

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

на правах рукописи
УДК 577.323.43

СНГРЯН АКОП ЕГОРОВИЧ

КООПЕРАТИВНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ
КИСЛОТ В КОМПЛЕКСЕ С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ
ПРЕПАРАТАМИ.

Գ 00.02 - Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

*на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук*

ЕРЕВАН 1997

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ և ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ձեռագրի իրավունքով
ՈՒՏԳ-577.323.43

ՄՆԳՐՅԱՆ ՀԱԿՈՒԲ ԵԳՈՐԻ

ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՀԱԿԱՌՈՒՈՒՅՔԱՅԻՆ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՀԵՏ ԿՈՄՊԼԵՔՍԵՐԻ ԿՈՂՊԵՐԱՏԻՎ ՓՈԽԱՐԿՈՒՄՆԵՐԸ

Գ. 00.02.-Կենսաֆիզիկա

*Ֆիզիկամաթեմատիկական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսություն*

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ -1997

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

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор Ю.С. БАБАЯН

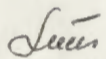
Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор В.И. ИВАНОВ
доктор биологических наук,
профессор П.О.ВАРДЕВАНЯН

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии
НАН Республики Армения

Защита состоится "25" июля 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 "24" июня 1997 г.

Ученый секретарь Специализированного
Совета, кандидат биологических наук  С.А. ГОНЯН

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Исследование кооперативных переходов нуклеиновых кислот в комплексе с различными фармакологически активными соединениями является одним из наиболее важных задач в молекулярной биофизике, так как многие соединения, проникая в клетку, связываются в основном с нуклеиновыми кислотами, чем и обусловлено их влияние на организм. 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 изменения термодинамических параметров. Следовательно, вследствие комплексообразования нуклеиновых кислот с биологически активными веществами должна изменяться конформация нуклеиновых кислот. Исследование конформационного состояния комплексов фармакологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами актуально еще и тем, что анализ полученных данных позволит также определить и пути улучшения лекарственных препаратов, понять молекулярный механизм их действия. Выяснению возможных конформационных переходов в ДНК при связывании с различными биологически активными соединениями, в том числе и противоопухолевыми соединениями, посвящено огромное количество экспериментальных и теоретических работ. В этих работах подробно исследованы конформации ДНК и РНК, выяснены закономерности конформационных переходов и влияние различных факторов на кооперативные превращения. Однако, сравнительно недавно был синтезирован новый класс противоопухолевых соединений, которые связываются с ДНК интеркаляционным способом и одновременно могут электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфатными группами. Примерами таких противоопухолевых соединений могут служить митоксантрон и аметантрон. Конформация и возможные конформационные переходы правоспиральных и левоспиральных ДНК и РНК в комплексе с такими соединениями почти не исследованы.

Цель и задачи исследования. Исследование конформационного состояния нуклеиновых кислот в комплексе с противоопухолевыми соединениями

митоксантрон и аметантрон и выяснение влияния нового алкилирующего препарата имидазен на ДНК. В задачи диссертации входило:

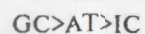
- при помощи спектров кругового дихроизма исследовать возможные конформационные изменения ДНК и РНК при связывании с митоксантроном и аметантроном;
- взаимодействие митоксантрона и аметантрона с правоспиральными (В и А) и левоспиральными (Z) нуклеиновыми кислотами, влияние исследуемых соединений на В→Z равновесие;
- изучение влияния *in vivo* и *in vitro* алкилирующего противоопухолевого соединения имидазена на ДНК.

Научная новизна.

- впервые исследовано взаимодействие митоксантрона и аметантрона с левоспиральной Z-формой ДНК, реализуемой в концентрированном растворе NaCl. Показано, что исследуемые соединения не связываются с Z-ДНК. Они затрудняют, но не ингибируют В→Z переход.
- показано, что характер взаимодействия митоксантрона и аметантрона с В-ДНК сильно зависит от ионной силы раствора. В физиологическом растворе взаимодействие носит в основном интеркалирующий характер, одновременно длинные боковые алифатические группы электростатически взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК.
- судя по относительному изменению дихроичного поглощения для трех исследованных полинуклеотидов с чередующейся последовательностью оснований наблюдается следующая закономерность в характере изменения геометрии пар оснований вследствие взаимодействия с митоксантроном и аметантроном:



- при малых ионных силах ($\mu < 0.1$) митоксантрон и аметантрон взаимодействуют с ДНК и РНК по крайней мере двумя различными способами. Судя по относительному изменению дихроичного поглощения для трех комплексов полинуклеотидов с митоксантроном наблюдается следующая закономерность в способности изменять геометрию пар оснований при взаимодействии с одной молекулой митоксантрона или аметантрона:



- предложен метод исследования влияния фармакологически активных соединений с ДНК при помощи дифференциальных кривых плавления,

- впервые экспериментально исследовано влияние противоопухолевого соединения имидазена с ДНК и показано, что имидазен в сочетании с РНК лучше восстанавливает характеристики ДНК опухоли саркомы 45.

