

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

на правах рукописи

УДК 577.323.43

КАЗАРЯН РУЗАННА СУРЕНОВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО

СОЕДИНЕНИЯ МИТОКСАНТРОНА С ДНК

9. 00.02 - Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой

степени кандидата биологических наук

ЕРЕВАН - 1997

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ձեռագրի իրավունքով

ՈՒՏՎ 577.323.43

ՂԱԶԱՐՅԱՆ ՌՈՒԶԱՆՆԱ ՍՈՒՐԵՆԻ

ՀԱՎԱՍԽՈՒՄՈՒԹՅԱՅԻՆ ՄԻԱՅՈՒԹՅՈՒՆ ՄԻՏՈՔՍԱՆՏՐՈՆԻ ՓՈՆԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ

ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԴՆԹ-Ի ՄՈԼԵԿՈՒԼԻ ՀԵՏ

9. 00.02 - ԿԵՆՍԱՅԻԶԻԿԱ

կենսաքամական գիտությունների քեկնածուի գիտական

աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 1997

Работа выполнена на кафедре молекулярной физики физического факультета Ереванского государственного университета.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор С. Г. АРУТЮНЯН

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор П. О. ВАРДЕВАНЯН
кандидат физико-математических наук
А. Г. ГАБРИЕЛЯН

Ведущая организация: Республиканский научный центр
Радиационной медицины и ожогов
Минздрава РА.

Защита состоится "12" декабря 1997 г. в 14⁰⁰ часов на заседании Специализированного Совета 051 при Ереванском государственном университете (375049, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕрГУ, биологический факультет)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат разослан "10" ноября 1997 г.

Ученый секретарь Специализированного
Совета, кандидат биологических наук



С.А. ГОНЯН

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одна из основных задач современной молекулярной биофизики состоит в выяснении характера взаимодействия лекарственных соединений с нуклеиновыми кислотами, так как многие лекарственные препараты, проникая в клетку, связываются в основном с нуклеиновыми кислотами, чем и обусловлен их терапевтический эффект. Этой проблеме посвящено огромное количество работ, однако, задача все еще остается актуальной, в связи с синтезом все новых и новых биологически активных соединений.

Чтобы понять к какому нарушению функций ДНК может приводить комплексообразование лекарственных соединений с нуклеиновыми кислотами, необходимо знать не только характер связывания, но и выяснить возможные изменения в структуре ДНК вследствие взаимодействия и определить изменение термодинамических параметров при связывании. Исследование взаимодействия фармакологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами актуально еще и тем, что анализ полученных данных позволит определить пути улучшения лекарственных препаратов, и, в частности, антираковых соединений, способных эффективнее связываться с нуклеиновыми кислотами, а также понять молекулярный механизм воздействия исследованных соединений.

Франк-Каменецим, Гурским, Карапетяном, Waring и т.д. экспериментально и теоретически подробно исследованы комплексы нуклеиновых кислот с интеркаляторами и неинтеркаляторами и получены основные закономерности, характеризующие их взаимодействия. Однако, сравнительно недавно был синтезирован новый класс противоопухолевых соединений, которые содержат плоские циклы (способные интеркалироваться) и длинные заряженные алифатические хвосты (способные электростатически взаимодействовать с фосфатными остатками нуклеиновых кислот). Физико-химические свойства комплексов таких соединений с правоспиральными и левоспиральными формами двуспиральных нуклеиновых кислот выполнены Lowm и Бабаяном. Из анализа литературных данных следует, что термостабильность комплексов ДНК с митоксантроном исследовано

недостаточно, а при малых концентрациях митоксантрона, когда одна молекула митоксантрона связывается примерно с 100 и более парами оснований ДНК, совершенно не исследовано. Одновременно, не выяснено, наблюдается ли избирательность при взаимодействии митоксантрона с ДНК опухоли.

Цель и задачи исследования. Детальное исследование взаимодействия митоксантрона с ДНК нормы и опухоли саркомы 45 с определением параметров характеризующих связывание и термостабильность комплексов.

В задачи работы входило: С помощью оптических методов и микрокалориметрии:

- исследовать природу взаимодействия митоксантрона с двуспиральными ДНК и с опухолевой ДНК, при различных ионных силах и температурах.

- исследовать плавление комплексов митоксантрона с ДНК нормальных и опухолевых трансформированных клеток в широком интервале концентраций митоксантрона.

