

Санкт-Петербургский государственный университет

На правах рукописи

Космотынская Юлия Валерьевна

**Влияние состава растворителя и гамма-облучения
на взаимодействие молекулы ДНК с
координационными соединениями платины**

02.00.06 – высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
физико – математических наук



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
2006 г.

Диссертация выполнена на кафедре молекулярной биофизики физического факультета Санкт-Петербургского государственного университета

Научный руководитель – доктор физико-математических наук, профессор
Касьяненко Нина Анатольевна

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук
Тимковский Андрей Леонидович

кандидат физико-математических наук, доцент
Евлампиева Наталья Петровна

Ведущая организация: Институт Высокомолекулярных Соединений РАН

Защита состоится 21 декабря 2006 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.232.33 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 198504, Санкт-Петербург, Петродворец, Ульяновская 1, НИИФ СПбГУ

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Санкт-Петербургского государственного университета

Автореферат разослан «18» ноября 2006 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
Доктор физико-математических наук, профессор



Лезов А.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Действие противоопухолевых препаратов на основе координационных соединений обусловлено их связыванием с ядерной ДНК, подавляющим нерегулируемое деление опухолевых клеток. Изучение взаимодействия молекулы ДНК с координационными соединениями платины в растворе дает информацию о молекулярном механизме действия лекарственных препаратов этого класса. К настоящему времени накоплен достаточно большой материал о структуре и свойствах комплексов ДНК с различными соединениями платины. Вместе с тем, наиболее эффективным препаратом до последнего времени остается первое из испытанных в 70-е гг. соединений – цис-диаминодихлорплатина (цис-ДДП), токсичность которого существенно ограничивает применение в клинике. Наряду с модификацией комплексов платины путем введения лигандов определенной структуры в первую координационную сферу комплексообразователя широко используется комбинированное действие веществ, последовательное лечение пациентов разными препаратами платины. Известно, что концентрация ионов в плазме крови отличается от их концентрации внутри клетки. Часто для лучшей растворимости лекарственных препаратов предварительно используют неводные нетоксичные растворители, хорошо смешивающиеся с водой. В связи с этим необходимо рассмотреть действие препаратов платины *in vitro* при вариации условий среды (ионной силы, природы растворителя). Среди таких растворителей особое место занимает диметилсульфоксид (ДМСО). Он широко используется в косметической и пищевой промышленности, хорошо проникает через биологические мембраны, является растворителем для многих лекарственных препаратов. Кроме того, ДМСО может вводиться в первую координационную сферу платины для улучшения транспортных свойств препаратов. Действительно, в последнее время большой интерес проявляется к комплексам платины с серосодержащими лигандами, так как препараты после введения в плазму крови встречаются с большим количеством серосодержащих соединений, которые могут инактивировать соединения платины по пути следования к ДНК. Существует мнение, что модификация комплексов платины путем введения серосодержащих лигандов помимо улучшения транспортных свойств может уменьшить токсический эффект. Таким образом, изучение роли ДМСО в составе координационного соединения, а также анализ его влияния на молекулу ДНК и ее комплексообразование с соединениями платины при использовании сложного растворителя вода-ДМСО разной ионной силы представляет большой интерес.

На практике соединения платины часто используют после радиотерапии. Совместное использование гамма-облучения и химиотерапии требует тщательного изучения взаимного влияния этих двух факторов на молекулу ДНК – основную мишень действия ионизирующей радиации и противоопухолевых препаратов на основе платины. Необходимо также рассмотреть роль свободного и введенного в состав координационного соединения платины ДМСО при его взаимодействии с молекулой ДНК до и после гамма-облучения ее растворов. Сказанное выше свидетельствует об актуальности темы диссертационной работы и практической значимости выполненных исследований.

Целью диссертационной работы является изучение комплексов молекулы ДНК с координационными соединениями платины в растворе, рассмотрение влияния модификации препаратов путем внедрения серосодержащих лигандов в состав координационной сферы платины на характер их взаимодействия с ДНК, анализ влияния состава растворителя и гамма-облучения на комплексообразование.

Научная новизна работы. В работе впервые исследуются комплексы ДНК с соединением двухвалентной платины Рten(ДМСО), синтезированным в Санкт-Петербургском Технологическом Университете, проводится сравнение его действия на молекулярном уровне с цис- и транс-ДДП, а также препаратом Рten. Впервые применяются

методы флуоресцентной микроскопии, атомной силовой микроскопии и спектрофотометрического титрования для определения конформационных изменений ДНК, вызванных ее взаимодействием с используемыми в работе координационными соединениями платины, а также после гамма-облучения водных растворов ДНК и ее комплексов с препаратами платины. Впервые рассмотрена роль ДМСО при комплексобразовании нативной и гамма-облученной ДНК с соединениями платины.

Результаты работы докладывались и обсуждались на следующих конференциях и симпозиумах: Третьей всероссийской Каргинской конференции “Полимеры - 2004” (Москва, 2004); III съезде биофизиков России, (Воронеж, 2004); Политехническом симпозиуме “Молодые ученые – промышленности северо-западного региона” (Санкт-Петербург, 2004); Санкт-Петербургской конференции молодых ученых “Современные проблемы науки о полимерах”, (Санкт-Петербург, 2005); Международном симпозиуме “Hydration and Thermodynamics of Molecular Recognition” (Цахнадзор, Армения, 2005); XII и XIII Симпозиумах по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул, (Пушино, 2004).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 213 страницах, содержит 97 рисунков, 8 таблиц. Список цитируемой литературы состоит из 295 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении сформулирована цель исследования, обоснована актуальность темы диссертации, отмечены научная новизна и практическая значимость работы.

Первая глава содержит основные сведения о структуре и свойствах молекулы ДНК, в ней рассмотрены современные представления о её взаимодействии с координационными соединениями платины, проанализированы альтернативные клеточные мишени для противоопухолевых препаратов платины, описано возможное влияние сульфосодержащих соединений на транспортные свойства и биологическую активность комплексов платины, приведены данные о свойствах ДМСО, рассмотрено влияние ионизирующего излучения на структуру молекулы ДНК в растворе.

