



Биол. журн. Армении, 1 (63), 2011

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОДОФИЛЛОТОКСИНА И ЭТОПОЗИДА С ДНК МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Г.Р. ВАРДАПЕТЯН, А.С. РЯЗАНОВА

*Российско-Армянский (Славянский) университет,
медико-биологический факультет*

Исследовано взаимодействие подофиллотоксина (Ptox) и этопозиды с ДНК методом флуоресцентной спектроскопии. Обнаружено, что Ptox способен непосредственно взаимодействовать с молекулой ДНК. Сохранение интенсивности флуоресценции на постоянном уровне при возрастании молярного соотношения Ptox/ДНК указывает на наличие ограниченного числа мест связывания Ptox на молекуле ДНК. В качестве подобных участков могут служить дефектные и/или концевые участки ДНК. Показано также, что в отличие от Ptox этопозид способен связываться только с полимерной ДНК. Взаимодействие с фДНК практически не наблюдается. Вероятно, это обусловлено тем, что этопозид в основном взаимодействует с ДНК опосредованно, предварительно комплексируясь с топоизомеразой.

ДНК – подофиллотоксин – этопозид – спектр флуоресценции – интенсивность флуоресценции

Ֆլուորեսցենսային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով հետազոտվել է ԴՆԹ-ի հետ պոդոֆիլոտոքսինի և էտոպոզիդի փոխազդեցությունը: Հայտնաբերվել է, որ Ptox-ը կարող է անմիջականորեն փոխազդել ԴՆԹ-ի մոլեկուլի հետ: Ptox/ԴՆԹ մոլային հարաբերության աճին զուգընթաց ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության պահպանումը հաստատուն մակարդակի վրա վկայում է ԴՆԹ-ի մոլեկուլի վրա Ptox-ի կապման տեղերի սահմանափակ թվի մասին: Նման տեղամասեր կարող են հանդիսանալ ԴՆԹ-ի վնասված կամ ծայրային հատվածները: Ցույց է տրվել նաև, որ ի տարբերություն Ptox-ի, էտոպոզիդը կարող է կապվել միայն պոլիմերային ԴՆԹ-ի հետ: Ֆ-ԴՆԹ-ի հետ փոխազդեցություն գործնականում չի դիտվում: Հնարավոր է, որ դա պայմանավորված է այն հանգամանքով, որ էտոպոզիդը ԴՆԹ-ի հետ հիմնականում փոխազդում է միջնորդավորված ձևով՝ նախապես կոմպլեքս առաջացնելով տոպոիզոմերազի հետ:

ԴՆԹ – պոդոֆիլոտոքսին – էտոպոզիդ – ֆլուորեսցենցիայի սպեկտր – ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվություն

The interaction of podophyllotoxin (Ptox) and etoposide with DNA by fluorescent spectroscopy method has been investigated. It has been revealed, that Ptox is able to interact with DNA molecule directly. Preservation of fluorescent intensity at the constant level, with increase of of Ptox/DNA ratio, shows the existence of limited number of binding sites of Ptox to DNA molecule. Defect or/and end sites on DNA can serve as similar sites. It has been also shown, that in spite of Ptox, etoposide binds only to polymer DNA. Interaction with f-DNA practically is not observed. Possibly it is conditioned by mainly indirect interaction of etoposide with DNA, as far as it previously forms a complex with topoisomerase.