Практическая ценность. Полученные результаты имеют непосредственное отношение к молекулярной медицине. Прежде всего, они представляют интерес для химиотерапии опухоли, при разработке новых эффективных противоопухолевых соединений и поиске оптимальных путей направленного синтеза биологически активных соединений и экспресс-анализа их молекулярного действия.

Разработанный способ анализа дифференциальных кривых плавления уже используется в ИТОХ НАН РА для характеристики вновь синтезированных противоопухолевых препаратов.

Результаты работы используются в лекционных курсах по конформационным переходам в нуклеиновых кислотах в ЕрГУ и могут быть рекомендованы для учебных заведений, где есть специализации по биофизике и молекулярной фармакологии.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на семинарах кафедры молекулярной физики ЕрГУ, на юбилейной научной конференции, посвященной 30-летию основания отделения биофизики биологического факультета ЕрГУ (Ереван, 1996) и на международном симпозиуме "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии" (Дубна, 1997).

По теме диссертации опубликованы 4 научные работы.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы (103 ссылки). Она содержит 92 страницы, в том числе 17 рисунков и 1 таблица.

Содержание работы.

В первой главе приводятся данные о конформационных превращениях в нуклеиновых кислотах, влияние различных низкомолекулярных соединений на конформационное состояние ДНК и РНК.

Во второй главе приводятся описание материалов и методики исследований, рассмотрен процесс самоассоциации митоксантрона.

В работе были использованы следующие препараты нуклеиновых кислот (НК): ДНК тимуса теленка ("Sigma"), поли[d(A-T)], поли[d(G-C)], поли[d(A-C)]-поли[d(G-T)] и поли[d(I-C)] ("P.L. Biochemicals"), поли(A)-поли(U),

поли(И)-поли(С), поли(Г)-поли(С) ("Pharmacia") и ДНК печени крысы опухоли саркомы 45 (выделено в ИТОХ НАН РА, Д.В.Гарибян).

В работе использованы следующие биологически активные соединения: бромистый этидий, митоксантрон, аметантрон, имидазен. Бромистый этидий, митоксантрон и аметантрон представляют препараты фирмы "Farmitalia". Имидазен - новое алкилирующее противоопухолевое соединение, синтезированное в ИТОХ НАН Республики Армения, запатентованное в 1993 году, в настоящее время находится на стадии предклинического изучения.

Исследования проводились: в водном растворе, содержащем 0.1 М NaCl, 0.01 М Трис, 0.5 мМ ЭДТА, рН 7.4 (буфере А) и 0.01 М NaCl, 1 мМ Трис, 0.5 мМ ЭДТА, рН 7.4 (буфере Б). Трис, ЭДТА, NaCl - препараты фирмы "serva".

Спектры поглощения и кривые плавления реализованы на спектрофотометрах "Cary - 219" (США) и "Unicam SP - 8-100" (Англия).

Спектры кругового дихроизма (КД) сняты на дихрографах "Jasco J-500А" (Япония) и "Roussel - Jouan 2" (Франция).

Самопроизвольная ассоциация плоских циклических молекул в растворе. При исследовании характера связывания низкомолекулярных соединений с нуклеиновыми кислотами и последующем определении термодинамических величин связывания необходимо работать с такими концентрациями низкомолекулярных соединений, при которых можно пренебречь процессом ассоциации молекул. Исследованные соединения содержат циклы и имеют функциональные группы, способные образовать водородные связи между собой, и поэтому, возможно образование физических (стопкообразование) и химических ассоциатов этих молекул, что должно приводить к неточности в количественных расчетах. Поэтому специально рассмотрен процесс самопроизвольной ассоциации молекул и вычислена максимальная концентрация, при которой в пределах погрешности эксперимента можно пренебречь процессом ассоциации. Расчеты показывают, что процессом самоассоциации молекул бромистого этидия можно пренебречь при концентрациях $C_0 < 10^{-4}$ М, а молекул митоксантрона или аметантрона - $C_0 < 5 \cdot 10^{-6}$ М.

Применение дифференциальных кривых плавления для исследования ДНК. Возможные структурные изменения молекул ДНК, которые происходят как при изменении структуры самой молекулы ДНК вследствие трансформации клетки, так и при взаимодействии с окружающими ДНК молекулами, приводят к

изменению кривой плавления ДНК. Однако, очень часто, на кривых плавления особенности первичной и вторичной структуры ДНК проявляются слабо. Поэтому, целесообразно переходить к дифференциальным кривым плавления (ДКП), в которых даже незначительные изменения кривой плавления выявляются в виде пиков. ДКП были получены путем численного дифференцирования нормированных кривых плавления. Программа дифференцирования предназначена для получения сглаженной ненормированной, сглаженной нормированной кривой плавления и ее первой производной.

В данной работе ДКП применяется для исследования влияния алкилирующего противоопухолевого препарата имидазена на структуру ДНК опухоли саркомы 45.