Вторая глава представляет собой описание используемых в работе материалов и методов исследования: низкоградиентной вискозиметрии, динамического двойного лучепреломления (ДЛП), атомной силовой (АСМ) и флуоресцентной микроскопии (ФМ), УФ-спектрофотометрии, кругового дихроизма (КД). Измерения методом ФМ выполнены на кафедре физики полимеров и кристаллов МГУ. В работе использовали тимусную ДНК фирмы “Serva” (11000 и 16700 пар оснований) и ДНК фага T4 фирмы Sigma (166000 пар оснований). Соединения платины Ptен и Ptен(ДМСО) (рис. 1) были синтезированы в Санкт-Петербургском Технологическом Университете, а цис- и транс-ДЛП - в Санкт-Петербургской Химико-Фармацевтической Академии. Все измерения проводили при температуре 21°С.

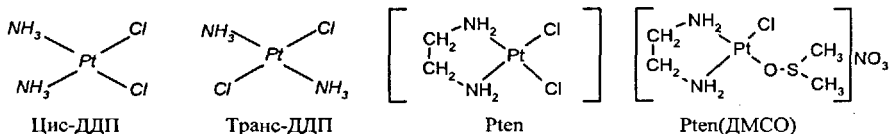


Рис. 1. Используемые в работе соединения платины.

Третья глава диссертации содержит описание и обсуждение экспериментальных результатов, полученных в работе. Первый раздел главы посвящен изучению конформации ДНК в системе вода-ДМСО. Плотность и показатель преломления смеси вода-ДМСО линейно зависят от концентрации ДМСО, тогда как зависимость вязкости (η_0) от концентрации ДМСО в 0,005 М NaCl носит немонотонный характер (рис. 2): до 9 М (64 % об.) она возрастает, а при больших $C(\text{ДМСО})$ – падает. Вязкость чистой воды, как и безводного ДМСО, меньше вязкости их смеси, что свидетельствует о межмолекулярных взаимодействиях в системе. Возможно, при этом в результате образования водородных связей вода-ДМСО возникают сложные ассоциаты, ответственные за рост η_0 . При дальнейшем увеличении $C(\text{ДМСО})$ количество возможных контактов, а, следовательно, и η_0 , уменьшается. Малые добавки соли не оказывают существенного влияния на взаимодействие вода-ДМСО, тогда как большие концентрации солей одно- и двухвалентных ионов металлов приводят к более существенной зависимости η_0 от $C(\text{ДМСО})$. Заметим, что концентрации ДМСО более 8,6 М в 1 М NaCl недостижимы – соль выпадает в осадок. По-видимому, ДМСО конкурирует с молекулами воды, обедняя гидратную оболочку ионов. В дальнейшем мы использовали $C(\text{ДМСО}) < 9\text{ М}$.

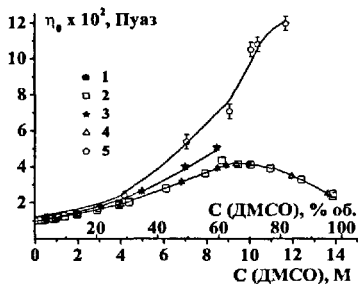


Рис. 2. Зависимость вязкости смеси вода-ДМСО, содержащей 0,0005 М (1), 0,005 М (2) и 1 М (3) NaCl, 5×10^{-4} М MnCl_2 в 0,005 М NaCl (4) и 0,7 М MgCl_2 (5) от концентрации ДМСО в растворе при $t^\circ = 21^\circ \text{C}$. Данные получены с использованием ротационного (1) и капиллярного (2-5) вискозиметров.

При добавлении малого количества ДМСО ($< 10\%$ об.) в раствор величина характеристической вязкости ДНК $[\eta]$ остается неизменной (рис. 3), затем ее значение уменьшается и при $C(\text{ДМСО}) > 3\text{ М}$ составляет около 75 % от $[\eta]$ ДНК без ДМСО. Падение $[\eta]$ может быть связано с изменением как термодинамических свойств растворителя, так и полиэлектролитного набухания макромолекулы в результате влияния ДМСО на взаимодействие противоионов с ДНК. Так как относительное падение величины $[\eta]$ (около 25 %) практически не зависит от ионной силы раствора, последнее предположение не подтверждается.

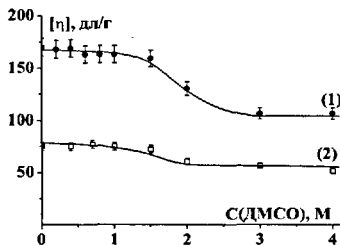


Рис. 3. Зависимость характеристической вязкости ДНК от $C(\text{ДМСО})$ в растворе, содержащем 0,0005 М NaCl (1) и 0,005 М NaCl (2).

Изображения ДНК фага Т4, полученные методом флуоресцентной микроскопии (который дает возможность непосредственного наблюдения за молекулярными клубками в

капле раствора), позволяет заключить, что при увеличении $C(\text{ДМСО})$ в растворе наблюдается уменьшение линейных размеров ДНК (рис. 4), что согласуется с данными вискозиметрии (таблица 1). Асимметрия клубка при этом остается неизменной.

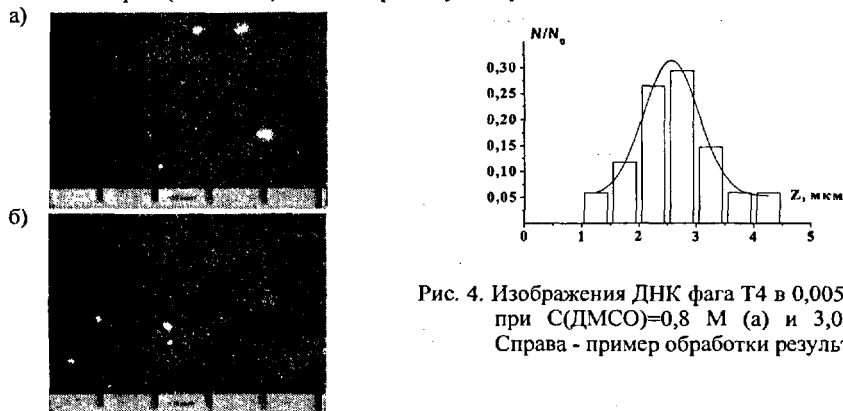


Таблица 1. Результаты исследования ДНК фага Т4 в 0,005 М NaCl методом флуоресцентной микроскопии и их сравнение с данными вискозиметрии (для ДНК 11 000 пар оснований)