Научное значение и новизна. В диссертации исследован характер взаимодействия митоксантрона в зависимости от ионной силы раствора и температуры и определены термодинамические величины связывания методом спектрофотометрии. Пролемонстрирована разница в величинах термодинамических параметров при интеркаляции соединений с большими боковыми группами и без них, и проанализирована причина этих различий.

- впервые экспериментально обнаружено и теоретически обоснованно, что при малых концентрациях митоксантрона ($r \leq 0,01$) уменьшению температуры плавления ДНК сопутствует увеличение энтальпии плавления.

- обнаружено, что при связывании митоксантрона с ДНК нормальных и опухолевых трансформированных клеток наблюдается некоторая избирательность взаимодействия митоксантрона с ними - связывание сильнее с опухолевыми ДНК.

Практическая ценность. Полученные результаты могут быть применены в различных областях молекулярной биологии и медицины. Прежде всего, они представляют интерес для химиотерапии опухолей, при разработке новых эффективных противоопухолевых соединений и в поиске оптимальных путей

направленного синтеза биологически активных соединений и экспресс - анализа их молекулярного действия.

Результаты работы используются в лекционных курсах по структуре нуклеиновых кислот в Ереванском госуниверситете и могут быть рекомендованы для учебных заведений, где есть специализации по биофизике и молекулярной биологии.

Апробация работы и публикации. Матералы диссертации докладывались на Всесоюзной конференции по "Спектроскопии биополимеров" (Харьков, 1984, 1991), на международном симпозиуме "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии" (Дубна, 1997), на научной конференции, посвященной 30-ти летию основания отделения биофизики ЕГУ (Ереван, 1996).

Основные результаты опубликованы в 5 статьях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы (104 ссылки). Она содержит 90 страниц, в том числе 15 рисунков и 2 таблицы.

Содержание работы

В первой главе приводятся данные о конформационных переходах в двуспиральных нуклеиновых кислотах, влиянию различных фармакологически активных соединений на В-Z и В-A равновесия и рассматриваются механизмы взаимодействия фармакологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами.

Во второй главе приводятся описание материалов и методики исследований. Были использованы следующие препараты нуклеиновых кислот: ДНК тимуса телят ("sigma"), печени крысы, саркомы 45 (были выделены в ИТОХ НАН РА), поли[d(A-T)] и поли[d(I-C)] ("P.L. Biochemicals"). Все фирменные препараты нуклеиновых кислот использованы без дополнительной очистки. Молекулярная масса ДНК печени крысы и саркомы 45 порядка 10^7 дальтон. Для этих ДНК отношение A_{260}/A_{280} лежало между 1,8-1,9, а A_{260}/A_{230} - между 2,2-2,4. Содержание белка и РНК в указанных ДНК меньше 1,5%.

Концентрация использованных нуклеиновых кислот была определена использованием следующих коэффициентов экстинкции, в $M^{-1}cm^{-1}$: ДНК

тимуса тельца ($\epsilon_{260}=6550$), ДНК печени крысы ($\epsilon_{260}=6500$), поли[d(A-T)] ($\epsilon_{252}=6600$) и поли [d(I-C)] ($\epsilon_{251}=6900$).

Исследования проводились: в водном растворе, содержащем 0,1М NaCl, 0,01М Трис, 0,5м М ЭДТА, pH 7,4 (буферА); 0,01МNaCl, 1м М Трис, 0,5 м М ЭДТА pH 7,4 (буфер Б). Трис, ЭДТА, NaCl-препараты фирмы "serva". рН-метре рН-673. Значение рН определяли при 25°C.

В работе был использован фармакологически активное соединение митоксантрон (МХ) ("Farmitalia"). Концентрация митоксантрона была определена спектрометрически: $\epsilon_{665}=20900 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Спектры поглощения и кривые плавления реализованы на спектрофотометрах "Cary-219" (США) и "Unicam SP - 8000" (Англия).

Теплоту перехода спираль-клубок определяли на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре "ДАСМ-1М" (СССР).

Построение дифференциальных кривых плавления. Поскольку на кривых плавления, полученных спектрофотометрически, особенности первичной структуры ДНК проявляются слабо, был осуществлен переход к дифференциальным кривым плавления (ДКП). ДКП были получены путем численного дифференцирования нормированных кривых плавления. В данной работе ДКП применяется для исследования влияния митоксантрона на нуклеотидные пары ДНК.

В третьей главе рассматриваются термодинамика, структура и природа взаимодействия митоксантрона с двуспиральными ДНК.

Исследование взаимодействия митоксантрона с ДНК по характеру изменения спектров поглощения в видимой области спектра.