Третья глава посвящена влиянию митоксантрона и аметантрона на геометрии спирали ДНК и РНК, исследованию их взаимодействия с левоспиральной Z-ДНК, влиянию на В→Z равновесие.

Изменение геометрии В-формы ДНК вследствие взаимодействия с противоопухолевыми соединениями митоксантрона и аметантрона.

Рассмотрено взаимодействие митоксантрона и аметантрона с ДНК по характеру изменения спектров КД в буфере А, при ионной силе $\mu=0.11$. Как было показано в работах Ю.С. Бабаяна, митоксантрон и аметантрон в буфере А взаимодействуют с ДНК предпочтительно интеркалирующим способом. Экспериментально получили, что с увеличением концентрации митоксантрона при постоянной концентрации ДНК изменяется КД спектр (рис. 1).

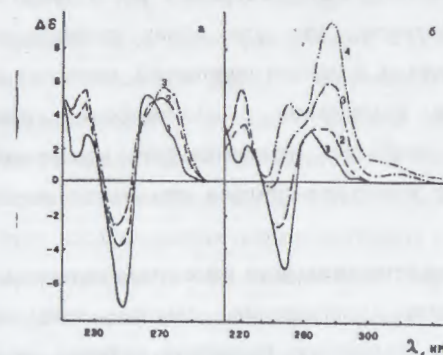


Рис. 1. Изменение спектров КД поли[d(A-T)] при связывании с митоксантроном: а- $C_p=4.0 \cdot 10^{-5}$ М в буфере А при 3-х концентрациях митоксантрона $C_0/C_p=0$ (1), 0.13 (2), и 0.22 (3); б- $C_p=2.7 \cdot 10^{-5}$ М в буфере С при 4-х концентрациях митоксантрона $C_0/C_p=0$ (1), 0.12 (2), 0.27 (3) и 0.3 (4).

Это свидетельствует о том, что вследствие взаимодействия с митоксантроном геометрия спирали ДНК изменяется, так как митоксантрон не является оптически активным и не становится таким и вследствие связывания с ДНК. Для характеристики степени изменения геометрии спирали исследовано поведение относительного изменения дихроичного поглощения в максимуме ($\Delta\epsilon^{(m)}/\Delta\epsilon^{(o)}$) в зависимости от относительной концентрации митоксантрона или аметантрона в растворе (C_o/C_p).

С увеличением числа молекул митоксантрона, приходящихся на пару оснований ДНК, т.е. C_o/C_p , вначале величина $\Delta\epsilon^{(m)}/\Delta\epsilon^{(o)}$ увеличивается линейно, а потом, при сравнительно больших C_o/C_p , стремится к насыщению, что видно на рис. 2, где приведены зависимости относительного изменения $\Delta\epsilon_{\max}$ от концентрации митоксантрона для различных ДНК. Величина $\Delta\epsilon^{(m)}/\Delta\epsilon^{(o)}$ с увеличением C_o/C_p слабо изменяется для ДНК *M. Lysodeikticus* и сильно - для поли[d(G-T)]-поли[d(A-C)]. Судя по относительному изменению величины $\Delta\epsilon$, для трех исследованных случаев наблюдается следующая закономерность в характере изменения геометрии пар оснований вследствие взаимодействия с митоксантроном:



Такие же результаты получены и при исследовании взаимодействия аметантрона с ДНК.

Исследовались также зависимости $\Delta\epsilon^{(m)}/\Delta\epsilon^{(o)}$ от C_o/C_p , вычисленные в максимуме и минимуме спектров КД для комплексов митоксантрона и аметантрона с поли[d(G-C)], чтобы получить информацию об относительной эффективности изменения геометрии спирали ДНК, когда связывается, соответственно, одинаковое количество молекул митоксантрона и аметантрона с парами оснований ДНК (рис. 3). Получено, что для обоих комплексов увеличение числа молекул лиганда, связанных с парами оснований, приводит к увеличению $\Delta\epsilon_{273}^{(m)}/\Delta\epsilon_{273}^{(o)}$, причем для комплексов с аметантроном при сравнительно малых значениях C_o/C_p линейность относительного изменения спектров КД нарушается, т.е. изменение геометрии спирали становится менее выраженным.

Такая же картина наблюдается и для относительного изменения минимума дихроичного поглощения. Следовательно, связывание одной молекулы аметантрона приводит к более сильному изменению геометрии спирали, чем связывание митоксантрона.

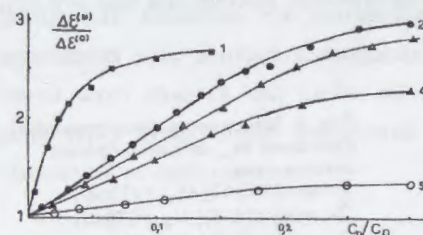


Рис.2. Зависимость относительного изменения $\Delta\epsilon_{\max}$ от концентрации митоксантрона: 1-поли[d(G-T)] * поли[d(A-C)] ($\lambda_{\max}=280\text{nm}$), 2- поли[d(G-C)] ($\lambda_{\max}=273\text{nm}$), 3- поли[d(I-C)] ($\lambda_{\max}=264\text{nm}$), 4- поли[d(A-T)] ($\lambda_{\max}=278\text{nm}$) и 5- *M.Lys.* ($\lambda_{\max}=270\text{nm}$).