Концентрация ДМСО, М	Максимальный размер пятна, $Z \times 10^6$, м	$Z/Z_{\text{ДНК}}$	$[\eta]$, дл/г	$[\eta]/[\eta]_0$
0	$2,70 \pm 0,05$	1	76 ± 3	1,00
0,2	$2,55 \pm 0,05$	0,95	75 ± 3	0,99
0,4	$2,60 \pm 0,05$	0,96	74 ± 3	0,97
0,6	$2,60 \pm 0,05$	0,97	77 ± 3	1,01
0,8	$2,55 \pm 0,05$	0,95	74 ± 3	0,97
1,0	$2,70 \pm 0,05$	1	75 ± 3	0,99
2,0	$2,40 \pm 0,05$	0,89	60 ± 2	0,79
3,0	$2,30 \pm 0,05$	0,85	56 ± 2	0,74

В отличие от размеров молекулы ДНК, уменьшение ее оптической анизотропии наблюдается при $C(\text{ДМСО})$ в растворе менее 10 % об (рис. 5). Оно может быть связано либо с изменением ориентации азотистых оснований относительно оси спирали, либо с падением персистентной длины ДНК при добавлении ДМСО в раствор. Последнее маловероятно, так как уменьшение оптической анизотропии ДНК при малых $C(\text{ДМСО})$ не сопровождается падением ее характеристической вязкости. Можно также предположить, что изменение анизотропии молекулярного клубка происходит из-за так называемого ближнего ориентационного порядка растворителя (эффект Фрисман-Дадиваняна), когда молекулы ДМСО “встраиваются” в первый гидратный слой ДНК, внося вклад в сегментную оптическую анизотропию. Безусловно, такое предположение требует подтверждения, но оно не противоречит экспериментальным данным. Подчеркнем, что при малых $C(\text{ДМСО})$ роль играет не изменение объемных эффектов, а взаимодействие

молекул ДМСО с атомными группами ДНК в первом гидратном слое. Следует отметить, что уменьшение оптической анизотропии ДНК наблюдается уже при $C(\text{ДМСО}) = 1\%$ об., затем она, как и величина $[\eta]$, остается постоянной. При $C(\text{ДМСО}) > 20\%$ об. падение этих параметров может быть связано с дестабилизацией вторичной структуры макромолекулы, так как мы фиксируем гиперхромный эффект в спектре УФ поглощения ДНК (рис. 6.). Так как полосы поглощения ДНК и ДМСО перекрываются, на рисунке приведены разностные спектры. Анализ АСМ изображений ДНК при $C(\text{ДМСО}) = 2\text{ М}$ в растворе свидетельствует об отсутствии агрегатов или деструкции макромолекулы.

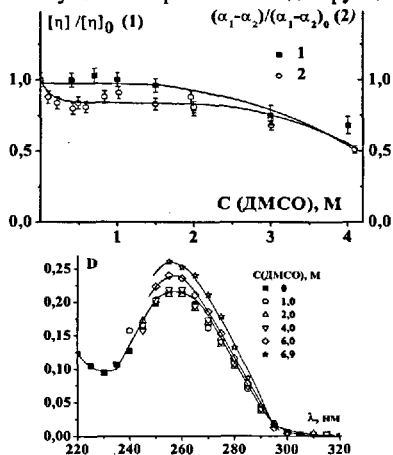


Рис. 5. Зависимость относительного изменения характеристической вязкости (1) и сегментной оптической анизотропии ДНК (2) от концентрации ДМСО в 0,005 М NaCl.

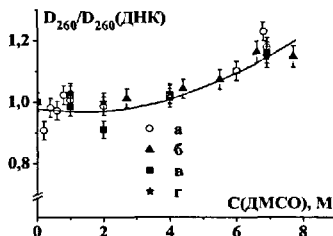


Рис. 6. Спектры УФ поглощения нативной ДНК в 0,005 М NaCl при разных концентрациях ДМСО. $C(\text{ДНК}) = 0,001\%$. Справа – зависимость D_{260} от $C(\text{ДМСО})$. График (а) соответствует данным для 0,005 М NaCl, (б) – для 1 М NaCl, (в) – для ДНК, денатурированной в присутствии ДМСО, (г) – для денатурированной ДНК с последующим добавлением ДМСО.

Из рис. 6 видно, что гиперхромный эффект с ростом $C(\text{ДМСО})$ в 1М NaCl аналогичен наблюдаемому в 0,005 М NaCl. Следует отметить, что влияние ДМСО на термически денатурированную ДНК опровергает предположение о дестабилизации ее вторичной структуры. Специальные исследования показали, что ДМСО препятствует ренатурации ДНК, что может указывать на его возможную конкуренцию за образование водородных связей с группами оснований, участвующими в формировании комплементарных пар. При нагревании водно-солевых растворов ДМСО без ДНК спектральных изменений не наблюдается. Возможно, при добавлении ДМСО в раствор ДНК происходит внедрение его молекул в первый гидратный слой макромолекулы с их определенной ориентацией, которая нарушается при нагревании системы, что может отразиться на спектральных свойствах компонентов.

Анализ спектров КД ДНК при разных концентрациях ДМСО в растворе (рис. 7) показал, что при $C(\text{ДМСО}) > 10\%$ об. наблюдается изменение спектральных свойств ДНК: сдвиг и уменьшение амплитуды положительного максимума, смещение нулевой точки.

Изменения спектров КД и УФ поглощения ДНК наблюдаются сразу после

приготовления систем и остаются неизменными в течение как минимум 4 суток, что также указывает на отсутствие дестабилизации ДНК при добавлении ДМСО в ее растворы.

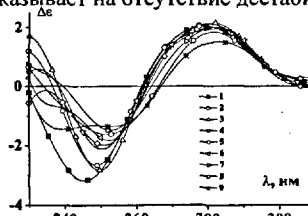


Рис. 7. Спектры КД нативной ДНК в 0,005 М NaCl при разных $C(\text{ДМСО})$: 0 М (1), 0,2 М (2), 0,4 М (3), 0,6 М (4), 0,8 М (5), 1,0 М (6), 2,0 М (7), 3,0 М (8), 6,8 М (9).