DNA – podophyllotoxin – etoposide – fluorescent spectra – fluorescent intensity

Как известно, к одному из наиболее эффективных противоопухолевых средств растительного происхождения относят подофиллин (смесь природных веществ, выделяемых из корневищ с корнями подофилла щитовидного (*Podophyllum peltatum* L.) семейства барбарисовых (*Berberidaceae*). Подофиллин содержит не менее 40% подофиллотоксина, альфа- и бета-пелтатины [1]. Экстракт из корневищ подофилла издавна применялся в народной медицине как слабительное при хронических запорах, а также в качестве рвотного и глистогонного средства. В дальнейшем была обнаружена его цитостатическая активность, проявляющаяся блокадой митоза на стадии метафазы (по действию напоминает колхицин). В клинической практике широко используются полусинтетические производные подофиллотоксина – эпиподофиллотоксины (этопозид и тенипозид), по механизму действия относящиеся к ингибиторам топоизомераз [3]. Ингибиторы топоизомераз, связываясь с комплексом топоизомеразы-ДНК, воздействуют на пространственную (топологическую) структуру фермента, снижают его активность и тем самым нарушают процесс репликации ДНК, тормозят клеточный цикл, задерживая пролиферацию клеток [4,6]. Ингибиторы топоизомераз оказывают фазоспецифичное цитотоксическое действие (в период S и G₂ фаз клеточного цикла) [5]. Ранее было показано, что подофиллотоксин и этопозид по-разному взаимодействуют с молекулой ДНК [8]. Целью настоящей работы являлось исследование особенностей взаимодействия подофиллотоксина и этопозидов с ДНК методом флуоресценции.

Материал и методика. ДНК-Ртох и ДНК-этопозид комплексы готовили добавлением предварительно растворенного в метаноле подофиллотоксина и этопозидов к растворам полимерной ДНК (пДНК, 10-15 тысяч пар нуклеотидов, “Sigma”) и фрагментированной ДНК (фДНК 300-500 пар нуклеотидов, “ICN”) в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,0, в молярных соотношениях Ртох(этопозид)/ДНК = 0,125; 0,25; 0,5 и 1,0. Конечная концентрация метанола в комплексе не превышала 2,5%. В разработанной нами системе Ртох и этопозид свободно растворяются в широком спектре концентраций в Na-фосфатном буфере, что позволяет проводить исследования их комплексов с ДНК в водной среде.

Флуоресцентный анализ комплексов проводили на автоматическом спектрофлуорометре (“Fluoromax”, Германия). Спектры флуоресценции комплексов Ртох(этопозид)-ДНК получали при длинах волн возбуждения 260 и 292,2 нм, соответствующих максимумам поглощения ДНК и Ртох (этопозид). Тушение может происходить в результате образования нефлуоресцирующего комплекса в основном состоянии между флуорофором и тушителем. Как только происходит поглощение света, комплекс немедленно возвращается в основное состояние без испускания фотона.

Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации тушителя легко вывести, используя константу ассоциации комплекса по формуле

$$K_{ст} = [F - Q] / [F][Q], \quad (1)$$

где $[F - Q]$ - концентрация комплекса; $[F]$ - концентрация несвязанного флуорофора (Ртох или этопозид), а $[Q]$ - концентрация тушителя (ДНК). Если закомплексованная форма не флуоресцирует, то доля оставшейся флуоресценции (F/F_0) определяется той частью от общего количества флуорофоров, которая не закомплексована (f), т.е. $f = F/F_0$. Общая концентрация флуорофора $[F]$ равна

$$[F_0] = [F] + [F - Q]. \quad (2)$$

Подставляя F_0 в (1), получаем

$$K = ([F_0] - [F])/[F][Q] = [F_0]/[F][Q] - 1/[Q]. \quad (3)$$

Тушение флуоресценции рассчитывали по уравнению Штерна-Фольмера: $F_0/F = 1 + K_{ст}[Q]$, которое позволяет определить уровень статического тушения $K_{ст}$ по изменению

относительной интенсивности флуоресценции F_0/F в зависимости от концентрации тушителя, если форма спектра флуоресценции при тушении сохраняется [2].

Результаты и обсуждение. Флуоресцентный анализ показал, что при возбуждении волны длиной 260 нм раствора Ptox наблюдаются пики эмиссии при 322 нм, 518 нм и 635 нм. Интенсивность эмиссии комплексов Ptox с высокополимерной ДНК при 322 нм и 635 нм линейно возрастает с увеличением концентрации Ptox, что указывает на пропорциональное увеличение числа молекул Ptox, связанных с ДНК (табл.1).

При возбуждении комплексов в точке максимума поглощения Ptox ($\lambda_{\text{excit}}=292,2$ нм, табл. 1) с увеличением его концентрации сначала происходит незначительный рост интенсивности флуоресценции при 322 и 635 нм, затем снижение. Подобная картина обычно наблюдается при наличии ограниченного числа мест связывания. При этом наблюдается также эмиссия при 585 нм, интенсивность которой уменьшается с увеличением концентрации Ptox.