Исследовано взаимодействия МХ с ДНК тимуса тельца в буфере А при комнатной температуре. Как следует из рис. 1, при постоянной концентрации МХ с увеличением содержания ДНК в растворе наблюдается гипохромизм и смещение максимума поглощения при 665 нм в сторону длинных волн. При этом имеется четко выраженная изобестическая точка при 676 нм. Следовательно, в исследуемых условиях (при ионной силе $\mu = 0,11$ и температуре 30 °С) МХ взаимодействует с ДНК тимуса тельца одним способом. При некоторых значениях C_p/C_0 (где C_p - концентрация ДНК в расчете на пару оснований, а C_0 - концентрация МХ в растворе) прекращается

дальнейшее изменение спектров поглощения - все молекулы МХ находятся в связанном состоянии. Одновременно исследовался характер изменения спектров поглощения при взаимодействии МХ с ДНК при сравнительно малой ионной силе (буфер Б).

Как показывают экспериментальные данные при ионной силе $\mu=0,011$, при постоянной концентрации МХ с увеличением содержания ДНК в растворе спектры поглощения изменяются, причем при этих ионных силах никаких закономерностей в изменении спектров не наблюдаются: в указанных условиях возможны одновременно, по крайней мере, два различных способа взаимодействия молекул МХ с ДНК. Следовательно, уже из рассмотрения спектров поглощения следует, что характер взаимодействия МХ с ДНК зависит от ионной силы раствора. Исследовалась также тепловая денатурация комплексов ДНК с МХ в буферах А и Б по изменению поглощения при 260 нм. На рис. 2 приведены кривые плавления поли [d(A-T)], полученные при некоторых концентрациях МХ. Как видно из рис.2, связывание приводит к увеличению термостабильности поли[d(A-T)], причем характер изменения формы кривой плавления комплексов в зависимости от концентрации МХ различен при различных ионных силах раствора.

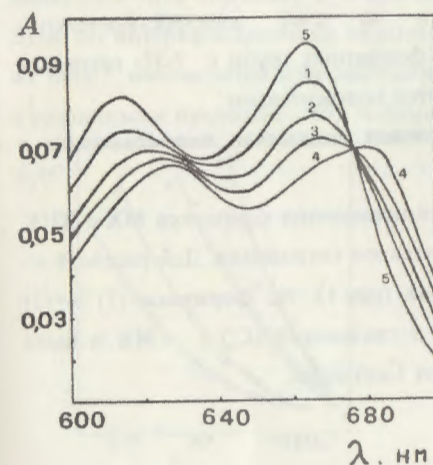


рис.1 Изменение спектров поглощения митоксантрона при связывании с ДНК тимуса тельца в буфере А при 30°C. В процессе титрования концентрация митоксантрона остается постоянной ($C_0=4,1 \cdot 10^{-6} \text{M}$). Концентрация ДНК в расчете на пару оснований равна: $C_p=1,35 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (1); $2,9 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (2); $4,6 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (3) и $9 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (4); 5- спектр поглощения чистого митоксантрона.

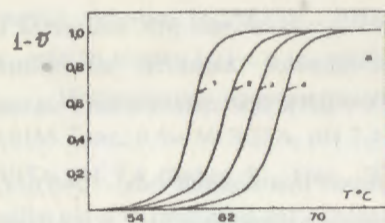
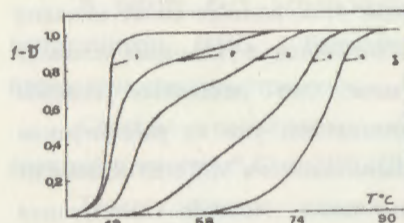


рис.2 Кривые плавления поли[d(A-T)] в комплексе с митоксантроном.

а. - в буфере А при концентрациях митоксантрона: $C_0/C_p=0$ (1), 0,09 (2), 0,16 (3) и 0,32 (4).

Б - в буфере Б при концентрациях митоксантрона: $C_0/C_p=0$ (1), 0,025 (2), 0,08 (3), 0,2 (4) и 0,38 (5)



Как следует из рис.2, форма кривых плавления комплексов поли[d(A-T)] МХ при $\mu=0,11$ не меняется с увеличением числа связанных с ДНК молекул МХ, а происходит смещение кривых плавления в сторону высоких температур, при почти неизменном интервале плавления. При $\mu=0,011$ двухфазные кривые плавления наблюдаются при концентрациях лигандов, меньших чем стехиометрическая.

Связывание МХ с ДНК может осуществляться при помощи интеркаляции ароматических колец и за счет электростатического взаимодействия отрицательно заряженных фосфатных групп с NH- группами МХ, которые при нейтральных рН заряжаются положительно.