При использовании денатурированной ДНК в 0,005 М NaCl с последующим добавлением разных концентраций ДМСО изменение спектров КД ДНК более существенно, тогда как при денатурации ДНК в присутствии ДМСО результат практически аналогичен наблюдаемому для нативной ДНК (рис. 8), хотя исследование УФ поглощения ДНК этого не показало. Метод КД указывает на наличие непосредственных контактов молекул ДМСО с атомными группами макромолекулы, что не противоречит представлению о проникновении молекул ДМСО в первый гидратный слой ДНК.

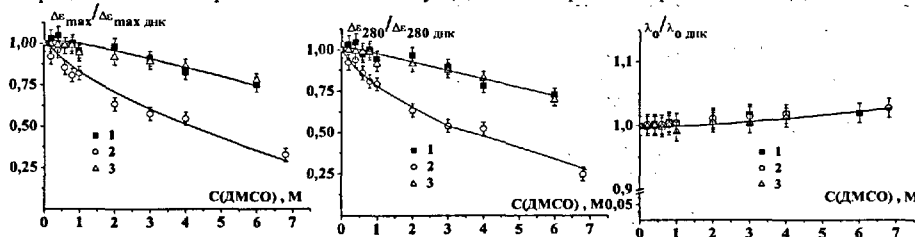


Рис. 8. Зависимость $\Delta\epsilon_{\text{max}}$, $\Delta\epsilon_{280}$ и λ_0 от концентрации ДМСО в растворе нативной (1) и денатурированной (2), а также для денатурированной в присутствии ДМСО (3) ДНК в 0,005 М NaCl.

Результаты исследования оптической анизотропии и спектров КД ДНК свидетельствуют о том, что присутствие 1М ДМСО в растворе не вызывает изменения комплексобразования макромолекулы с ионами марганца, так же как и добавление ионов марганца в раствор при концентрациях $C = (2 + 9) \times 10^{-4}$ М не оказывает влияния на взаимодействие ДНК-ДМСО.

Второй раздел главы посвящен рассмотрению влияния модификации препарата Ртен через внедрение ДМСО в состав первой координационной сферы платины на характер его взаимодействия с молекулой ДНК в растворе. В работе показано, что при связывании соединений Ртен и Ртен(ДМСО) с ДНК реализуется координационная связь по N 7 гуанина, о чем свидетельствует, например, изучение протонирования ДНК после образования ее комплексов с Ртен(ДМСО) (рис. 9). Об этом свидетельствует отсутствие характерного для протонированной формы ДНК спектра КД, что указывает на блокирование основного протон-акцепторного центра двуспиральной макромолекулы (N 7 гуанина). Так как мы контролируем по спектрам УФ поглощения нативность ДНК, полученные результаты однозначно свидетельствуют об отсутствии протонирования ДНК при используемых pH, а, следовательно, и о связывании Ртен(ДМСО) с N 7 гуанина.

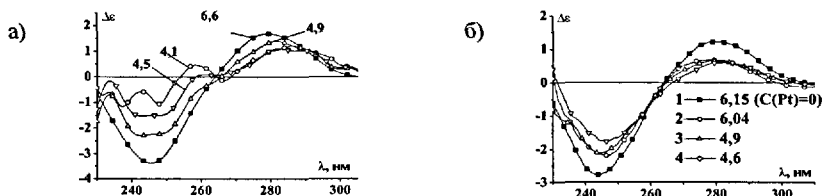


Рис. 9. Спектры КД свободной ДНК (а) и ее комплексов с препаратом Pten(ДМСО) ($C(\text{Pt})=5 \times 10^{-5} \text{ M}$) (б) при разных рН в 0,005 М NaCl.

Одинаковое изменение спектральных свойств ДНК (рис. 10, 11), ее характеристической вязкости и оптической анизотропии при связывании с Pten и цис-ДДП (рис. 12) указывают на сходство в характере их взаимодействия с макромолекулой.

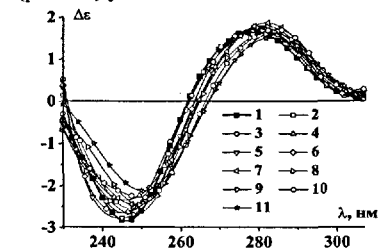


Рис. 10. Спектры КД ДНК и ее комплексов с Pten в 0,005 М NaCl. $C(\text{Pten}) \times 10^4 \text{ M}$ = 0 (1); 0,01 (2); 0,03 (3); 0,06 (4); 0,07 (5); 0,09 (6); 0,2 (7); 0,4 (8); 0,6 (9); 0,8 (10); 1 (11).

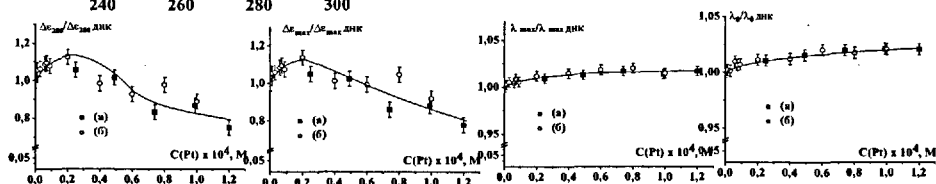


Рис. 11. Результат обработки спектров КД ДНК и ее комплексов с цис-ДДП (а) и Pten (б).

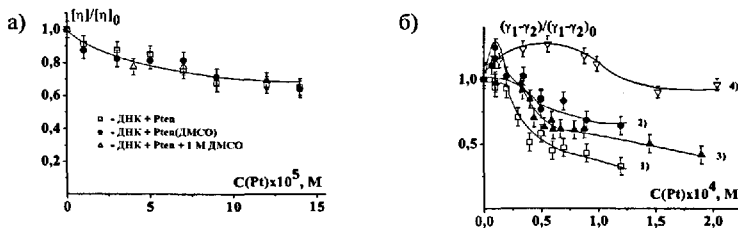


Рис. 12. Относительное изменение величины характеристической вязкости (а) и оптической анизотропии (б) ДНК в комплексе с: 1- Pten; 2- Pten(ДМСО); 3- цис-ДДП, 4- транс-ДДП в 0,005 М NaCl.