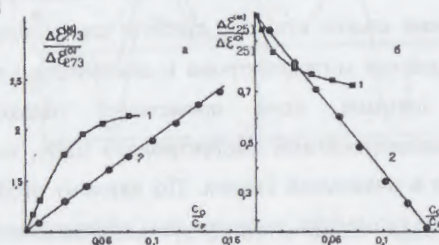


Рис.3. Зависимость относительного изменения максимума (а) и минимума (б) дихроичного поглощения поли[d(G-C)] от концентрации лекарственных соединений: 1-аметантрон, 2-митоксантрон.

Рассмотрено также влияние температуры на характер изменения величины $\Delta\epsilon^{(m)}/\Delta\epsilon^{(o)}$ при взаимодействии митоксантрона и аметантрона с ДНК. Исследовалось дихроичное поглощение при 270 нм при взаимодействии митоксантрона с ДНК *M. Lysodeikticus* при температурах 30° и 50° С. Величина $\Delta\epsilon_{270}^{(m)}/\Delta\epsilon_{270}^{(o)}$ изменяется более сильно при взаимодействии при 30° С. Исследовалось также взаимодействие митоксантрона и аметантрона с ДНК в буфере Б при ионной силе $\mu=0.011$. Показано (рис. 1,б), что увеличение числа молекул митоксантрона, связанных с парами оснований, приводит к изменению спектров КД, причем при $\mu=0.011$ митоксантрон взаимодействует с ДНК по крайней мере двумя различными способами. Из зависимости $\Delta\epsilon^{(m)}/\Delta\epsilon^{(o)}$ от C_o/C_p для комплексов ДНК - митоксантрон следует, что с увеличением C_o/C_p увеличивается $\Delta\epsilon^{(m)}/\Delta\epsilon^{(o)}$, причем не линейно, как это наблюдается при интеркаляционном связывании, а более круто (рис. 4). При сравнительно больших значениях C_o/C_p величина $\Delta\epsilon$ стремится к насыщению. Для комплексов трех исследованных полинуклеотидов с митоксантроном наблюдается следующая закономерность в способности изменять геометрию пар оснований в зависимости от последовательности оснований при взаимодействии с одной молекулой митоксантрона:

GC>IC>AT

Эта закономерность отличается от аналогичной, полученной при $\mu=0.011$.

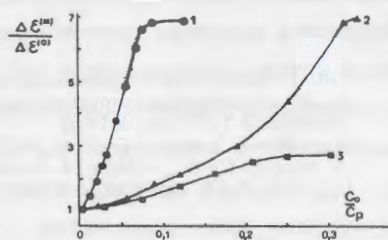


Рис.4. Зависимость относительного изменения $\Delta \epsilon_{\max}^{\lambda}$ от концентрации митоксантрона:

- 1- поли[d(G-C)] ($\lambda_{\max}=273\text{nm}$),
- 2- поли[d(A-T)] ($\lambda_{\max}=278\text{nm}$),
- 3- поли[d(I-C)] ($\lambda_{\max}=264\text{nm}$).

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что по характеру изменения спектров КД при взаимодействии можно судить о степени изменения геометрии пар оснований ДНК при связывании митоксантрона и аметантрона с ДНК. Согласно экспериментальным данным, если происходит только интеркаляционное взаимодействие митоксантрона или аметантрона с ДНК, то зависимость $\Delta \epsilon^{\lambda} / \Delta \epsilon^{\lambda(0)}$ от C_0 / C_p - линейная в начальной стадии. По наклону этой кривой можно судить о степени изменения геометрии спирали при образовании комплекса с лигандом. Согласно экспериментальным данным (рис. 2), наибольшее изменение геометрии спирали наблюдается для комплекса поли[d(G-T)]-поли[d(A-C)] с митоксантроном или аметантроном. Наличие двух различных способов связывания приводит к тому, что дихроичное поглощение увеличивается более круто.

Взаимодействие митоксантрона и аметантрона с Z-формой ДНК, их влияние на $B \rightleftharpoons Z$ переход в молекулах поли[d(G-C)], стимулированный NaCl. Молекулы поли[d(G-C)] полностью переходят в Z-форму, когда концентрация NaCl больше, чем 2.5 M [Rohl, 1972].