Определение параметров, характеризующих связывание митоксантрона с ДНК.

Константа связывания и стехиометрия насыщения комплекса МХ с ДНК рассчитаны из спектров спектрофотометрического титрования. Для расчета из спектрофотометрических кривых титрования (рис.1), по формулам (1) и (2) определяли концентрации свободного (C_f) и связанного (C_b) МХ и была построена изотерма адсорбции в координатах Скетчарда.

$$C_f = \frac{A - A_b}{A_f - A_b} \times C_0 \quad (1)$$

$$C_b = C_0 - C_f \quad (2)$$

Здесь A_f и A_b -поглощение при 665 нм свободного и связанного МХ, A -поглощение при промежуточных концентрациях МХ. A_b была определена из линейной экстраполяции A от $1/C_p$ при $1/C_p \rightarrow 0$.

Как следует из рис.3, связывание МХ с двуспиральными ДНК характеризуется нелинейной изотермой адсорбции, которая хорошо описывается теоретической зависимостью (3) для некооперативного связывания лигандов на гомополимере.

$$\frac{r}{C_f} = K \times (1 - n \times r) \times \left[\frac{1 - n \times r}{1 - (n - 1) \times r} \right]^{n-1} \quad (3)$$

где $r = C_b/C_p$, K - константа связывания МХ, n - параметр, характеризующий стехиометрию комплекса полимер-лиганд, при насыщении и равной числу пар оснований полимера, занимаемых одной связанной молекулой лиганда.

Значения параметров K и n , для комплекса МХ с природными и синтетическими ДНК при разных температурах, рассчитанные по формуле (3), приведены в табл. 1. Как следует из табл. 1. для комплексов МХ ДНК $n=2-3$. Полученное значение n -числа пар оснований, занимаемых одной связанной молекулой МХ совпадает с n для других соединений, взаимодействующих с ДНК по интеркаляционному механизму (Гурский, Бабаян, Lown). Как следует из табл.1. наблюдается избирательность связывания исследуемого соединения с различными нуклеотидными парами.

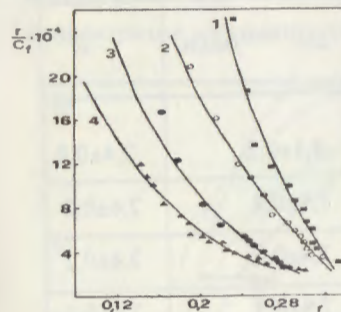


рис.3 Изотермы связывания, построенные с помощью спектрофотометрического титрования митоксантрона с ДНК тимуса тельца в буфере А при 30°C (1), 40°C (2), 50°C (3) и 60°C (4). Сплошная линия - теоретическая кривая проведенная через экспериментальные точки удовлетворяющая уравнению (3).

Используя значение K, можно найти изменение свободной энергии Гиббса ΔG при связывании по формуле

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

где R- газовая постоянная, T- абсолютная температура. Изменение энтальпии (ΔH) при связывании MX с ДНК было определено из анализа Вант-Гоффа зависимости K от температуры.

$$H = -R \frac{\partial \ln K}{\partial \left(\frac{1}{T}\right)} \quad (5)$$

Согласно формуле (5), тангенс угла наклона кривой $\ln K$ в зависимости от $1/T$ дает величину $-\Delta H/R$, если зависимость линейная.

Как показывают расчеты, для обоих исследованных комплексов $\Delta H = -(10 \pm 2)$ ккал/моль. Зная ΔG и ΔH , можно оценить изменение энтропии (S) при связывании по формуле (6)

$$\Delta S = - \frac{\Delta G - \Delta H}{T} \quad (6)$$

Расчеты показывают, что величина ΔS положительна, и составляет соответственно 17 ± 2 и 12 ± 2 ккал/моль град. для комплекса MX с ДНК тимуса телянка.

Т а б л и ц а 1

Термодинамические параметры связывания митоксантрона с ДНК при некоторых температурах в буфере А.

T_m ДНК	t°, c	$k (10^{-5}), M^{-1}$	ΔG ккал/моль	n
тимус телянка	30	$5,8 \pm 0,4$	$8,1 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$
	40	$2,5 \pm 0,5$	$7,9 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$
	50	$1,8 \pm 0,5$	$7,8 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$
	60	$1,3 \pm 0,5$	$7,8 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,2$
поли[d(A-T)]	30	$2,3 \pm 0,4$	$7,9 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$

Термостабильность комплекса ДНК-митоксантрон. Как было показано в предыдущем параграфе, характер взаимодействия митоксантрона с правоспиральными ДНК зависит от ионной силы раствора, причем, можно считать, что при $\mu=0,11$ взаимодействие носит интеркалирующий характер. При таком взаимодействии с увеличением числа интеркалированных молекул митоксантрона, увеличивается температура плавления T_m ДНК; кривые плавления почти параллельно сдвигаются в сторону высоких температур.