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что введение ДМСО в первую

координационную сферу Pten вместо одного атома хлора существенно изменяет комплексообразование этого соединения с молекулой ДНК. Например, мы фиксируем характер изменения спектров КД ДНК, отличный от наблюдаемого для ее комплексов с Pten и цис-ДДП, но сходный с полученным при связывании с транс-ДДП (рис. 13). Возможно, присутствие ДМСО в первой координационной сфере платины препятствует образованию бидентатного комплекса, который отвечает за повышение и сдвиг положительного максимума спектра КД ДНК при взаимодействии с цис-ДДП и Pten.

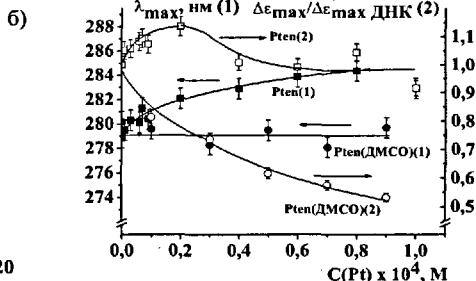
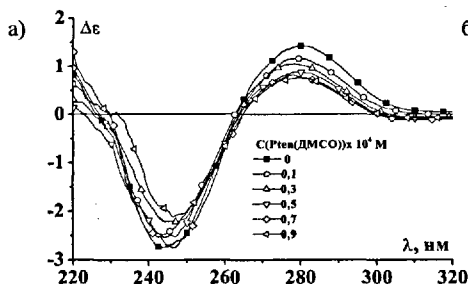


Рис. 13. Спектры КД ДНК в комплексе с Pten(ДМСО) в 0,005 М NaCl (а) и результат их обработки (зависимость длины волны (1) и амплитуды положительного максимума (2) от концентрации препарата). Здесь же приведены данные для комплексов ДНК с Pten (б).

Соединение Pten(ДМСО) образует координационную связь с молекулой ДНК, о чем свидетельствуют результаты вискозиметрических исследований и данные о конкуренции с цис-ДДП за место связывания (рис. 14). Соединение Pten(ДМСО) добавляли до и после комплексообразования ДНК с цис-ДДП (комплексы [ДНК+Pten(ДМСО)]+цис-ДДП и [ДНК+цис-ДДП]+Pten(ДМСО) соответственно). Из рисунка видно, что предварительное связывание с ДНК одного координационного соединения препятствует связыванию другого. Следовательно, взаимодействие осуществляется по одной позиции (N 7 гуанина) и связь координационная.

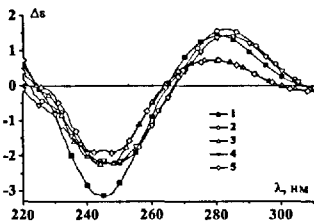


Рис. 14. Спектры КД свободной ДНК (1), и ДНК в комплексах: ДНК+цис-ДДП (2), ДНК+Pten(ДМСО) (3), [ДНК+цис-ДДП]+Pten(ДМСО) (4), [ДНК+ Pten(ДМСО)]+цис-ДДП (5) .

Как было отмечено выше, характеристическая вязкость и оптическая анизотропия ДНК при связывании с Pten и цис-ДДП изменяются сходным образом. При взаимодействии ДНК с Pten(ДМСО) зависимость величины $[\eta]$ от $C(Pt)$ аналогична наблюдаемой для цис-ДДП и Pten (рис. 12 а). Это свидетельствует о том, что количество связанной с ДНК платины во всех случаях практически одинаково. Напротив, существенное отличие в поведении оптической анизотропии макромолекулы при взаимодействии с Pten и Pten(ДМСО) (рис. 12 б) указывает на разный способ связывания этих соединений с ДНК. При этом можно отметить некоторое сходство с

комплексообразованием транс-ДДП с ДНК. Мы полагаем, что присутствие ДМСО мешает образованию 2-х координационных связей с ДНК, реализуемых в случае цис-ДДП и Pten.

Опыт показал (рис. 12 а), что присутствие не связанных с платиной молекул ДМСО в растворе ($C(\text{ДМСО}) = 1 \text{ М}$) не влияет на характер взаимодействия Pten с ДНК. Отсутствие влияния добавок ДМСО в раствор на результат комплексообразования ДНК с цис- и транс-ДДП следует из данных, полученных методом КД (рис. 15). Результаты свидетельствуют о том, что молекулы ДМСО в условиях эксперимента не могут замещать молекулы воды (или атомы хлора) в первой координационной сфере платины.

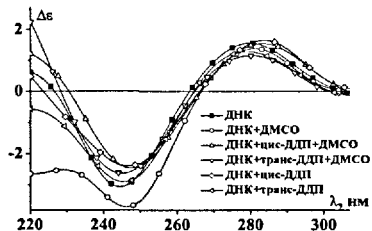


Рис. 15. Спектры КД ДНК и ее комплексов с цис-ДДП и транс-ДДП в присутствии 0,005 М ДМСО в 0,005 М NaCl.

В процессе взаимодействия не происходит замещения молекулы ДМСО на входящую группу ДНК. Таким образом, молекула ДМСО блокирует один из активных центров комплекса платины, участвующих в образовании координационной связи. В условиях нашего эксперимента мы получили результаты, свидетельствующие о том, что азотосодержащие группы молекулы ДНК (например, N 7 гуанина) не способны заместить молекулу ДМСО в первой координационной сфере препарата платины.

ФМ изображения ДНК фага Т4 в комплексе с Pten и Pten(ДМСО) (рис. 16) демонстрируют уменьшение размеров макромолекулы (таблица 2) без изменения ее асимметрии. Эти результаты удовлетворительно согласуются с вискозиметрическими данными. Приведены расчеты относительного изменения среднеквадратичного расстояния

между концами макромолекулы $(\bar{h}^2)^{1/2}$ по формуле Флори: $[\eta] = \Phi(\epsilon) \frac{(\bar{h}^2)^{3/2}}{M}$. При этом мы пренебрегаем изменением величины M (молекулярная масса) и $\Phi(\epsilon)$ (коэффициент Флори).