В то же время, если все центры связывания полимера заняты интеркаляторами, то $B \rightleftharpoons Z$ переход не наблюдается при увеличении концентрации NaCl. Поэтому исследовалось связывание митоксантрона и аметантрона с поли[d(G-C)], когда полимер находится в B-форме и в Z-форме, стимулированной 3.1M NaCl. На рис. 5. показаны спектры КД поли[d(G-C)] в буфере А, где полимер находится в B-форме, и при добавлении в буферный раствор 3M NaCl, где полимер находится в Z-форме. Во всех растворах добавлен митоксантрон. Из рис. 5 видно, что добавление митоксантрона в раствор, где полимер находится в B-форме, приводит к изменению спектров КД. А когда митоксантрон добавляется в раствор, где поли[d(G-C)] находится в Z-форме, то

спектры КД изменений не претерпевают, что можно объяснить отсутствием связывания. Отметим, что концентрация митоксантрона почти достаточна для насыщения всех центров связывания. Спектры КД указанных растворов были сняты через каждый час, чтобы выяснить кинетику закономерностей. Однако, даже через сутки после добавления митоксантрона в спектрах КД заметных изменений не наблюдается.

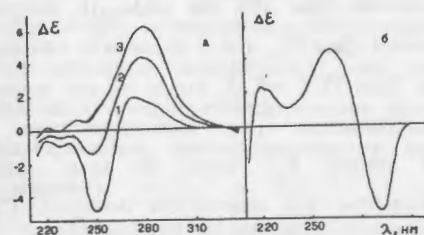


Рис.5. Спектры КД поли[d(G-C)] ($c=5.01 \cdot 10^{-5}$ M/P) в буфере А при различных концентрациях соли митоксантрона при 25 °С.: а - 0.1 M NaCl и митоксантрон при D/P=0 (1), 0.15 (2) и 2 (3), б - 3.1 M NaCl при любых концентрациях митоксантрона. D - концентрация митоксантрона, P - концентрация фосфатных групп поли[d(G-C)].

Аналогичные результаты были показаны и для комплексов поли[d(G-C)] с аметантроном. Как следует из рис.5б, независимо от концентрации митоксантрона, поли[d(G-C)] в растворе, содержащем 3.1 M NaCl, находится в Z-форме. Предполагается, что митоксантрон и аметантрон также взаимодействуют с Z-ДНК по механизму, предложенному в работе [Rohl, 1972]. Согласно этой работе, связывание лиганда приводит к локальному изменению конформации полимера из левоспиральной в правоспиральную, вследствие чего, когда не все центры связывания заняты, полимер распадается на право- и левоспиральные участки. Однако, этому мешает большая ионная сила раствора ($\mu=3.1\text{M NaCl}$). Поэтому исследованы спектры КД ДНК M. Lysodeikticus, которая всегда находится в правоспиральной форме, при добавлении в раствор ДНК митоксантрона и аметантрона при $\mu=3.1\text{M NaCl}$. Как показывают КД спектры этих растворов, с увеличением концентрации митоксантрона наблюдаются некоторые изменения в спектрах КД, обусловленные взаимодействием ДНК с митоксантроном. На основании вышесказанного, причина наблюдаемого постоянства спектров КД Z-формы ДНК при добавлении митоксантрона (рис.5б) обусловлена левоспиральностью конформации молекул поли[d(G-C)] и особенностью взаимодействия митоксантрона с Z-ДНК. Исследовалась также кинетика $B \rightarrow Z$ перехода в молекулах поли[d(G-C)] в комплексе с митоксантроном и аметантроном.

Исследовались спектры КД комплексов через 40 мин после добавления в буферный раствор полимера, содержащий митоксантрон или аметантрон при одинаковых концентрациях (одна молекула лиганда на 2 пары оснований), 3М NaCl и кинетика В→Z перехода в аналогичных условиях.

На рис.6 приведены исследованные спектры КД, на том же рисунке приведены для сравнения также эти же зависимости и для комплексов поли[d(G-C)] с этидиум бромидом и для чистого поли[d(G-C)]. В присутствии этидиум бромидом изменение дихроичного поглощения при 295 нм ($\delta(\Delta\epsilon_{295})$), которое характеризует В→Z переход, мало во времени (рис.6б), что и следовало ожидать, основываясь на результаты работы Пола. При D/P = 0.25, когда не все центры связывания насыщены, полимер распадается на левоспиральные и правоспиральные участки. Суммарный спектр КД через 40 мин. после добавления соли показан на рис.6б. Спектры КД комплекса поли[d(G-C)]-этидиум бромид

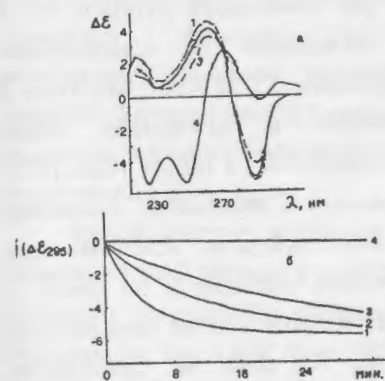


Рис.6. а - спектры КД поли[d(G-C)] ($c=5.01 \cdot 10^{-5}$ М/Р) (1) и комплексов с митоксантроном (2), аметантроном (3) и этидиум бромидом (4) в буфере А через 40 мин после добавления 3 М NaCl при 25 °С. Для всех комплексов D/P=0.25. б - характер изменения дихроичного поглощения при 295 нм во времени при В→Z переходе для тех же растворов.

