Известия НАН Армении, Физика, т.59, №4, с.491–495 (2024) УДК 541.64 DOI:10.54503/0002-3035-2024-59.4-491

ПАРАМЕТРЫ СВЯЗЫВАНИЯ МИТОКСАНТРОНА И БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С А-ФОРМОЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПО ИЗОТЕРМАМ АДСОРБЦИИ

В.П. КАЛАНТАРЯН¹, Р.С. КАЗАРЯН¹, Ю.С. БАБАЯН^{2*}, М.А. ПАРСАДАНЯН¹

¹Ереванский государственный университет, Ереван, Армения ²Национальный университет архитектуры и строительства, Ереван, Армения

*e-mail: babayanyura@gmail.com

(Поступила в редакцию 9 октября 2024 г.)

Проведен анализ изотерм адсорбции на основании экспериментально полученных данных по связыванию противоопухолевого соединения митоксантрона (МК) и бромистого этидия (БЭ) с А-формой нуклеиновых кислот (НК). Полученные результаты показывают, что наблюдается избирательность связывания с парами оснований НК. Расчеты показывают, что изменения энтальпии, вследствие связывания МК и БЭ с А-формой НК (в пределах погрешности эксперимента) почти одинаковы, однако изменения энтропии при связывании сильно отличаются. Обобщая полученные экспериментальные данные и сравнивая их с литературными, можно заключить, что связывание указанных соединений с В-формой, по сравнению с А-формой, более прочное и приводит к более сильному изменению структуры двойной спирали НК.

1. Введение

Из анализа литературных данных [1–3] следует, что интеркаляционное взаимодействие (когда плоская часть молекулы внедряется между парами оснований HK) противоопухолевого соединения митоксантрона (MK) с двуспиральными ДНК существенно отличается от взаимодействия классических интеркаляторов (например, бромистого этидия) с ДНК. Следовательно, взаимодействие и соответственно термодинамические параметры связывания (константы связывания, энтальпия и энтропия связывания) возможно будут отличаться и при связывании МК с двухцепочечными РНК (дц-РНК), которые, как известно, в условиях, близких к физиологическим, находятся в А-форме [4], параметры двойных спиралей которых сильно отличаются от параметров двойной спирали ДНК в аналогичных внешних условиях (В-форма). Как и при связывании МК с ДНК, взаимодействие МК с дц-РНК отражается в изменении спектров поглощения и кругового дихроизма [3, 5]. Было показано [5, 6], что в физиологических условиях наблюдается лишь одна спектрофотометрически отличимая связанная форма МК и БЭ, которая, вполне возможно, учитывая литературные данные по связыванию МК и БЭ с ДНК [6-10], является интеркаляционной. Так как спираль А-типа по сравнению со спиралью В-типа

значительно плотнее, менее гидратирована и расстояние между фосфатными группами гораздо меньше [4], то можно предположить, что и интеркаляционное связывание МК и БЭ с А- и В-формами двойной спирали будут отличаться в количественном отношении. Поэтому, в данной работе исследовано связывание МК и БЭ с дц-РНК и определены изменения термодинамических параметров вследствие связывания.

2. Материалы и методы исследования

В работе были использованы сверхчистые синтетические дц-полинуклеотиды poly(rG)-poly(rC) и poly(rI)-poly(rC), митоксантрон, БЭ, (Sigma, CША). Исследования проводились в водном растворе, содержащем 0.14 М NaCl, 10 mM Tris, 0.5 mM EDTA, *pH* 7.4. NaCl, Tris, EDTA фирмы Serva (Германия). Значения *pH* определяли при 25°C. Концентрации дц-PHK, митоксантрона и БЭ определялись спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции: $\epsilon_{480} = 5800 \text{ M}^{-1}\text{сm}^{-1}$ для БЭ [6], $\epsilon_{659} = 25090 \text{ M}^{-1}\text{сm}^{-1}$ для митоксантрона [11], ϵ_{260} (P)= 7900 M⁻¹см⁻¹ для роly(rG)-poly(rC) и ϵ_{260} (P)=5000 M⁻¹см⁻¹ для poly(rI)poly(rC) [5].