Практически линейное возрастание интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{excit}}=260$ нм) с увеличением концентрации Ptox в среде указывает на пропорциональное увеличение числа связанных с ДНК молекул Ptox. Об этом свидетельствует также тушение флуоресценции при λ_{322} и λ_{635} (рис.1).

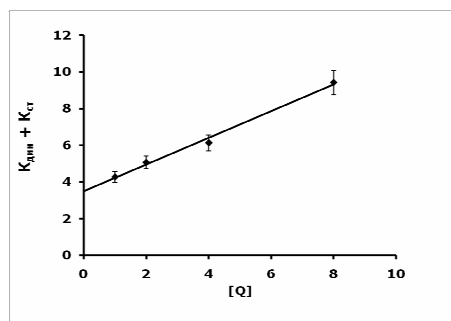


Рис. 1. Зависимость коэффициентов статического ($K_{\text{ст}}$) и динамического ($K_{\text{дин}}$) тушения комплексов ДНК-Ptox от $[Q]$ концентрации тушителя.

При возбуждении комплексов в точке спектрального максимума Ptox ($\lambda_{\text{excit}}=292,2$ нм) и при увеличении концентрации Ptox сначала наблюдается незначительный рост максимума флуоресценции при 322 и 635 нм, затем интенсивность флуоресценции снижается и остается на постоянном уровне.

Из уравнения (4) можно вычислить значения как $K_{\text{дин}}$, так и $K_{\text{ст}}$, которые соответственно равны 0,165 и 3,33.

$$K_{\text{дин}} + K_{\text{ст}} = (K_{\text{дин}} \times K_{\text{ст}}) [Q] + 3,5. \quad (4)$$

Высокие значения $K_{\text{ст}}$ могут быть обусловлены образованием прочных связей между Ptox и дефектными участками ДНК, а относительно низкие значения $K_{\text{дин}}$ слабыми связями между Ptox и бороздками ДНК.

Иная картина наблюдается при исследовании спектров флуоресценции комплексов ДНК с этопозидом (рис.2). Если спектры флуоресценции комплексов Ptox как с пДНК, так и фДНК показывают наличие максимума при λ_{635} (рис.2), то в присутствии этопозиды максимум при λ_{635} обнаруживается только у пДНК. Одновре-

менно обнаруживается наличие т.н. «зеленого» максимума при λ_{535} нм, что характерно для связывания этопозидов с малой бороздкой полимерной ДНК.

Таблица 1. Зависимость интенсивности флуоресценции от молярного соотношения Ptox/ДНК при длине волны возбуждения 260 нм и 292,2 нм.

Ptox ДНК	Интенсивность $\lambda_{\text{excit}} = 260$ нм			Интенсивность $\lambda_{\text{excit}} = 292.5$ нм		
	$\times 10^5$ при λ_{322}	$\times 10^4$ при λ_{518}	$\times 10^4$ при λ_{635}	$\times 10^5$ при λ_{322}	$\times 10^4$ при λ_{585}	$\times 10^5$ при λ_{635}
0.125	1.05 $\pm$ 0,06	0.71 $\pm$ 0,04	3.9 $\pm$ 0,12	23.8 $\pm$ 0,91	15.0 $\pm$ 0,75	9.2 $\pm$ 0,12
0.250	1.50 $\pm$ 0,10	0.71 $\pm$ 0,04	5.7 $\pm$ 0,16	28.0 $\pm$ 0,91	8.2 $\pm$ 0,11	11.0 $\pm$ 0,12
0.500	1.80 $\pm$ 0,15	0.71 $\pm$ 0,04	6.7 $\pm$ 0,15	27.0 $\pm$ 0,84	4.6 $\pm$ 0,03	10.4 $\pm$ 0,14
1.000	2.09 $\pm$ 0,20	0.71 $\pm$ 0,04	7.7 $\pm$ 0,16	27.0 $\pm$ 0,84	4.6 $\pm$ 0,03	10.4 $\pm$ 0,12
ДНК	0.00	0.00	0.0	3.1 $\pm$ 0,22	42.0 $\pm$ 1,20	1.1 $\pm$ 0,08
Ptox	10.6 $\pm$ 0.50	11.36 $\pm$ 0.57	40.7 $\pm$ 2.04	27.05 $\pm$ 1.35	42.7 $\pm$ 2.14	10.54 $\pm$ 0.53