имеют несколько иную форму, что обусловлено присутствием этидиум бромидом, так как этидиум бромид оптически активен и имеет дихроичное поглощение и в области активности ДНК, и вне ее. Как видно из рис.6а, при связывании митоксантрона и аметантрона затруднен В→Z переход, стимулированный NaCl. Через 40 мин. после добавления 3М NaCl в буфере раствора, содержащем комплексы поли[d(G-C)] - МХ и поли[d(G-C)] - АМ спектры КД по амплитуде немного отличаются от КД спектров Z-ДНК без лиганда. Уже через час после добавления соли, спектры совпадают (кривые 1-3 рис.6а). Полученные результаты не меняются, если все исследования провести и при больших

температурах. При D/P ≈ 5, когда почти все центры связывания полимера заняты, общие закономерности наблюдаемого В→Z перехода сохраняются. Как видно из рис.6б, скорости В→Z перехода в начальной стадии не одинаковы для исследованных систем. В комплексе с митоксантроном В→Z переход легче осуществляется, чем в комплексе с аметантроном. Но оба случая более затрудняют переход, чем в случае чистого полимера.

Исходя из вышеизложенного, можно прийти к заключению, что митоксантрон и аметантрон затрудняют В→Z переход, стимулированный NaCl-ом в молекулах поли[d(G-C)], они не ингибируют данный переход, как это происходит в присутствии этидиум бромидом. Это говорит о том, что характеры взаимодействия митоксантрона и аметантрона с ДНК в какой-то мере отличаются.

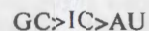
Взаимодействие митоксантрона и аметантрона с А-формой.

Известно, что ДНК находится в А-форме в водно-этанольном растворе (Иванов,1973). Взаимодействие фармакологически активных соединений с ДНК в водно-этанольном растворе сильно отличается от их взаимодействия в водной среде. Поэтому, чтобы исследовать интелекационное взаимодействие митоксантрона и аметантрона с А-формой и возможные конформационные превращения нуклеиновых кислот при связывании, мы исследовали взаимодействие исследуемых соединений с двуспиральными синтетическими РНК, которые, как известно (Иванов,1973) в физиологическом растворе находятся в А-форме, параметре, которые не сильно отличаются от соответствующих параметров для А-формы ДНК.

Изменения в спектрах КД при взаимодействии митоксантрона и аметантрона с двуспиральными полирибонуклеотидами полиА-полиУ, полиG-полиI и полиI-полиC аналогичны изменениям в спектрах КД при взаимодействии данных соединений с ДНК. Как показывают экспериментальные данные, полученные при $\mu=0.11$ и 30 °С, с увеличением концентрации митоксантрона или аметантрона при постоянной концентрации полирибонуклеотидов, заметных изменений в спектрах КД не наблюдается. При ионной силе $\mu=0.011$ картина меняется. В этом случае при добавлении митоксантрона или аметантрона спектры КД изменяются, причем произвольным образом.

Наблюдается избирательность связывания митоксантрона с различными рибонуклеотидными парами. По величине изменения геометрии А-формы

вследствие взаимодействия с митоксантроном при $\mu=0.011$, рибонуклеотидные пары можно расположить в ряд:



Четвертая глава посвящена влиянию имидазена на ДНК печени здоровых крыс и ДНК опухоли саркомы 45 *in vivo* и *in vitro*. Рассматривается также влияние имидазена при сочетанном применении с де РНК.

Влияние имидазена на ДНК *in vitro*.

К раствору ДНК добавили имидазен в различных концентрациях (10^{-6} - 10^{-5}), смесь инкубировали при комнатной температуре 18-20 ч, после чего исследовали ДНК. 10^{-5} М - это предельная концентрация для спектрофотометрических исследований.

Для выяснения способности имидазена взаимодействовать с азотистыми основаниями находящимися как в спиральном, так и в клубкообразном состоянии, были исследованы дифференциальные спектры. Дифференциальные спектры сливали в четырех кюветах при температурах 30 и 75° С в буферах А и В при концентрациях имидазена $2 \cdot 10^{-6}$ и $8 \cdot 10^{-6}$ М, в интервале длин волн 225-800 нм. Эксперименты показывают, что почти не наблюдается отклонение от нулевой линии. Поэтому, можно утверждать, что имидазен не влияет на электронный спектр азотистых оснований, а следовательно, не взаимодействует с нуклеотидными парами ДНК.

Были получены также дифференциальные кривые плавления (ДКП) ДНК выделенной из печени здоровых крыс и опухоли саркомы 45 опухоленосящих крыс в присутствии $8 \cdot 10^{-6}$ М имидазена (рис. 7).

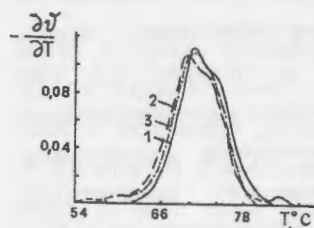


Рис.7. Дифференциальные кривые плавления ДНК печени и саркомы 45 при действии имидазена *in vitro*. 1 - печень здоровых крыс; 2 - саркомы 45; 3 - саркомы 45 при действии $8 \cdot 10^{-6}$ М имидазена *in vitro*.