При малых концентрациях митоксантрона, когда одна молекула приходится примерно на 100 пар оснований ДНК, при практической неизменности T_m , кривая перехода слегка уширяется, что соответствует дестабилизации АТ и стабилизации ГЦ-пар. Дальнейшее увеличение концентрации митоксантрона, как и следовало ожидать, приводит к увеличению T_m .

При малых ионных силах, когда отрицательно заряженные фосфатные группы ДНК не полностью экранированы, в ДНК появляется возможность электростатического взаимодействия. Помимо интеркаляции колец, определенный вклад в связывание дает и электростатическое взаимодействие боковых групп митоксантрона. На рис.4 показаны кривые плавления ДНК тимуса телянка в буфере Б ($\mu=0,011$) при различных концентрациях митоксантрона. Как следует из рис. 4, при добавлении митоксантрона, в соотношении порядка 1:100 пар оснований ДНК происходит дестабилизация АТ- богатых участков и стабилизация ГЦ- богатых участков, вследствие чего, уменьшается T_m ДНК и увеличивается ΔT . Дальнейшее увеличение концентрации митоксантрона приводит к увеличению T_m .

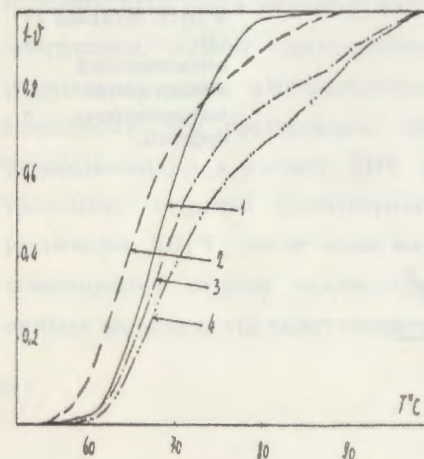


рис.4 Кривые плавления ДНК тимуса телянка в комплексе с митоксантроном в буфере Б при концентрациях: $C_0/C_p=0$ (1); 0,008 (2); 0,012 (3) и 0,026 (4).

Следовательно, независимо от ионной силы раствора при сравнительно малых концентрациях митоксантрона связывание приводит к дестабилизации АТ- и стабилизации ГЦ- пар (рис. 4), однако при малых ионных силах этот эффект выражен сильнее. На рис. 5 показана зависимость T_m от концентрации митоксантрона. Как следует из рис. 5 при сравнительно малых концентрациях митоксантрона $C_0/C_p \leq 0,01$, происходит дестабилизация ДНК; T_m для ДНК тимуса телят уменьшается более чем на 2° . Дальнейшее увеличение концентрации митоксантрона приводит к стабилизации ДНК (увеличению T_m). В указанной на рис. 5 области концентрации митоксантрона особенности в поведении $\delta(\Delta T)$ не наблюдаются: ΔT монотонно увеличивается с увеличением C_0/C_p . Следует отметить, что в буфере А ($\mu=0,11$) для T_m аналогичная зависимость не наблюдается. На рис. 5 приведена также кривая для ДНК опухоли саркомы 45. Как следует из рис. 5, для ДНК опухоли эффект уменьшения T_m выражен сильнее. Вполне вероятно, что это обусловлено наличием в ДНК опухоли "дефектных" участков, которые облегчают раскручивание несвязанных пар оснований. Итак, несмотря на то, что интеркаляционное и электростатическое взаимодействия приводят к

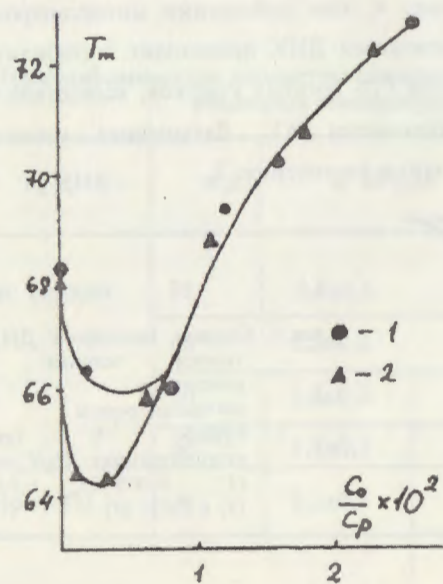


рис.5 Зависимость температуры плавления ДНК тимуса телят (1) и ДНК саркомы 45 (2) от относительной концентрации митоксантрона в буфере Б.