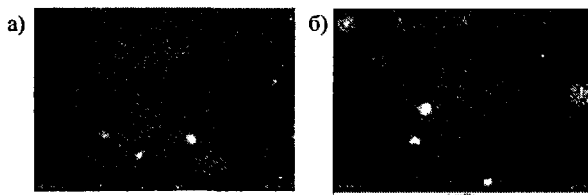


Рис 16. Изображения ДНК фага Т4 в комплексе с Pten (а) и Pten(ДМСО) (б), полученные методом ФМ.

Pten(ДМСО), так же как транс-ДДП, не связывается с макромолекулой в растворах большой ионной силы (1 М NaCl). Об этом свидетельствуют спектры КД ДНК в присутствии Pten(ДМСО) в 1 М NaCl и результаты исследования оптической анизотропии ДНК и относительной вязкости ее растворов, содержащих разные концентрации соединения.

Таблица 2. Результаты исследования комплексов ДНК фага Т4, $C(\text{ДНК}) = 2,3 \times 10^{-7}$ М, с соединениями платины методом флуоресцентной микроскопии и низкоградиентной вискозиметрии (тимусная ДНК), $C(\text{ДНК}) = 15 \times 10^{-5}$ М.

Комплекс	Значение $\Gamma_1(P_1)$ $C_{\text{соед.}}/C_{\text{ДНК}}$	Максимальный размер пятна $Z \times 10^6$, м	$Z/Z_{\text{ДНК}}$	$[\eta]$, дл/г	$[\eta]_0$	$\frac{\langle h^2 \rangle^{1/2}}{\langle h_0^2 \rangle^{1/2}}$
ДНК	0	$2,6 \pm 0,1$	1	80 ± 4	1	1
ДНК+Pten	0,1	$2,2 \pm 0,1$	0,85	73 ± 3	0,91	0,97
ДНК+Pten	0,5	$2,0 \pm 0,1$	0,77	60 ± 3	0,75	0,91
ДНК+Pten	1	$2,2 \pm 0,1$	0,85	52 ± 3	0,66	0,87
ДНК+Pten	2,5	$2,1 \pm 0,1$	0,85	-	-	-
ДНК+ Pten(ДМСО)	0,1	$2,4 \pm 0,1$	0,92	70 ± 3	0,88	0,96
ДНК+ Pten(ДМСО)	0,5	$2,3 \pm 0,1$	0,88	65 ± 3	0,81	0,93
ДНК+ Pten(ДМСО)	1	$2,2 \pm 0,1$	0,81	51 ± 2	0,64	0,86
ДНК+ Pten(ДМСО)	2,5	$2,2 \pm 0,1$	0,81	-	-	-

Мы изучали связывание бромистого этидия (EtBr) с ДНК после образования ее комплексов с соединениями платины. Спектры (рис. 17) получены на полосе поглощения EtBr (с максимумом около $\lambda = 470$ нм). $C(\text{EtBr}) = 3 \times 10^{-5}$ М и $C(\text{ДНК})$ от 0,001 % до 0,03 %. Обработку полученных данных проводили по методу Скетчарда. Комплексообразование соединений платины с ДНК изменяет константу связывания EtBr. Препараты платины не предотвращают связывания, а лишь уменьшают количество связанного с ДНК красителя. Это может быть обусловлено либо локальным изменением геометрии двойной спирали, либо стерическими препятствиями для EtBr из-за связывания платины с азотистыми основаниями ДНК. Меньшее воздействие оказывают транс-ДДП и Pten(ДМСО), изменение константы связывания не превышает 15 %. Цис-ДДП изменяет ее на порядок, Pten показывает близкий к этому результат. Таким образом, образование одной координационной связи в случае транс-ДДП и Pten(ДМСО) с ДНК влияет меньше, чем бидентатные комплексы цис-ДДП и Pten с макромолекулой.

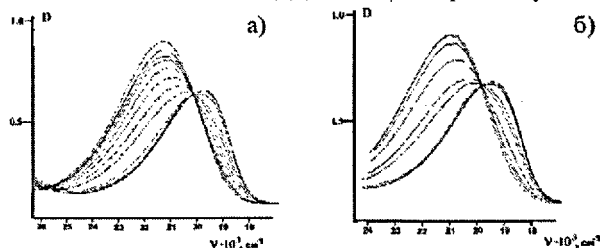


Рис. 17. Результаты СФ титрования EtBr комплекса ДНК с цис-ДДП (а) и свободной ДНК (б). $C(Pt) = 1,37 \times 10^{-5}$ М.

АСМ изображения комплексов с соединениями платины (рис. 18) демонстрируют тенденцию к образованию “изломов” ДНК в месте присоединения Pten, как это наблюдается и для цис-ДДП, а также указывают на существование внутри- или

межмолекулярных сшивок ДНК при связывании с Pten(ДМСО), как и для транс-ДДП.

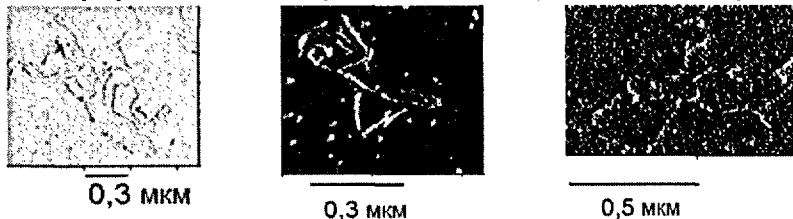


Рис. 18. АСМ изображения (слева направо) тимусной ДНК, комплексов ДНК с Pten и Pten(ДМСО), полученные в режиме постоянного контакта.

Анализ полученных данных показал, что Pten и Pten(ДМСО) по-разному взаимодействуют с ДНК. Насыщение возможных мест связывания этих соединений с макромолекулой наблюдается при одной и той же концентрации (рис. 12), соответствующей координации 5 атомов платины на 10 пар оснований ДНК (это совпадает с максимальной степенью связывания цис-ДДП с двуспиральной ДНК без нарушения ее вторичной структуры), то есть количество связанной с макромолекулой платины одинаково. Различие в действии Pten(ДМСО) и Pten (а, соответственно, и цис-ДДП) проявляется не в степени связывания и не в характере их влияния на объем ДНК, а в структуре образующегося комплекса. Мы полагаем, что рассматриваемая модификация соединения платины (введение ДМСО) не способствует образованию бидентатного комплекса с ДНК, отвечающего (в случае цис-ДДП) за противоопухолевую активность.