Как показывают экспериментальные данные, температура (T_m) и интервал (ΔT) плавления ДНК опухоли саркомы 45 под действием $8 \cdot 10^{-6}$ М имидазена увеличиваются соответственно на 0.5 и 0.3° , однако все еще остаются

значительно меньше, чем у ДНК печени здоровых крыс. На ДКП (рис. 7) практически сохраняются все низкотемпературные особенности ДНК опухоли.

ДКП ДНК опухоли лишь немного ($\sim 0.5^\circ$) смещается в сторону ДКП ДНК печени здоровых крыс. Под действием имидазена *in vitro* не меняются и параметры плавления ДНК печени. Можно предположить, что небольшие изменения в параметрах плавления и ДКП ДНК опухоли саркомы 45 под воздействием имидазена *in vitro* обусловлены влиянием имидазена на структуру и свойства гидратной воды ДНК. Приведенные данные показывают, что под действием имидазена *in vitro* характерные особенности ДНК опухоли саркомы 45 остаются почти неизменными. Следовательно, влияние имидазена на ДНК опухоли саркомы 45 *in vitro* обусловлено не непосредственным взаимодействием имидазена с опухолевой ДНК, а избирательно действующим на ДНК опухоли каким-то промежуточным механизмом.

Влияние имидазена на ДНК *in vivo*.

В опытах использовали ДНК, выделенную из печени здоровых крыс и опухоли саркомы 45. Вводили в организм имидазен и дрожжевую РНК внутривенно в изотоническом растворе хлорида натрия. Суммарная доза составляла для РНК - 100 мг/кг, имидазена - 60 мг/кг, как при раздельном, так и совместном применении. Имидазен вводили в течении 8 дней, имидазен в сочетании с РНК - через день.

В работах Бабаяна показано, что при помощи ДКП можно отличить ДНК опухоли саркомы 45 (оДНК) от ДНК, выделенных из печени здоровых крыс (здНК). Было показано, что ДКП оДНК смещены относительно ДКП здНК в сторону низких температур и на ДКП здНК появляются дополнительные пики в области $54-61^\circ$ С, которые отсутствуют для здНК. Не углубляясь в природу образования особенностей на ДКП оДНК, исследовано влияние имидазена и имидазена в сочетании с двуспиральной РНК на структуру оДНК, исходя из характера изменения ДКП оДНК под действием этих соединений с одновременным сравнением с ДКП здНК.

Как показывают экспериментальные данные, под действием только имидазена и имидазена в сочетании с РНК почти исчезают характерные для оДНК низкотемпературные пики в области $54-62^\circ$ С и ДКП оДНК по виду приближается к таковой для здНК, однако вся кривая все еще остается смещенной в сторону низких температур по сравнению с ДКП здНК

(для имидазена на ~ 1 , а в сочетании с РНК на ~ 0.5 град). Несовпадение ДКП оДНК под действием только имидазена и в сочетании с дсРНК, указывает на присутствие в молекулах оДНК под действием указанных препаратов участков с различными структурными особенностями.

Одновременно, под действием имидазена изменяются также параметры плавления (T_m и ΔT), приближаясь к соответствующим параметрам зДНК.

Таким образом, при помощи ДКП и параметров плавления можно судить об эффективности влияния фармакологически активных соединений на структуру ДНК на молекулярном уровне.

ВЫВОДЫ.

1. Впервые исследовано взаимодействие противоопухолевых антибиотиков митоксантрона и аметантрона с левоспиральной Z-формой ДНК, реализуемой в поли[d(G-C)] в концентрированных растворах NaCl. Показано, что исследуемые соединения не связываются с левоспиральной Z-формой. Они затрудняют, но не ингибируют В-Z переход, как это происходит для классических интеркаляторов [1].
2. При помощи спектров кругового дихроизма показано, что характер взаимодействия митоксантрона и аметантрона с В-формой ДНК сильно зависит от ионной силы раствора. В физиологическом растворе взаимодействие носит в основном интеркалирующий характер, одновременно длинные боковые алифатические группы электростатически взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. При малых ионных силах ($\mu < 0.1$) [2] митоксантрон и аметантрон взаимодействуют с ДНК и РНК по крайней мере двумя различными способами. Наблюдается следующая закономерность в способности изменять геометрию пар оснований при взаимодействии с одной молекулой митоксантрона: при $\mu = 0.11$ GC>IC>AT.
3. Показано, что характер взаимодействия митоксантрона и аметантрона с А-формой мало отличается от связывания с В-формой, несмотря на то, что геометрии спиралей существенно отличаются друг от друга.
4. Впервые экспериментально исследовано влияние противоопухолевого соединения имидазена на ДНК. При помощи дифференциальных кривых плавления выяснено влияние имидазена на структуру ДНК опухоли саркомы

45 опухоленосящих крыс и ДНК печени здоровых крыс *in vitro* и *in vivo*. Показано, что имидазен в сочетании с дс РНК лучше восстанавливает характеристики ДНК опухоли саркомы 45. Вопреки экспериментально наблюдаемой избирательности влияния этих соединений на клеточном уровне показано, что не наблюдается избирательность влияния этих соединений на ДНК опухоли и нормы [3].