Спектры поглощения и спектрофотометрическое титрование осуществлены на спектрофотометрах Cary-219 (США) и SPECORD M40 (ФРГ). Измерения проводились с использованием кварцевых кювет с плотно закрывающимися крышками. Точность определения температуры 0.05°C, а оптической плотности 10⁻⁴ оптических единиц.

При спектрофотометрическом титровании концентрация митоксантрона была приблизительно 10^{-6} м, а концентрация БЭ – 10^{-5} м. Соответственно при таких концентрациях оба соединения, в основном, находятся в мономерном состоянии.

Спектры поглощения комплексов были проанализированы и построены с помощью программы Microsoft Excel 2016. Экспериментальная погрешность при регистрации значений поглощений не превышала 5%.

3. Результаты и их обсуждение

Исследовалось взаимодействие МК и БЭ с poly(rG)-poly(rC) и poly(rI)poly(rC) по характеру изменения спектров поглощения при образовании комплексов. При постоянной концентрации исследуемых соединений получены спектры поглощения МК и БЭ в дальней УФ-области спектра при образовании комплексов с двухцепочечными poly(rG)-poly(rC). Из спектров поглощения определялись концентрации свободных и связанных соединений в растворе и строились изотермы связывания по методу, подробно описанному в работах [12, 13]. Обработка изотерм адсорбции и определение значений параметров связывания (константа связывания, энтропия и энтальпия связывания) нами подробно описана в работах [12–14].

В каждом случае из изотерм адсорбции были определены величины K (константа связывания) и n (число пар оснований дц-РНК, приходящихся на одно место связывания) и вычислены значения изменений термодинамических

параметров (свободной энергии ΔG , энтальпии ΔH и энтропии ΔS) при связывании МК и БЭ с poly(rG)-poly(rC) и poly(rI)-poly(rC).

Для определения величин ΔH и ΔS комплексов МК-дц-РНК и БЭ-дц-РНК изотермы адсорбции получены в интервале изменения температуры 293.15 $\leq T \leq$ 323.1 К (в этих условиях poly(rG)-poly(rC) и poly(rI)-poly(rC) находятся в двухцепочечном состоянии). Методом наименьших квадратов через экспериментальные точки проведены теоретические кривые по формуле (1) [12] и определены значения *K* и *n* (табл.1 и 2). По формуле (2) и (3) из работы [12] определены значения ΔG , ΔH и ΔS . Значения термодинамических параметров связывания для исследованных комплексов также приведены в табл.1 и 2.

Тип дц-	<i>T</i> , K	<i>K</i> ×10 ⁻⁴ ,	$-\Delta G$,	$-\Delta H$,	ΔS ,	п
РНК		M^{-1}	кДж/моль	кДж/моль	Дж/(К×моль)	
poly(rG)-	303.15	10.3±0.3	29.1±0.2			6.0±0.2
poly(rC)	308.15	9.8±0.5 [5]	29.4±0.2	28.1±1.5	5.9±1.2	5.9±0.3
	323.15	5.7±0.2 [5]	29.4±0.1			6.1±0.3
poly(rI)-	293.15	8.1±0.4	27.5±0.2			6.0±0.3
poly(rC)	298.15	7.5±0.3	27.7±0.1	25.5±1.5	9.6±1.3	6.2±0.2
	303.15	6.2±0.2	27.8±0.1			6.1±0.3

Табл.1. Термодинамические параметры связывания митоксантрона с poly(rG)-poly(rC) и poly(rI)-poly(rC)

Как следует из табл.1, значения n для МК-дц-РНК комплексов равно примерно 6-и, что приблизительно в два раза больше, чем для n в случае связывания МК с ДНК [2, 5]. Константа связывания МК с дц-РНК почти на порядок меньше, чем для комплексов МК-ДНК [2]. Из табл.1 также следует, что наблюдается избирательность связывания МК с GC- и IC-парами оснований. Константа связывания МК с poly(rG)-poly(rC) почти в два раза больше, чем для комплексов с poly(rI)-poly(rC).

Следует отметить, что для БЭ наблюдается противоположное соотношение при связывании с GC- и IC-парами (табл.2). Если сравнить изменение термодинамических параметров при связывании МК с ДНК [2] и дц-РНК (табл.1), то можно предположить, что так как вследствие связывания для обоих комплексов эти параметры изменяются аналогичным образом, то и связывание МК с ДНК и дц-РНК происходит аналогичным образом. Вполне возможно, что разница в значениях этих параметров обусловлена тем, что ДНК в исследуемых условиях находится в В-форме, а дц-РНК в А-форме, геометрия и плотность двойной спирали, гидратация нуклеотидов которой существенно отличаются друг от друга [4].

Сравним значения ΔH и ΔS при связывании МК с poly(rG)-poly(rC) (с A-формой спирали) и с ДНК (В-формой). Как следует из табл.1, для комплексов poly(rG)-poly(rC) – МК и МК-ДНК [2, 5] ΔH соответственно равны –28.1 и –42.3 кДж/моль, а ΔS – 5.9 Дж/(К×моль). Следовательно, вследствие связывания МК ΔH и ΔS больше изменяются при комплексообразовании с более гидратированной В-формой спирали: при взаимодействии МК с дц-ДНК происходит более

Тип дц-	<i>T</i> , K	$K \times 10^{-4}$,	$-\Delta G$,	$-\Delta H$,	ΔS ,	n
РНК		M^{-1}	кДж/моль	кДж/моль	Дж/(К моль)	
poly(rG)-	303.15	5.4±0.5	21.6±0.2			2.80±0.2
poly(rC)	313.15	9.8±0.5	21.3±0.2	31.4±1.5	31.0±1.3	3.0±0.2
	323.15	5.7±0.4	21.3±0.2			3.0±0.2
poly(rI)-	293.15	30±5	25.1±0.2			3.0±0.2
poly(rC)	298.15	25±3	25.2±0.2	31.0±1.5	19.3±1.2	3.1±0.2
	303.15	21±5	25.1±0.2			3.0±0.2

Табл.2. Термодинамические параметры связывания бромистого этидия с poly(rG)-poly(rC) и poly(rI)-poly(rC)

сильное изменение в геометрии двойной спирали ДНК, что и проявляется в спектрах кругового дихроизма [5, 15].

Сравним данные по связыванию poly(rG)-poly(rC) с МК и БЭ (табл.1 и 2). Как следует из табл.2, при связывании БЭ $\Delta H \approx -31.4$ кДж/моль, а $\Delta S \approx 31.0$ Дж/(К×моль), которые по величине отличаются от величины ΔH и ΔS для комплексов poly(rG)-poly(rC) – МК. Следовательно, если при связывании и происходит интеркаляция МК с более плотной и менее гидратированной А-формой спирали, то такое связывание отличается от интеркаляции БЭ в структуру poly(rG)-poly(rC). Так как МК помимо плоских ароматических колец содержит и длинные боковые алифатические цепи [3, 5], возможно, эти боковые группы и препятствуют более глубокому проникновению молекул МК между парами оснований дц-РНК, вследствие чего геометрия более плотной А-формы спирали изменяется мало (как и в случае спектров кругового дихроизма [15]). Поэтому величина ΔS для комплексов poly(rC) – МК.

4. Заключение

Обобщая вышеизложенные экспериментальные данные, можно заключить, что характер интеркаляционного взаимодействия и термодинамические параметры связывания противоопухолевого соединения МК и классического интеркалятора БЭ с дц-РНК (А-формой спирали) отличаются. Из данных, приведенных в табл.1 и 2 следует, что наблюдается избирательность связывания МК и БЭ с GC- и IC-парами оснований дц-РНК, причем противоположная для МК и БЭ. При сравнении с литературными данными по взаимодействию этих же соединений с B-формой [2, 6] можно заключить, что связывание с B-формой спирали по сравнению с А-формой более прочное и приводит к более сильному изменению структуры двойной спирали. Отметим, что полученные значения ΔH почти совпадают с результатами, полученными прямым микрокалориметрическим способом [6, 16].

Полученные данные могут иметь важное практическое значение для понимания молекулярных механизмов взаимодействия интеркалирующих соединений с различными формами нуклеиновых кислот, для разработки дизайна фармакологически актуальных соединений, синтезированных на их основе.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Sh. Agazwal, D.K. Jangir, R. Mehrota. J. Photochem. B. Biology, 5, 147 (2013).
- 2. P.O. Vardevanyan, M.A. Parsadanyan, A.P. Antonyan, S.N. Hakobyan. Russ. J. Phys. Chem. A, 91, 1143 (2017).
- A.T. Karapetyan, M.A. Torosyan, Yu.S. Babayan. Inter. J. Biochem. Biophys., 3, 49 (2015).
- 4. В. Зенгер. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. Москва, Мир, 1987.
- 5. Ю.С. Бабаян, Дж. Манзини. Молекулярная биология, 24, 1084 (1990).
- 6. Ю.С. Бабаян, Дж. Манзини, Ф.Квадрифолио. Молекулярная биология, 22, 898 (1988).
- 7. N. Li, Y. Ma, C. Yang, L. Guo, X. Yang. Biophys. Chem., 116, 199 (2005).
- 8. S. Dogra, P.Awasthi, S. Tripatti, T.P. Pradeep, M.S. Nair, R Barthwal. J. Biomol. Struct and Dyn., **32**, 1164 (2014).
- 9. J. Kapuscinski, Z. Darzyankiewiez. Biochem Pharmacol., 34, 4203 (1985).
- 10. S. Dogra, P.Awasthi, R. Barthwal. J. Photochem, Photobiol. B.: Biology, 123, 48 (2013).
- 11. M. Enache, E. Volanshi. Rev. Roum. Chim., 55, 255 (2010).
- 12. В.П. Калантарян, Р.С. Казарян, Ю.С. Бабаян. Известия НАН РА, Физика, **59**, 248 (2024).
- V.P. Kalantaryan, R. Martirosyan, Y. Babayan, R. Ghazaryan. Prog. Electromag. Res. Let., 91, 49 (2020).
- Yu.S. Babayan, S.N. Hakobyan, R.S. Ghazaryan, M.A. Shahinyan. Biophys. Rev. Let., 12, 165 (2017).
- 15. L. Tang, Z. Sun, J. Guo, Z. Wang. Chinese Optics Let., 4, 101 (2006).
- 16. J. Bhattacharyya, A. Basu, G.S. Kumar. J. Chem. Thermodyn, 75, 45 (2014).

MITOXANTHRONE AND ETHIDIUM BROMIDE BINDING PARAMETERS WITH A-FORM NUCLEIC ACIDS BY ADSORPTION ISOTHERMS

V.P. KALANTARYAN, R.S. GHAZARYAN, Y.S. BABAYAN, M.A. PARSADANYAN

An analysis of adsorption isotherms was carried out, based on experimentally obtained data on binding of the antitumor compound mitoxantrone (MTX) and ethidium bromide (EtBr) with the A-form of nucleic acids (NA). The results obtained indicate that there is selectivity in binding to base pairs of NA. Calculations show that the change in enthalpy due to the binding of MTX and EtBr to the A-form of NC (within the experimental error) is almost the same, but the change in entropy during binding is very different. Summarizing the obtained experimental data and comparing it with the literature, the binding of the indicated compounds to the B-form, in comparison with the A-form, is stronger and leads to a more significant alteration of the double helix structure of NA.