Третий раздел посвящен исследованию комбинированного действия препаратов платины и гамма-облучения на молекулу ДНК в растворе. Известно, что гамма-облучение дозой 1 крад растворов ДНК приводит к уменьшению объема макромолекулы без изменения ее термодинамической жесткости. Полагают, что облучение влияет на зарядовые свойства макромолекулы в результате ее взаимодействия с продуктами радиолиза воды, что, в частности, отражается на связывании ДНК с заряженными лигандами в растворе. Комплексообразование ДНК с цис- и транс-ДДП зависит от ионной силы раствора и может измениться при вариации заряда макромолекулы. Таким образом, проведенные исследования не только интересны с точки зрения изучения особенностей применения соединений платины до и после гамма-облучения, но и важны для понимания механизма поражающего действия радиации.

В работе показано, что образование комплексов необлученной и гамма-облученной ДНК с цис- и транс-ДДП приводит к одинаковому падению величины $[\eta]$ (приблизительно на 25 %). Иными словами, используемые соединения платины так же хорошо связываются с гамма-облученной ДНК, как и с нативной. Даже если изменение зарядовых свойств ДНК при облучении и происходит, это не отражается на взаимодействии макромолекулы с препаратами платины. Степень связывания одинакова при взаимодействии цис- и транс-ДДП с облученной и необлученной ДНК. Отметим, что в этом случае нельзя говорить о полном подавлении дальних электростатических взаимодействий при облучении макромолекулы, так как для реализации координационного связывания необходимо притяжение заряженной (акватированной) формы соединений платины к ДНК.

С другой стороны, связывание ДНК с цис- и транс-ДДП не препятствует действию облучения на макромолекулу, хотя величина $[\eta]$ при этом падает меньше, чем при облучении свободной ДНК (таблица 3), хотя взаимодействие с соединениями платины

уменьшает объем макромолекулы. При использовании соединений Pten и Pten (ДМСО) мы получили аналогичные результаты. При облучении комплексов ДНК с этими препаратами величина $[\eta]$ падает меньше, чем в случае использования цис- и транс-ДДП.

Таблица 3. Результаты гидродинамических исследований в 0,005 М NaCl.

Комплекс	$[\eta]$, дл/г	$-\Delta\eta/(\eta_0(1-\eta_0)) \times 10^8$, см ³ /г
ДНК необл.	78 ± 3	23 ± 2
ДНК обл. 1 крад	33 ± 3	23 ± 2
(ДНК+цис-ДДП) необл.	60 ± 2	15 ± 2
(ДНК обл. 1 крад + цис-ДДП)	25 ± 2	15 ± 2
(ДНК+цис-ДДП)обл. 1 крад	36 ± 3	-
(ДНК+транс-ДДП) необл.	60 ± 2	28 ± 2
(ДНК обл. 1 крад + транс-ДДП.)	25 ± 3	30 ± 2
(ДНК+транс-ДДП) обл. 1 крад	36 ± 3	-
(ДНК обл. 1 крад + Pten обл. 1 крад)	24 ± 2	-
(ДНК обл. 1 крад + Pten)	24 ± 2	15 ± 2
(ДНК обл. 1 крад + PtenДМСО)	24 ± 2	20 ± 2
(ДНК + PtenДМСО) обл. 1 крад	37 ± 3	22 ± 2
(ДНК + Pten) обл. 1 крад	34 ± 3	19 ± 2
(ДНК + Pten) необл.	62 ± 2	15 ± 2
(ДНК + PtenДМСО) необл.	60 ± 2	19 ± 2

Спектры УФ-поглощения препаратов платины, ДНК и ее комплексов с соединениями платины практически не меняются при облучении. Эти данные указывают на отсутствие дестабилизации двуспиральной ДНК при облучении ее комплексов с изучаемыми соединениями. Вторичная структура облученной ДНК при взаимодействии с препаратами платины также не меняется. Результаты, полученные методом КД, подтверждают эти выводы. Связывание ДНК с цис-ДДП при используемых $C(Pt)$ приводит к увеличению и сдвигу положительного максимума, а связывание с транс-ДДП – к его понижению без сдвига. Облучение комплексов не приводит к изменению спектров КД ДНК, а предварительное облучение ДНК не меняет характер ее взаимодействия с цис- и транс-ДДП. Аналогичные данные получены для Pten и Pten(ДМСО).

Заметим, что при облучении комплексов ДНК с препаратами платины меньшее падение величины $[\eta]$ фиксируется при использовании Pten(ДМСО), что косвенным образом может указывать на протекторные свойства ДМСО. Мы провели специальное исследование влияния облучения на молекулу ДНК в присутствии ДМСО. На рис. 19 показана зависимость характеристической вязкости необлученной и облученной дозой 1 крад ДНК от $C(ДМСО)$ в растворе. Совпадение значений $[\eta]$ и оптической анизотропии для необлученной и облученной в присутствии ДМСО ДНК в некоторой области $C(ДМСО)$ показывает, что наблюдается защита макромолекулы от действия радиации.

Добавление разных концентраций ДМСО к облученной ДНК не приводит к изменению изучаемых параметров. Таким образом, наши исследования подтвердили предположение о том, что ДМСО является перехватчиком свободных радикалов, образующихся при радиоллизе воды и, таким образом, защищает ДНК при облучении.

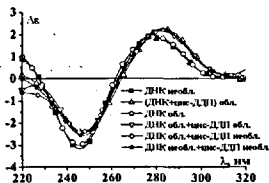


Рис. 19. Спектры кругового дихроизма ДНК при совместном и последовательном действии комплексообразования с цис-ДДП и гамма-облучения в 0,005 М NaCl.

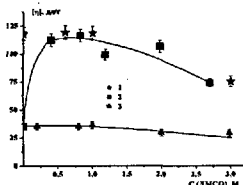


Рис. 20. Зависимость от С(ДМСО) характеристической вязкости необлученной (1), и облученной в присутствии ДМСО дозой 1 крад (2) ДНК, а также облученная ДНК с последующим добавлением ДМСО (3) в 0,005 М NaCl.