5. Предложен метод исследования влияния фармакологически активных соединений с ДНК при помощи дифференциальных кривых плавления [4].

Основные публикации по теме диссертации.

1. Казарян Р.С., Снгрян А.Е., Сукиасян Г.Ц., Согомонян Л.Р., Бабаян Ю.С. "Влияние митоксантрона и аметантрона на В→Z переход" \ \ Материалы научной конференции посвященной 30-летию основания отдела биофизики биологического факультета ЕГУ, Ереван, 1996 г., ст. 44-45.
2. Бабаян Ю.С., Снгрян А.Е., Казарян Р.С., Аветисян М.Г., Согомонян Л.Р. "Исследование взаимодействия противоопухолевых соединений митоксантрона и аметантрона с ДНК по характеру изменения спектров кругового дихроизма" \ \ Биофизика, 1997 г., (принято в печать).
3. Бабаян Ю.С., Худавердян Н.В., Снгрян А.Е., Гарибян Д.В., Даниелян И.С. "Влияние имидазена в сочетании с РНК на структуру ДНК саркомы 45" \ \ Биофизика, 1997 г., т. 42, №1, ст.125-128.
4. Бабаян Б.С., Снгрян А.Е., Казарян Р.С., Худавердян Н.В., Арутюнян С.Г. "Особенности плавления комплексов ДНК с митоксантроном при малых концентрациях" \ \ Международный симпозиум под эгидой ЮНЕСКО "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии", Москва, Дубна, 1997 г., ст. 13-14.

ՄՆԳՐՅԱՆ ՀԱԿՈՔ ԵԳՈՐԻ

Նուկլեինաթթուների հակառուտուցքային միացությունների

հետ կոմպլեքսների կոոպերատիվ փոխարկումներ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ ԴՆԹ, ՌՆԹ, աջ և ձախ պարույր, կոնֆորմացիոն անցումներ, միտոքսանտրոն, ամետանտրոն, իմիդազեն:

Հայտնի է, որ համարյա բոլոր հակառուտուցքային միացությունները թափանցելով բջիջ, փոխազդում են ԴՆԹ-ի հետ, որով և պայմանավորված է նրանց հակառուտուցքային ակտիվությունը: Ներկայացված աշխատանքում ուսումնասիրվել է նուկլեինաթթու-հակառուտուցքային միացություն (միտոքսանտրոն և ամետանտրոն) կոմպլեքսներում կատարվող կոոպերատիվ կոնֆորմացիոն փոխակերպումները: Միաժամանակ ուսումնասիրվել է համեմատաբար վերջերս ՀՀ ԳԱԱ Նուրբ օրգանական քիմիայի ինստիտուտում սինթեզված իմիդազեն հակառուտուցքային միացության ազդեցությունը սարկոմա 45 ուռուցքից և առողջ առնետների լյարդից անջատված ԴՆԹ-ի վրա, կատարված է եզրակացություն այդ միացության կլինիկական օգտագործման հնարավորության վերաբերյալ:

Աշխատանքում ցույց է տրված, որ շնորհիվ ալիֆատիկ երկար կողմնային խմբերի առկայության միտոքսանտրոն-ԴՆԹ և ամետանտրոն-ԴՆԹ կոմպլեքսների կոնֆորմացիոն հատկություններն էապես տարբերվում են դասական իմտերկայատորի համար դիտվող օրինաչափություններից: Ուսումնասիրվել է այդ միացությունների փոխազդեցությունը Z փոխպարույրային կառուցվածք ունեցող պոլի[dG-dC] պոլիմուկլեոդիտի հետ և B→Z կոնֆորմացիոն անցումների առանձնահատկությունները միտոքսանտրոնի և ամետանտրոնի ներկայությամբ:

Ցույց է տրված, որ միտոքսանտրոնը և ամետանտրոնը չեն արգելակում B→Z անցումը, չնայած էապես դանդաղեցնում են: B- և A-կոնֆորմացիաների հետ միտոքսանտրոնի փոխազդեցության ժամանակ դիտվում են համարյա նույն օրինաչափությունները:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ իմիդազենը անմիջական չի փոխազդում ԴՆԹ-ի հետ: in vivo հետազոտությունների ժամանակ ստացվել է, որ իմիդազենի ազդեցության տակ սարկոմա 45 ուռուցքից անջատված ԴՆԹ-ի կառուցվածքը բնութագրող պարամետրերը մոտենում են առողջ առնետի լյարդից անջատված ԴՆԹ-ի համապատասխան պարամետրերին: Ենթադրվում է, որ կոմպլեքսների հալման դիֆերենցիալ կորերի ուսումնասիրության միջոցով հնարավոր է պարզաբանել հակառուտուցքային միացությունների ազդեցության մոլեկուլային մեխանիզմները: