

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОДИФИЦИРОВАННОГО ТИОТЭФОМ АЛКАЛОИДА ЧИСТОТЕЛА БОЛЬШОГО АМИТОЗИНА¹ С ТИМУСНОЙ ДНК В ПРИСУТСТВИИ ОКРАШЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МЕТОК

Е.Б. Круглова¹, Е.Л. Ермак², Т.П. Волощук³, Ю.А. Потопальская³,
А.И. Потопальский³

¹*Институт радиофизики и электроники НАН Украины, Харьков, Украина
e-mail:kruglova@ire.kharkov.ua*

²*Харьковский Национальный Университет им. В.Н. Каразина, г. Харьков,
Украина*

³*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина
e-mail:anna-tamara@rambler.ru, тел. (044)266-1139*

Амитозин – противоопухолевый препарат, полученный путем алкилирования суммы алкалоидов чистотела (хелидонин, протопин, берберин, сангвинарин и др.) тиотэфом. Обладая сильной флюоресценцией, амитозин и его отдельные алкилированные составляющие, успешно используются для изучения молекулярно-клеточных механизмов диагностики опухолевого процесса и контроля эффективности лечения новообразований [1]. Способность «светиться» также успешно используется и при изучении взаимодействия самих перечисленных препаратов с ДНК и РНК [2].

В данной работе представлены результаты по исследованию связывания амитозина¹ (Am¹) с тимусной ДНК с использованием других методов, а именно методов УФ-спектроскопии и конкурентного связывания.

Алкалоиды для получения амитозина были выделены из травы чистотела большого и алкилированы по модифицированной методике, приведенной в монографиях [3]. Полученный препарат представлял гигроскопическую массу, для высушивания которой был использован этанол. Часть препарата, перешедшего в спиртовой раствор, обозначена как амитозин¹ (Am¹). Значение молярного коэффициента экстинкции Am¹ было найдено весовым методом и в максимуме поглощения составило $\varepsilon_{290} = 7,12 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. В качестве окрашенной метки при изучении конкурентного

связывания двух лигандов с ДНК использовали известный интеркалятор этидиум бромид (ЭБ) и аналог актиномицина D, антибиотик актиноцинового ряда ActII с двумя метиленовыми группами в боковых амидных цепях. При определении концентраций ЭБ и ActII использовали значение $\epsilon_{480} = 5,85 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [4] и $\epsilon_{400} = 1,61 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [5]. В работе использовали коммерческую ДНК тимуса теленка фирмы “Serva”. При определении концентрации ДНК в молях фосфатов (C_P^0) использовали значение молярного коэффициента экстинкции в максимуме поглощения $\epsilon_{260} = 6,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, а величины P/D вычисляли как отношение общих концентраций ДНК (C_P^0) к концентрации исследуемого лиганда (C_D^0). Спектрофотометрические измерения проводили в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10 мм на спектрофотометре Specord M40 (Германия). Исследования комплексообразования проводили в фосфатном ($2,5 \times 10^{-2} \text{ M}$ KH_2PO_4 , $2,5 \times 10^{-2} \text{ M}$ Na_2HPO_4 , pH=6,86) буферном растворе.

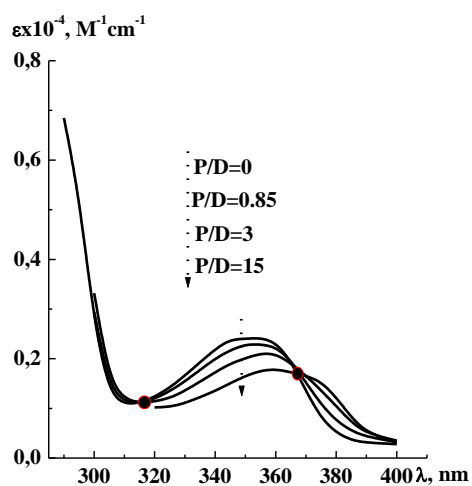


Рис. 1. Спектры поглощения смесей ДНК–Am1, $C_{Am1} = 2,04 \times 10^{-4} \text{ M}$ в фосфатном буферном растворе при разных значениях P/D. Кружками отмечены изобестические точки.

Как видно из рис.1, в пределах значений P/D от 0 до 15 Am1 образует с ДНК только один тип комплекса, поскольку во всей указанной области P/D спектры поглощения смесей проходят через одни и те же изобестические точки.

Для определения типа комплекса, образуемого Am1 с ДНК, было исследовано конкурентное связывание Am1 с ДНК в присутствии известного

интеркалятора этидия бромистого (ЭБ) [4] и аналога актиномицина D, антибиотика актиноцинового ряда ActII. Поскольку Am1, в отличие от ЭБ и ActII, слабо поглощает в видимой области спектра, проводили сравнительное титрование смесей ActII – ДНК в присутствии Am1 и бромистого этидия.

Сам ЭБ связывается с ДНК с образованием только одного типа комплекса - через интеркаляцию [4] (рис. 2, а). ActII, как это видно из рис.2,б, связывается с ДНК с образованием как минимум двух по-разному поглощающих компонентов. Это следует из того, что изобестическая точка, появляющаяся в области низких значений P/D ($\lambda=465$ нм), исчезает с ростом концентрации ДНК. Дальнейшее увеличение P/D приводит к росту поглощения и смещению полосы в длинноволновую область ($\lambda_{\max}=465$ нм). По нашим данным, при средних значениях P/D ActII связывается с ДНК в бороздке, а при больших – интеркалирует в ДНК [5].

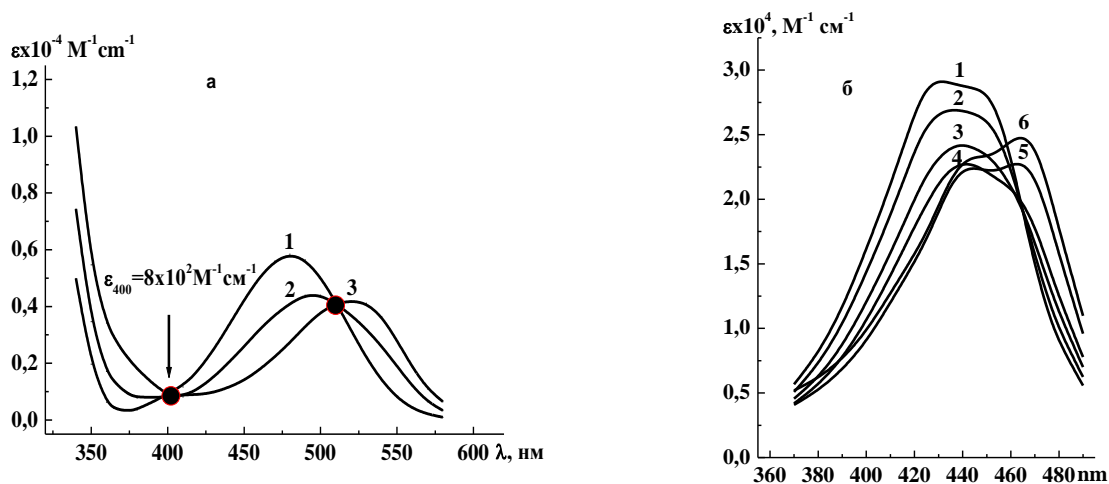


Рис. 2. Спектры поглощения смесей ДНК – ЭБ при разных значениях P/D: 1- P/D=0; 2-P/D=2; 3-P/D=30, $C_{\text{ЭБ}}=1,52 \times 10^{-4}$ М (а); спектры поглощения смесей ActII – ДНК при $C_{\text{ActII}}=2,79 \times 10^{-5}$ М в фосфатном буферном растворе при разных значениях P/D: 1 – P/D=0, 2 – 1.6, 3 – 3.6, 4 – 5.7, 5 – 18.5, 6 – 67.5 (б).

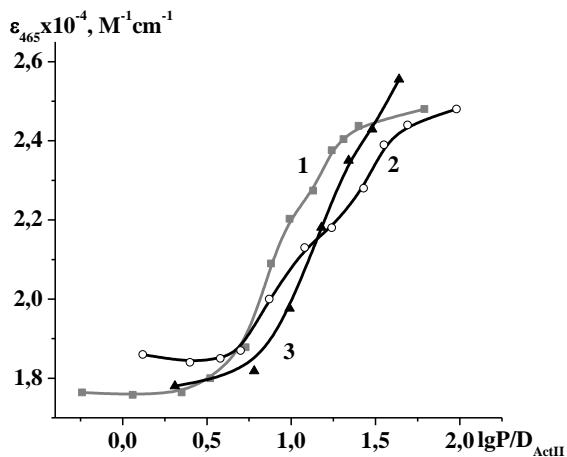


Рис. 3. Кривые титрования смесей ActII – ДНК, $C_{\text{ActII}}=4,32 \times 10^{-5} \text{ M}$ (1), смесей ActII – ДНК в присутствии ЭБ ($C_{\text{ActII}}=1,71 \times 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{ЭБ}}=3,86 \times 10^{-4} \text{ M}$) (2) в присутствии Ам1 ($C_{\text{ActII}}=1,34 \times 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Ам1}}=6,59 \times 10^{-5} \text{ M}$) (3).

Из кривых титрования смесей ActII – ДНК в присутствии ЭБ и Ам1 (рис. 3) видно, что ЭБ влияет на связывание ActII с ДНК в основном при больших значениях P/D, препятствуя интеркаляции ActII. В отличие от ЭБ влияние Ам1 наиболее заметно при средних значениях P/D, откуда можно заключить, что Ам1 препятствует связыванию ActII в бороздке ДНК и, следовательно, сам тоже образует комплексы по тому же типу внешнего связывания и не интеркалирует внутрь ДНК.

Литература:

1. *Потопальская Ю.А., Заика Л.А. Сусак Я.М.* "Использование явления флуоресценции амитозина в оценке механизма действия, диагностике и контроле лечения новообразований" // Материалы III съезда онкологов и радиологов СНГ. г.Минск. 25-28 мая **2004г.**
2. *Yashchuk V.M., Dudko O.V., Zayika L.A., Bolsunova O.I., Potopalskaya Y.A., Potopalsky A.I.* "The luminescent manifestation of the DNA – amitozine interaction" // 5-th International conference. Kiev. May 24-29, **2004.**
3. *Потопальский А.И.* Препараты чистотела в биологии и медицине. // Киев, Наукова думка.- **1992.**- 237 с.
4. *Bresloff J.L., Crothers D.M.* DNA-ethidium reaction kinetics: demonstration of direct ligand transfer between DNA binding sites // *J.Mol.Biol.*- **1975.**- **V.95.**- P.103-123.
5. *Круглова Е.Б., Малеев В.Я., Глибин Е.Н., Веселков А.Н.* Физические механизмы взаимодействия производных актиноцина с ДНК. 6. Спектрофотометрическое исследование комплексов ДНК с производными актиноцина с разной длиной метиленовых цепей // *Вісн.Харк.ун-ту № 560.*- Біофізичн. вісник.- **2002.**- **1(10).**- С.21-29.