В последнем разделе диссертации сформулированы основные выводы работы:

1. Присутствие ДМСО до 10 % об. в растворе ДНК не вызывает изменения объема макромолекулы, хотя влияет на величину измеряемой оптической анизотропии. При больших концентрациях ДМСО размеры ДНК уменьшаются, что сопровождается изменением ее спектральных характеристик.
2. ДМСО сходным образом влияет на спектральные свойства нативной и денатурированной ДНК, что отражает его присутствие в первом гидратном слое и непосредственный контакт с атомными группами макромолекулы.
3. Присутствие ДМСО в растворе при концентрациях менее 2 М не оказывает влияния на взаимодействие ДНК с ионами двухвалентных металлов и координационными соединениями платины.
4. Показано, что комплексные соединения цис-ДДП, Ptен и Ptен(ДМСО) образуют координационную связь с ДНК по позиции N7 гуанина. Связывание не реализуется в растворах большой ионной силы.
5. Характер взаимодействия Ptен с ДНК имеет сходство с комплексообразованием ДНК с противоопухолевым препаратом цис-ДДП, а Ptен(ДМСО) – с ее неактивным транс-изомером.
6. Модификация соединения Ptен путем введения ДМСО в первую координационную сферу платины существенно влияет на характер взаимодействия препарата с ДНК и препятствует образованию бидентатного комплекса, ответственного за противоопухолевую активность соединений этого класса.
7. Показано, что комплексообразование ДНК с соединениями платины не препятствует последующей интеркаляции бромистого этидия, хотя и уменьшает степень его связывания с макромолекулой, что свидетельствует об отсутствии существенных изменений вторичной структуры ДНК при платинировании.
8. Гамма-облучение дозой 1 крад не влияет на последующее связывание исследуемых в работе соединений платины с макромолекулой.
9. Образование комплексов ДНК с изучаемыми препаратами платины не препятствует действию гамма-облучения на ДНК.
10. Присутствие ДМСО в растворе ДНК при облучении дозой 1 крад частично защищает

макромолекулу от поражающего действия радиации.

ОСНОВНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ В РАБОТАХ:

1. Касьяненко Н.А., Айя Э.Э.Ф., Богданов А.А., Космотынская Ю.В., Яковлев К.И., Сравнение комплексообразования ДНК с противоопухолевым препаратом дис-ДДП и биядерным соединением двухвалентной платины, содержащим пиразин, Молек. биол., 2002, 36, 4, 1-8.
2. Касьяненко Н.А., Богданов А.А., Космотынская Ю.В., Спёвак В.Н., Комплексы ДНК с соединениями двухвалентной платины в присутствии диметилсульфоксида, Ж. физ. хим., 2002, 76, 11, 2043-2048.
3. Касьяненко Н.А., Абрамчук С.С., Благодатских И.В., Богданов А.А., Галлямов М.О., Кононов А.И., Космотынская Ю.В., Ситникова Н.Л., Хохлов А.Р., Изучение комплексообразования молекулы ДНК с координационными соединениями платины, Высокомолекул. соед., 2002, А, 45, 10, 1626-1637.
4. Yu.V. Kosmotynskaya, A.A. Bogdanov, and N.A. Kas'yanenko, Effect of Dimethyl Sulfoxide on DNA Conformation in Solution, Russian J. Phys. Chem., Vol. 79, Suppl. 1, 2005, 86-89.
5. А.А. Богданов, Ю.В. Космотынская, К.И. Яковлев, Н.А. Касьяненко, Специфика взаимодействия с молекулой ДНК различных изомеров и модификаций двуядерных координационных соединений платины(II), Журн. Структ. Химии, 2006, 47, 1, 178-184.
6. Касьяненко Н.А., Богданов А.А., Космотынская Ю.В., Спёвак В.Н., Растворы высокомолекулярной ДНК как модельные системы для исследования молекулярного механизма действия новых противоопухолевых препаратов на основе платины. В сб. Авторефераты докладов 4 международной конференции Химия высокоорганизованных веществ и научные основы нанотехнологии, Санкт-Петербург, СПбГУ, 2004, 55.
7. Космотынская Ю.В., Зырянова И.М., Касьяненко Н.А., Анализ результатов комбинированного действия гамма-облучения и противоопухолевых препаратов платины на конформацию ДНК в растворе. В сб. тезисов докладов, Третьей Всероссийской Каргинской Конференции "Полимеры – 2004", Москва, 2004, 297.
8. Касьяненко Н.А., Богданов А.А., Космотынская Ю.В., Влияние диметилсульфоксида на конформацию молекулы ДНК в растворе. В сб. тезисов докладов IX международной конференции "Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах", Плес, 2004, 33.
9. Космотынская Ю.В., Богданов А.А., Касьяненко Н.А., Конформация молекулы ДНК в системе вода-соль-диметилсульфоксид. В материалах семинаров политехнического симпозиума "Молодые ученые – промышленности северо-западного региона", Санкт-Петербург, 2004, 83.
10. Богданов А.А., Космотынская Ю.В., Касьяненко Н.А., Использование модельных систем – водно-солевых растворов ДНК для изучения молекулярного механизма действия новых двуядерных соединения платины (II). В материалах семинаров политехнического симпозиума "Молодые ученые – промышленности северо-западного региона", Санкт-Петербург, 2004, 85.
11. Космотынская Ю.В., Богданов А.А., Касьяненко Н.А., Комплексы ДНК с металлами в присутствии диметилсульфоксида. В сб. Тезисы докладов Санкт-Петербургской конференции молодых ученых "Современные проблемы науки о полимерах", Санкт-Петербург, 2005, 2, 35.
12. Kosmotynskaya Yu., Bogdanov A., Spevak V., Kasyanenko N., DNA Interaction with Sulfur-Containing Platinum Compounds. In: An International Symposium on Hydration and Thermodynamics of Molecular Recognition, Tsakhkadzor, Armenia, 2005, 37.

Подписано в печать 16.11.2006.

Формат бумаги 60 × 84 1/16. Бумага офсетная.

Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ 3879.

**Отпечатано в отделе оперативной полиграфии НИИХ СПбГУ,
198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Университетский пр.26**