стабилизации связанных пар оснований, мы наблюдаем уменьшение T_m и увеличение ΔT при связывании одной молекулы митоксантрона примерно с 100 и более парами оснований ДНК. Для определения роли энергии межмолекулярных взаимодействий в этом эффекте были проведены калориметрические исследования.

При помощи дифференциальной сканирующей микрокалориметрии была определена зависимость энтальпии плавления (ΔH) от концентрации митоксантрона (таблица 2) комплексов, для которых наблюдается уменьшение T_m при увеличении C_0/C_p . Микрокалориметрическое измерение проводилось для комплексов ДНК опухоли саркомы 45 с митоксантроном, для которой наблюдается более сильное уменьшение T_m (рис. 5). Как следует из таблицы, ΔH почти монотонно увеличивается с увеличением относительной концентрации митоксантрона. Следовательно, в указанной области концентраций митоксантрона, уменьшению T_m сопутствует увеличение ΔH .

Этот, на первый взгляд, неожиданный результат может быть объяснен на качественном уровне следующим образом. Из общего определения температуры перехода $T_m = \Delta H / \Delta S$, если энтропию спирального состояния, считать не зависящей от взаимодействия с лигандом (для таких малых концентраций, как $C_0/C_p \leq 0,01$), то уменьшение T_m с увеличением ΔH можно объяснить только за счет увеличения энтропии клубкообразного состояния за счет взаимодействия с митоксантроном. Этот эффект увеличения энтропии возможно обусловлен тем, что интеркалирующий митоксантрон может вступать в электростатическое взаимодействие с фосфатными группами ДНК своей хвостовой частью, несущей положительный заряд. При денатурации, стекнинг взаимодействия ароматической части митоксантрона разрушается, хотя электростатическая связь с фосфатными группами сохраняется. Мы предполагаем, что дополнительной свободой вращения присоединенного к скелету ДНК митоксантрона и обеспечивается такое увеличение энтропии денатурированного состояния комплекса, что при увеличении ΔH , T_m тем не менее уменьшается. По видимому при увеличении концентрации лиганда межлигандные взаимодействия ограничивают эту свободу вращения, что может привести к росту T_m только за счет роста ΔH .

Т а б л и ц а 2

Зависимость энтальпии плавления ДНК опухоли саркомы 45 от концентрации митоксантрона в буфере Б.

Относительная концентрация митоксантрона C_p/C_0	0	0,0012	0,0025	0,005	0,01
Энтальпия плавления (ΔH , дж/г)	48,3±2,0	48,3±2,0	50,5±2,0	53,4±2,0	54,5±2,0

В пользу нашего предположения говорят результаты по взаимодействию этидиум бромид, у которого отсутствует такая хвостовая часть. Детальные исследования (Карапетян, Вардеванян) в широкой, в том числе и малой концентрационной области не обнаруживают наблюдаемого нами эффекта.

Четвертая глава посвящена исследованию особенности взаимодействия митоксантрона с ДНК опухоли саркомы 45. Взаимодействие МХ с опухолевой ДНК (oДНК) исследовано при помощи спектрофотометрического титрования. На рис. 6 показаны спектры поглощения МХ в буфере А при увеличении концентрации oДНК. Как следует из рис. 6 с увеличением концентрации oДНК наблюдается гипохромизм и длинноволновое смещение, но не обнаруживается характерная для всех спектров изобестическая точка, как это наблюдается при взаимодействии МХ с нативной ДНК. Следовательно, МХ при ионной силе $\mu=0,11$ взаимодействует с oДНК по крайней мере двумя различными способами. Определены параметры (K и n), характеризующие одновременное взаимодействие МХ с обоими центрами связывания oДНК. Как следует из рис.6, с увеличением концентрации oДНК до $C_p/C_0 \leq 2,5$, наблюдается изобестическая точка. Изотерма адсорбции была построена с использованием только таких кривых титрования, для которых наблюдается изобестическая точка. Для указанных спектров значение поглощения при насыщении всех центров связывания oДНК было определено при помощи линейной экстраполяции поглощения oДНК было определено при помощи

линейной экстраполяции поглощения при 665нм когда $1/C_p \rightarrow 0$ и построена изотерма связывания с использованием формул (1) и (2).

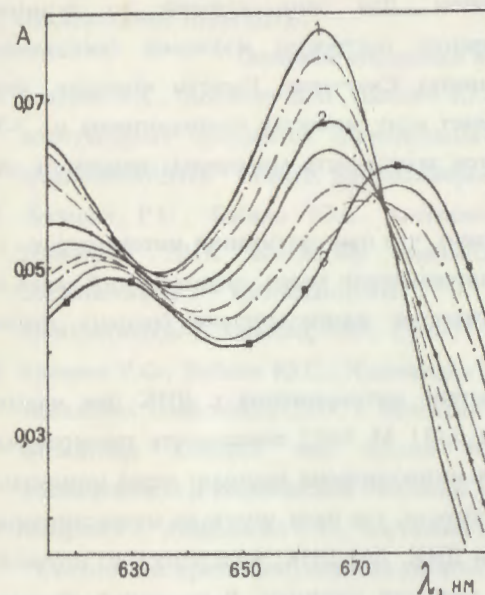


рис.6 Изменение спектров поглощения митоксантрона при связывании с ДНК саркомы 45 в буфере А при 30°C. В процессе титрования концентрация митоксантрона остается постоянной ($C_0=8,1 \cdot 10^{-6}M$ (2) и $C_p=3,9 \cdot 10^{-4}M$ (3)).

Расчеты показали, что для комплексов МХ с oДНК $K \cong 3 \cdot 10^6 M^{-1}$ и $n=2,4 \pm 0,2$.

Константа связывания МХ с oДНК почти на порядок больше, чем для ДНК нормы; стехиометрия насыщения в пределах ошибки измерения п остается постоянной.

Используя значение K, можно найти изменение свободной энергии Гиббса при связывании по формуле (4), что составляет $\Delta G \cong -7,8$ ккал/моль для комплексов oДНК МХ и $\Delta G \cong -9$ ккал/моль для комплексов oДНК МХ. Возможная причина наблюдаемого отличия в значениях K обусловлена, скорее всего, структурными особенностями опухолевых ДНК.

Следовательно, наличие в опухолевых ДНК "дефектных участков" приводит к тому, что увеличивается ее энергия связывания с МХ.

ВЫВОДЫ

1. Исследовано связывание противоопухолевого антибиотика митоксантрона с двуспиральными ДНК при ионной силе 0,11 М и 0,011М NaCl в интервале

- температур 30-60° С методами микрокалориметрии и спектрофотометрии. Исследования показали, что при 0,11 М NaCl митоксантрон взаимодействует с ДНК одним способом. Для этих условий по данным спектрофотометрического титрования построены изотермы связывания митоксантрона с ДНК в координатах Скэтчарда. Расчеты показали, что стехиометрия насыщения составляет одну молекулу митоксантрона на 2-3 пар оснований ДНК. Наблюдается зависимость константы связывания от содержания GC-пар.
2. Впервые экспериментально показано, что при связывании митоксантрона с двуспиральными ДНК, помимо интеркаляции колец, определенный вклад в связывание дает и электростатическое взаимодействие боковых групп митоксантрона.
 3. Впервые исследовано взаимодействие митоксантрона с ДНК при малых заполнениях. Показано, что при 0,011 М NaCl зависимость температуры (T_m) плавления от концентрации митоксантрона проходит через минимум, уменьшение T_m наблюдается в области, где одна молекула митоксантрона приходится на 100 пар оснований ДНК. Для ДНК, выделенной из опухоли саркомы 45, наблюдается более глубокий минимум. В указанной области концентрации митоксантрона энтальпия плавления комплексов линейно увеличивается с увеличением концентрации митоксантрона. Наблюдаемое явление качественно объясняется увеличением энтропии клубкообразного состояния ДНК — лиганд комплекса за счет дополнительной свободы вращения лиганда.
 4. Исследовано взаимодействие противоопухолевого антибиотика митоксантрона с ДНК опухоли саркомы 45. Показано, что взаимодействие митоксантрона с ДНК опухоли саркомы 45 отличается от его взаимодействия с ДНК печени здоровых крыс. Расчеты показали, что стехиометрия насыщения для обоих ДНК составляет одну молекулу митоксантрона приблизительно на 2,5 пары нуклеотидов ДНК с константой связывания $k=4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (при связывании митоксантрона с ДНК печени) а $k=3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (при связывании с ДНК опухоли). Показано, что в опухолевых ДНК наблюдается тенденция к более сильному связыванию.

5. По характеру изменения вида дифференциальной кривой плавления предложен способ исследования избирательности действия соединений на нуклеотидные пары ДНК.