Таким образом, выявлено, что Ptox способен непосредственно взаимодействовать с молекулой ДНК. Сохранение интенсивности флуоресценции на постоянном уровне при возрастании молярного соотношения Ptox/ДНК указывает на наличие ограниченного числа мест связывания Ptox на молекуле ДНК. В качестве подобных участков ДНК могут быть дефектные и/или концевые. Косвенным доказательством данного предположения служит появление нового максимума при 585 нм (табл. 1).

В отличие от Ptox, этопозид способен связываться только с полимерной ДНК (рис.2). При этом значение $K_{\text{дин}}$ превышает значение $K_{\text{ст}}$. Взаимодействие с фДНК практически не наблюдается. Вероятно, это обусловлено тем, что этопозид в основном взаимодействует с ДНК опосредованно, предварительно комплексируясь с топоизомеразой. Кстати, подобный механизм допускается многими авторами, исследующими молекулярные механизмы действия Ptox и его производных [7].

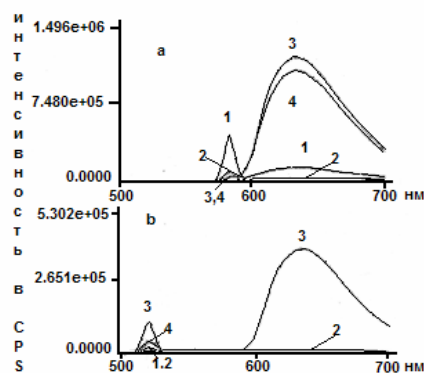


Рис. 2. Спектры флуоресценции при $\lambda_{\text{excit}} = 292.2$ нм комплексов Ptox (а) и этопозидов (б) с ДНК. Буфер (2-а,б), Ptox (1-а), Ptox – фДНК (3а), Ptox – пДНК (4а), этопозид (1б), этопозид – пДНК (3-б), этопозид-фДНК (4-б).

ЛИТЕРАТУРА

1. Вардапетян Г.Р., Киракосян А.Б., Оганесян А.А., Пенесян А.Р., Альферман В.А. Накопление лигнанов в каллусных культурах *L. Austriacum* под действием элиситоров. Биотехнология, 3, с. 37-41, 2002.
2. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М., Мир, 496 с. 1986.
3. Anyanwutaku I.O., Guo X., Chen H.X., et al. Activities of novel nonglycosidic epipodophyllotoxins in etoposide-sensitive and-resistant variants of human KB cells, P-388 cells, and in vivo multidrug-resistant murine leukemia cells. *Mol Pharmacol*, 49, p. 721–726, 1996.
4. Burden D.A., Kingma P.S., Froelich-Ammon S.J., Bjornsti M.-A., Patchan M.W., Thompson R.B., Osheroff N. Topoisomerase II-Etoposide Interactions Direct the Formation of Drug-induced Enzyme-DNA Cleavage Complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 46, p. 29238-29244, 1996.
5. Damayanthi Y., Lown J.W. Podophyllotoxins: current status and recent developments. *Curr Med Chem.*, 5, p. 205-252, 1998.
6. Macdonald T.L., Lehnert E.K., Loper J.T., et al. On the mechanism of interaction of topoisomerase II with chemotherapeutic agents. In: Potmesil M, Kohn KW, editors. *DNA topoisomerases in cancer*. NY: Oxford University Press, p.199–214, 1991.
7. Rubin E., Hait W. Drugs That Target DNA Topoisomerases. In: Kufe D, Bast R, Hait W, et al., editors. *Cancer Medicine 7*, Hamilton (Ontario): BC Decker, Inc; p. 690–3, 2006.
8. Stewart L., Redinbo M.R., Qiu X., et al. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*, 279, p. 1534–1541, 1998.

Поступила 07.12.2010