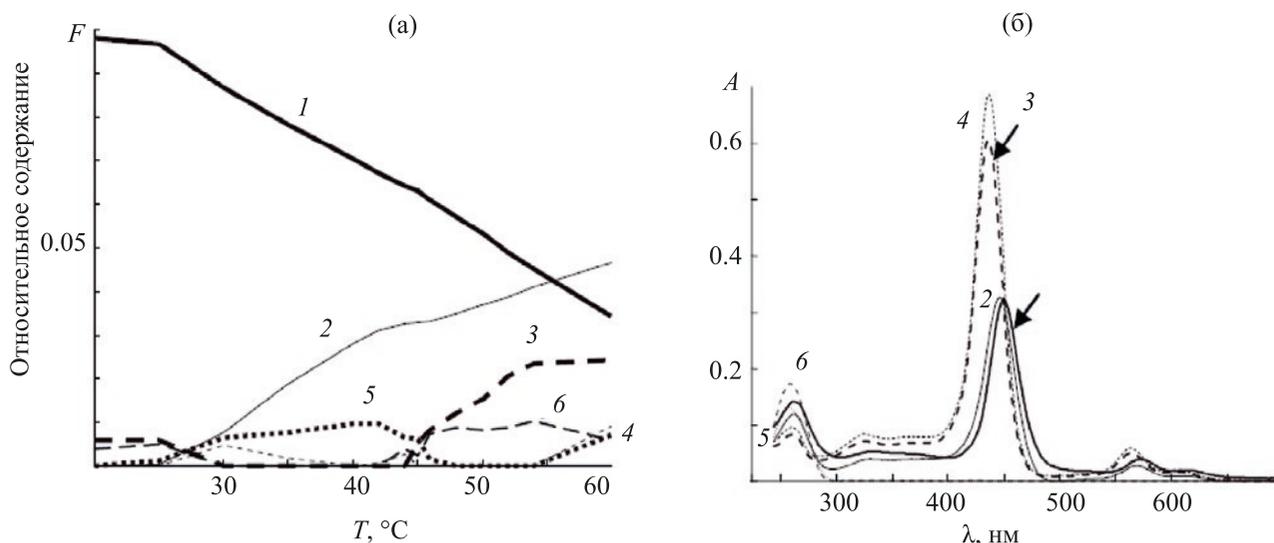


Рис. 3. Диаграмма изменения относительного содержания форм Poly[A]·Poly[U] и металлопорфирина Zn(X)TMPyP4 при изменении температуры (а) и спектры форм в видимой и УФ области спектра (б), вычисленные с помощью процедуры KALS из матрицы A_2 . 1 – Poly[A]·Poly[U]*(ZnTMPyP4)_n, 2 – частично диссоциированная форма ZnPPA_U, 3 – высокотемпературная форма Zn(X)TMPyP4^{HT}, 4 – Zn(X)TMPyP4, 5 – Poly[A]·Poly[U], 6 – высокотемпературная форма PA_U.

В заключение можно отметить, что в настоящей работе, с применением хемометрики, впервые проведено количественное описание плавления Poly(A)·Poly(U) в присутствии металлопорфирина Zn(X)TMPyP4, которое может быть полезно для более глубокого понимания характера связывания этих соединений. Математический анализ матриц данных позволил установить, что при нагревании выше 45°C раствора, содержащего комплекс Poly(A)·Poly(U)*(ZnTMPyP4)_n, происходит разрыв цепей дуплекса, который сопровождается диссоциацией тройного комплекса с частичным выделением свободного Zn(X)TMPyP4. Также впервые вычислены спектры химических форм металлопорфирина, участвующих в температурных превращениях: Zn(X)TMPyP4^{HT} и ZnPPA_U, что может быть полезно для квантово-химического моделирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гидроксид калия KOH (Chemapol, ЧДА), дигидрофосфат калия KН₂PO₄ (РеоХим, ЧДА), натриевую соль синтетической полиадениловой-полиуридилевой кислоты Poly(A)·Poly(U) (Sigma, содержание основного компонента 98%) использовали без дополнительной очистки. Методика синтеза металлопорфирина Zn(X)TMPyP4 описана в работе [14].

Спектры поглощения регистрировали на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu1800. Из-

мерения проводили в диапазоне 230–700 нм на средней скорости. Шаг сканирования спектра – 1 нм. Эксперименты по определению температуры плавления проводили в закрытой ячейке. Температуру поддерживали с помощью устройства Пельтье. Спектры поглощения измерены в интервале температур 20–70°C с шагом 1–5°C и временем выдержки 3 мин при каждом значении температуры. В работе использованы кварцевые кюветы с $l = 1$ см.

Poly(A)·Poly(U) растворяли в фосфатном буфере (K₂HPO₄/KH₂PO₄), pH = 7.0. К раствору добавляли KCl для достижения конечной ионной силы раствора $I = 0.15$ М. Отсутствие примесей в буферном растворе контролировали путем измерения ЭСП в УФ части спектра и спектра люминесценции. Вклад поглощения воды мал в изучаемом диапазоне длин волн и дополнительно компенсируется измерением спектра относительно кюветы с буферным раствором. Концентрация Poly(A)·Poly(U) в растворе одинакова во всех экспериментах ($c_{\text{tMon}} = 10$ мкМ.) и принята равной концентрации пар нуклеиновых оснований, которые являются мономерными звеньями в полинуклеотидной цепи. Для достижения определенного мольного отношения компонентов ($M = c_{\text{tMon}}/c_{\text{tL}}$) в мерную колбу помещали микронавеску сухого Poly(A)·Poly(U) и после полного растворения полимера добавляли аликвоту раствора Zn(X)

ТМРур4 известной концентрации, а затем доводили объем до метки при 25°C.

Хемометрическая процедура. Первым шагом примененного в настоящей работе хемометрического анализа данных является вычисление числа основных факторов R_f , равное числу спектральных форм в равновесной смеси, взаимопревращением которых обусловлена дисперсия абсорбции, измеренной при заданном наборе длин волн. Найденное значение R_f является ключевым для дальнейшего математического моделирования равновесия в системе. Ранг матриц данных вычислялся на основе метода главных компонент [33]. В результате применения метода главных компонент размерность набора данных, состоящих из большого числа взаимосвязанных переменных, сводится к новому набору переменных главных компонент, которые сохраняют максимальный объем исходной информации. Число факторов R_f , определяющих дисперсию, можно также найти из расхождения между исходной матрицей и воспроизведенной с помощью метода сингулярного разложения (SVD, Matlab-2014a).

$$A_i = USV^T = U_R S_R V_R^T + \tau_i = A_i^* + \tau_i. \quad (2)$$

Здесь U , V^T и S – матрицы, вычисленные с помощью процедуры SVD (Matlab-2014a), U_R , V_R^T и S_R – матрицы, составленные соответственно из первых строк, столбцов и диагональных элементов матриц U , V^T и S ; A_i^* – воспроизведенная матрица A_i с помощью R_f факторов, τ_i – погрешность воспроизведения.

$$\tau_i = PE(A_i, A_i^*) = PE(A_i, U_R S_R V_R^T). \quad (3)$$

Число основных факторов R_f выбирается таким, чтобы ошибка воспроизведения τ_i была меньше, либо равна погрешности эксперимента ($\tau_i \leq \delta_i$).

Для сравнения экспериментальных и вычисленных матриц использован фактор Гамильтона. Фактор Гамильтона (ошибка предсказания, %) вычисляли с помощью формулы (4).

$$PE = \sqrt{\frac{\text{Trace}[(F_{\text{exp}} - F_{\text{calc}})(F_{\text{exp}} - F_{\text{calc}})^T]}{\text{Trace}[F_{\text{exp}} F_{\text{exp}}^T]}} \times 100. \quad (4)$$

Здесь Trace – сумма диагональных элементов матрицы, $A_i = F_{\text{exp}}$ и $A_i^* = F_{\text{calc}}$. При использовании уравнения (4) для вычисления расхождения концентрационных профилей, в качестве F_{exp} и F_{calc} выступают матрицы концентраций.

Химический ранг R матрицы данных A_i равен R_f , т. е. числу значимых главных компонент, которых достаточно чтобы восстановить исходную матрицу в пределах уровня экспериментальной погрешности в случае, когда все химические формы спектрально активны. Исходя из допущения, что наименьший ранг C или S не может быть больше, чем общее число спектральных форм, следует, что ранг A_i также не может быть больше, чем общее число спектральных форм и равен числу химических форм.

Сущность подхода, использованного для вычисления концентрационных профилей из матрицы спектрофотометрических данных, состоит в том, что, согласно закону Бугера–Ламберта–Бера, матрицу абсорбций i -го эксперимента $A_i = A_{\text{exp}}(N_p, N_w)$ [N_p – число экспериментальных точек (температур), N_w – число спектральных каналов] можно представить в виде:

$$A_{\text{exp}} = C_f S^T + \delta = C_{\text{form}} E^T + \delta = A_{\text{calc}} + \delta. \quad (5)$$

Здесь C_f – матрица долей спектральных форм в растворе, S – матрица чистых спектров форм, присутствующих в растворе, A_{calc} – матрица, рассчитанная для предполагаемой модели равновесных превращений, $C_{\text{form}}(N_p, R)$ – матрица концентраций, $E^T(R, N_w)$ – матрица молярных коэффициентов поглощения всех спектральных форм, $\delta(N_p, N_w)$ – матрица экспериментальных погрешностей. Учитывая найденное ранее значение R_f , вычисляем начальное приближение $S^T(R_f, N_w)$, используя процедуру PURE (Pure Variable Detection Method) [34]. Данная процедура основана на методе поиска так называемых чистых спектров форм. Умножение обеих частей уравнения (5) на матрицу S^+ , псевдообратную [35] матрице чистых спектров, вычисленную с помощью PURE, дает оценку истинной матрицы C_f .

$$C_f^* = A_{\text{exp}} S^+. \quad (6)$$

Дальнейшее уточнение профилей C_f^* проводили с помощью итерационной процедуры ALS, представленной в пакете MCR-ALS. Успешное ALS-уточнение дает произведение матриц C_f и S^T , которое воспроизведет исходную матрицу данных с точностью, как правило, превышающую экспериментальную погрешность. Для минимизации неопределенности математического решения итерационный расчет выполнен с ограничением на неотрицательность концентраций и коэффициентов поглощения.

Графическое представление матрицы C_f в виде диаграммы распределения форм металлопорфирина в зависимости от температуры позволяет определить температура плавления T_m .

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim Y.-H., Lee C., Kim S.K., Jeoung S.C. // *Biophys. Chem.* 2014. Vol. 190–191. P. 17. doi 10.1016/j.bpc.2014.03.005
2. Alberti E., Zampakou M., Donghi D. // *J. Inorg. Biochem.* 2016. Vol. 163. P. 278. doi 10.1016/j.jinorgbio.2016.04.021.
3. Choi J.K., D'Urso A., Balaz M. // *J. Inorg. Biochem.* 2013. Vol. 127. P. 1. doi 10.1016/j.jinorgbio.2013.05.018
4. Kim Y.R., Gong L., Park J., Jang Y.J., Kim J., Kim S.K. // *J. Inorg. Biochem.* 2012. Vol. 116. P. 2330. doi 10.1021/jp212291r
5. Gong L., Bae I., Kim S.K. // *J. Phys. Chem. (B)*. 2012. Vol. 116. P. 12510 doi 10.1021/jp3081063
6. Gong L., Jang Y.J., Kim J., Kim S.K. // *J. Phys. Chem. (B)*. 2012. Vol. 116. P. 9619. doi 10.1021/jp3041346
7. Zhou Z.-X., Gao F., Chen X., Tian X.-J., Ji L.-N. // *Inorg. Chem.* 2014. Vol. 53. P. 10015. doi 10.1021/ic501337c
8. Ghazaryan A.A., Dalyan Y.B., Haroutiunian S.G., Tikhomirova A., Taulier N., Wells J.W., Chalikian T.V. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128. P. 1914. doi 10.1021/ja054070n
9. Tolstykh G., Kudrev A. // *J. Mol. Struct.* 2015. Vol. 1098. P. 342. doi 10.1016/j.molstruc.2015.06.031
10. Sabharwal N.C., Mendoza O., Nicoludis J.M., Ruan T., Mergny J.-L., Yatsunyk L.A. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2016. Vol. 21. P.227. doi 10.1007/s00775-015-1325-8
11. Briggs B.N., Gaier A.J., Fanwick P.E., Dogutan D.K., McMillin D.R. // *Biochem.* 2012. Vol. 51. P. 7496. doi 10.1021/bi300828z
12. Uno T., Aoki K., Shikimi T., Hiranuma Y., Tomisugi Y., Ishikawa Y. // *Biochem.* 2002. Vol. 41. P. 13059. doi 10.1021/bi026139z
13. Qin T., Liu K., Song D., Yang C., Zhao H., Su H. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. P. 1071. doi 10.3390/ijms19041071
14. Tolstykh G., Sizov V., Kudrev A. // *J. Inorg. Biochem.* 2016. Vol. 161. P. 83. doi 10.1016/j.jinorgbio.2016.05.004
15. Pan J., Zhang S. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2009. Vol. 14. P. 401. doi 10.1007/s00775-008-0457-5
16. De Clercq E., Torrence P., De Somer V., Witkop B. // *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250. P. 2521.
17. Thang M.N., Guschlbauer W. // *Pathol. Biol.* 1992. Vol. 40. P. 1006.
18. De Clercq E. // *Top. Curr. Chem.* 1974. Vol. 52. P. 173. doi 10.1007/978-1-4020-1273-6_12
19. Saenger W. *Principles of Nucleic Acid Structure*. New York: Springer-Verlag, 1988. 556 p.
20. Barton J.K., Lippard S.J. // *Biochem.* 1979. Vol. 18. P. 2661.
21. Ray A., Kumar G. S., Das S., Maiti M. // *Biochem.* 1999. Vol. 38. P. 6239.
22. He X., Li J., Zhanga H., Tan L. // *Mol. BioSyst.* 2014. Vol. 10. P. 2552. doi 10.1039/c4mb00304g
23. Tan L.-F., Liu J., Shen J.-L., Liu X.-H., Zeng L.-L., Jin L.-H. // *Inorg. Chem.* 2012. Vol. 51. P. 4417. doi 10.1021/ic300093h
24. Li J., Sun Y., Xie L., He X., Tan L. // *J. Inorg. Biochem.* 2015. Vol. 143. P. 56. doi 10.1016/j.jinorgbio.2014.12.007
25. Li J., Sun Y., Zhu Z., Zhao H., Tan L. // *J. Inorg. Biochem.* 2017. Vol. 161. P.128. doi 10.1016/j.jinorgbio.2016.04.024
26. Ivanov M., Sizov V., Kudrev A. // *J. Mol. Struct.* 2020. Vol. 1202. P. 127365. doi 10.1016/j.molstruc.2019.127365
27. **Authors??** Practical Guide to Chemometrics / Ed. P. Gemperline. Boca Raton; London; New York: Taylor&Francis Group, LLC, 2006. P. 421.
28. Tauler R., de Juan A. In: *Practical Guide to Chemometrics* / Ed. P. Gemperline. Boca Raton; London; New York: Taylor&Francis Group, LLC, 2006. P. 453.
29. http://www.cid.csic.es/homes/rtaqam/tmp/WEB_MCR/down_mcr.html
30. **Привести данные на русскую версию!** Gargallo R., Eritja R., Kudrev A. // *Russ. J. Gen. Chem.* 2010. Vol. 80. P. 485. doi 10.1134/S1070363210030205
31. **Привести данные на русскую версию!** Kudrev A.G. // *Russ. J. Gen. Chem.* 2017. Vol. 87. P. 788. doi 10.1134/S107036321704020X
32. Kudrev A. // *Biopolymers.* 2013. Vol. 99. P. 621. doi 10.1002/bip.22227.
33. Jolliffe I.T. *Principal Component Analysis*. Berlin; London; New York: Springer Verlag, 2002. 487 p.
34. Windig W., Guilment J. // *Anal. Chem.* 1991. Vol. 63. P. 1425. doi 10.1021/ac00014a016.
35. Golub G.H., Van Loan C.F. *Matrix computations*. London: The Johns Hopkins Univ. Press, 1989. 687 p.

Stabilization of Double-Stranded Poly(A)·Poly(U) with ZnTMPyP4 Metalloporphyrin in Aqueous Solution

A. G. Kudrev*

St. Petersburg State University, St. Petersburg, 190034 Russia

**e-mail: kudrevandrei@mail.ru*

Received July 20, 2020; revised August 7, 2020; accepted August 14, 2020

UV-Vis absorption spectra of aqueous solutions containing both metalloporphyrin Zn(X)TMPyP4 [H₂TMPyP4 – 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridin-4-yl)-21*H*,23*H*-porphyrin] and synthetic polyadenylic-polyuridylic acid Poly(A)·Poly(U) in the temperature range from 20 to 70°C (pH = 7.0, *I* = 0.15 M.) were analyzed. Deconvolution of the spectrometric data matrix, without postulating a physicochemical equilibrium model, made it possible to estimate the contribution of the Poly(A)·Poly(U)*(ZnTMPyP4)_{*n*} complex to the total change in the spectra. Chemometric analysis showed an increase in the melting temperature of this ternary complex by 9.4°C compared to pure polyribonucleotide, which indicates the stabilization of bonds between nucleic bases in the Poly(A)·Poly(U) polynucleotide under the influence of bound porphyrin.

Keywords: biopolymer stabilization, Poly(A)·Poly(U), ZnTMPyP4, chemometric analysis, spectrophotometry