Основные публикации по теме диссертации

1. Казарян Р.С., Асланян В.М., Бабаян Ю.С., Асланян Л.Л. "Влияние противоопухолевых препаратов алкилирующего типа на структуру опухолевой (саркома45) ДНК" Спектр. Биополимеров-V. Харьков,-1984, с. 9-10
2. Казарян Р.С., Бабаян Ю.С. Аветисян М.Г. "Исследование изменения геометрии ДНК вследствие взаимодействия с противоопухолевыми соединениями митоксантрона и аметантрона" Спектроскопия биополимеров-7. Харьков,-1991, с. 20-21.
3. Казарян Р.С., Бабаян Ю.С., Худавердян Н.В., Арутюнян С.Г. "Особенности плавления комплексов ДНК с митоксантроном при малых концентрациях" Междунар. Симпоз. под эгидой ЮНЕСКО "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии Москва, Дубна, 1997", с.13-14.
4. Казарян Р.С., Оганнисян С.С., Арутюнян С.Г., Бабаян Ю.С., Худавердян Н.В. "Связывание противоопухолевых антибиотиков митоксантрона и аметантрона с двуспиральными полирибонуклеотидами" ДАН НАН РА,- 1997, N2, т.97, с. 43-48.
5. Казарян Р.С., Бабаян Ю.С., Карапетян Л.Г., Худавердян Н.В. "Особенности плавления комплексов ДНК с митоксантроном при малых концентрациях" Биофизика.-1997, -т.42. N2, с. 367-371.

Ղևազարյան Ռ-ուզաննա Մուրենի
Հակառուտուցքային միացություն միտոքսանտրոնի փոխազդեցության
ուսումնասիրումը ԴՆԹ-ի մոլեկուլի հետ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ ԴՆԹ, միտոքսանտրոն, կապման թերմոդինամիկական պարամետրեր, կապման իզոթերմ:

Ներկայացված աշխատանքում ուսումնասիրվել է հակառուտուցքային միացություն՝ միտոքսանտրոնի փոխազդեցությունը կրկնակի պարուրային ԴՆԹ-ի հետ 30-50 °C ջերմաստիճանային տիրույթում, 0,1 M և 0,011 M NaCl իոնական ուժերի դեպքում:

Աշխատանքում ցույց է տրված, որ 0,1 M NaCl իոնական ուժի դեպքում, միտոքսանտրոնը փոխազդում է ԴՆԹ-ի հետ միայն ինտերկալացիոն մեխանիզմով: Միաժամանակ, միտոքսանտրոնի երկար կողմնային խմբերը էլեկտրաստատիկորեն փոխազդում են ԴՆԹ-ի բացասական լիցքավորված ֆոսֆատային խմբերի հետ:

Կապման իզոթերմերի միջոցով, որոշվել է կապման հաստատունը և մեկ կապող կենտրոնին բաժին ընկնող զույգ հիմքերի թիվը: Ցույց է տրվել, որ նույն պայմաններում միտոքսանտրոնի և սարկոնա 45 ուռուցքից անջատված ԴՆԹ-ի կոմպլեքսների թերմոդինամիկական պարամետրերը տարբերվում են առողջ հյուսվածքներից անջատված ԴՆԹ-ի կոմպլեքսների համապատասխան պարամետրերից: Սարկոնա 45 ուռուցքից անջատված ԴՆԹ-ի համար դիտվել է ավելի ուժեղ կապման տենդենցիա:

Ուսումնասիրվել է ԴՆԹ-միտոքսանտրոն կոմպլեքսների ջերմակայունությունը միտոքսանտրոնի կոնցենտրացիայի լայն տիրույթում: Ցույց է տրվել, որ միտոքսանտրոնի փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում (երբ մեկ միտոքսանտրոնի մոլեկուլը փոխազդում է ԴՆԹ-ի 100 և ավելի զույգ հիմքերի հետ) միտոքսանտրոնի հարաբերական կոնցենտրացիայից հալման ջերմաստիճանի կախման կորն անցնում է մինիմումով: Սարկոնա 45 ուռուցքից անջատված ԴՆԹ-ի համար դիտվում է ավելի խոր մինիմում: Նշված կոնցենտրացիայի տիրույթում հալման էնթալպիայի աճը գծային է: Տրվել է դիտված ֆենոմենի որակական բացատրությունը: Ենթադրվում է, որ այն անմիջականորեն առնչվում է միտոքսանտրոնի ընտրողական հակառուտուցքային ակտիվության հետ: