

БИОФИЗИКА

УДК 547.963.32

Академик НАН Армении С. С. Оганесян, С. Г. Арутюнян, Р. С. Казарян,
Ю. С. Бабаян, Н. В. Худавердян, Л. Г. Карапетян

**Связывание противоопухолевых антибиотиков митоксантрона
и аметантрона с двуспиральными синтетическими
полирибонуклеотидами**

(Представлено 2/IV 1996)

Синтетическое соединение митоксантрон и его производные (например, аметантрон) как противоопухолевые препараты с успехом применяются в химиотерапии рака. Митоксантрон содержит три плоских ароматических кольца, к которым присоединены длинные группы, содержащие гидроксил на концах (1-3). Биохимические исследования показали, что митоксантрон подобно антрациклинам и некоторым платиновым комплексам, проникая в клетку, изменяет структуру хроматина, связываясь с нуклеиновыми кислотами (3,4). Связывание митоксантрона с нуклеиновыми кислотами является главной причиной его цитотоксичной активности. Согласно результатам работ (1,5), несмотря на способность митоксантрона взаимодействовать с ДНК несколькими способами, основным механизмом связывания является интеркаляция.

Из анализа литературных данных следует, что взаимодействие митоксантрона с двуспиральными РНК (которые всегда находятся, в отличие от ДНК, в двуспиральной А-форме) исследовано недостаточно, а взаимодействие аметантрона почти не исследовано. В данной работе исследовано взаимодействие митоксантрона и аметантрона с двуспиральными полирибонуклеотидами, изучено влияние температуры на характер связывания и определено изменение энтальпии и других термодинамических параметров при связывании.

В работе использовали поли(А)·поли(У), поли(Г)·поли(С) и поли(І)·поли(С) ("Pharmacia"), митоксантрон и аметантрон ("Farmitalia"). Все препараты использовали без дополнительной очистки. Измерения проводились в водном растворе, содержащем

10 mM буфер Трис, pH 7,4, 0,1 M NaCl. Концентрация препаратов была определена с использованием следующих коэффициентов экстинкции ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$): поли(А)·поли(У) ($\epsilon_{260}(p) = 7140$), поли(Г)·поли(С) ($\epsilon_{260} = 7900$) и поли(І)·поли(С) ($\epsilon_{260} = 5000$), митоксантрон ($\epsilon_{665} = 20900$) и аметантрон ($\epsilon_{630} = 21000$).

Спектры поглощения и титрования получены на спектрофотометре "Сагу-219" (США), который подробно описан ранее (6).

Константа связывания и стехиометрия насыщения комплексов митоксантрона или аметантрона с синтетическими полирибонуклеотидами рассчитаны из спектров спектрофотометрического титрования. Для этого по спектрофотометрическим кривым титрования, при помощи формул (1), определяли концентрацию свободного (C_f) и связанного (C_b) митоксантрона, и была построена изотерма адсорбции в координатах Скэтчарда.

$$C_f = \frac{A - A_b}{A_f - A_b} C_0 ; \quad C_b = C_0 - C_f . \quad (1)$$

Здесь A_f и A_b — поглощение при 665 нм свободного и связанного митоксантрона и поглощение при 630 нм свободного и связанного аметантрона, A — поглощение при промежуточных концентрациях лекарственного препарата, A_b была определена из линейной экстраполяции зависимости A от $1/C_p$ при $\frac{1}{C_0} \rightarrow 0$.

Изотерму связывания препарата с двуспиральными полирибонуклеотидами описывали теоретической зависимостью (2), полученной для некооперативного связывания лигандов с гомополимером (7)

$$\frac{r}{C_f} = k(1 - nr) \left[\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{n-1} , \quad (2)$$

где $r = \frac{C_b}{C_p}$; k — константа связывания препарата, n — параметр, характеризующий стехиометрию комплекса полимер-лиганд при насыщении и равный числу пар оснований полимера, занимаемых одной связанной молекулой лиганда.

Используя значение k , определяли по формуле (3) изменение свободной энергии Гиббса ΔG при связывании

$$\Delta G = -RT \ln k , \quad (3)$$

где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура. Изменение энтропии ΔS при связывании вычисляли по формуле (4), используя значение ΔG и изменение энтальпии ΔH

$$\Delta S = -(\Delta G - \Delta H) / T. \quad (4)$$

Взаимодействие митоксантрона и аметантрона с двуспиральными полирибонуклеотидами отражается в изменениях поглощения в видимой и УФ-областях спектра. Как показывают экспериментальные данные, при взаимодействии наблюдаются в основном те же изменения в спектрах поглощения и кругового дихроизма, что при взаимодействии указанных препаратов с ДНК (1,5). Одновременно изменения спектров поглощения, происходящие при связывании митоксантрона и аметантрона с двуспиральными полирибонуклеотидами, качественно не отличаются. При постоянной концентрации митоксантрона с увеличением содержания полирибонуклеотида в растворе наблюдается гипохромизм и смещение максимума поглощения при 665 нм в сторону больших значений длины волны. При этом имеется четко выраженная изобестическая точка при 676 нм. Следовательно, в исследуемых условиях митоксантрон взаимодействует с двуспиральными РНК одним способом — вполне вероятно, интеркалирующим способом.

Определим параметры, характеризующие интеркаляционное связывание митоксантрона с двуспиральными РНК. Для этого были построены изотермы связывания митоксантрона и аметантрона с поли(С)·поли(С), поли(І)·поли(С) и поли(А)·поли(У) в координатах Скэтчарда при разных температурах, рассчитанных по формуле (1). Значение параметров k и n для комплексов, рассчитанные по формуле (2), приведены в таблице. Как следует из таблицы, значение n для комплексов митоксантрон-РНК составляет $n = 6 \div 8$, что почти в три раза больше, чем n для комплексов митоксантрон-ДНК, для которых $n = 2 \div 3$ (1,5). Константа связывания митоксантрона почти на порядок больше при связывании с ДНК, чем с РНК (1). Наблюдается также избирательность связывания митоксантрона с различными рибонуклеотидными парами. По величине сродства к митоксантрону их можно расположить в ряд $GC > IC > AU$, что противоположно сродству классического интеркалятора бромистого этидия с теми же парами (6).

**Термодинамические параметры связывания митоксантрона
и аметантрона с поли(А)·поли(У), поли(Г)·поли(С)
и поли(І)·поли(С) при некоторых температурах**

Тип полирибонуклеотида	t°, C	$k(\times 10^{-4}), M^{-1}$	$-\Delta G,$ ккал/моль	n
Митоксантрон				
поли(Г)·поли(С)	35	$9,8 \pm 1,5$	$7,1 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,3$
	50	$5,7 \pm 1,0$	$7,1 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,3$
	60	$3,3 \pm 1,0$	$6,8 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,4$
поли(І)·поли(С)	35	$8,2 \pm 1,2$	$7,0 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,5$
поли(А)·поли(У)	35	$3,1 \pm 0,5$	$6,4 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,5$
Аметантрон				
поли(Г)·поли(С)	35	$1,2 \pm 0,8$	$5,8 \pm 0,3$	< 10
поли(І)·поли(С)	35	$1,0 \pm 0,5$	$5,7 \pm 0,2$	< 10
поли(А)·поли(У)	35	$1,0 \pm 0,6$	$5,6 \pm 0,2$	< 10

Константа связывания аметантрона с РНК почти на порядок меньше, чем для комплексов митоксантрон-РНК (таблица). Из общепринятого анализа изотерм связывания следует, что стехиометрия комплекса при насыщении составляет не менее 0,1 молекулы аметантрона на пару оснований, а константа связывания порядка $10^4 M^{-1}$ (таблица). Более точное значение k , приведенное в таблице, получено при помощи обработки спектров титрования по способу, описанному в (6), согласно формуле (7).

Изменение энтальпии ΔH при связывании митоксантрона с поли(Г)·поли(С) было определено из анализа Вант-Гоффа зависимости k от температуры. Согласно формуле (5), тангенс угла наклона кривой $\ln k$ в зависимости от $1/T$ дает величину $-\frac{\Delta H}{R}$, если зависимость линейная:

$$\Delta H = -R \frac{\partial \ln k}{\partial (1/T)} \quad (5)$$

Как следует из экспериментальных данных, приведенных в таблице, для комплексов митоксантрон-РНК $\Delta H = -(10 \pm 2)$ ккал/моль. Полученное значение ΔH совпадает со значением энтальпии связывания интеркалирующих соединений с нуклеиновыми кислотами (6).

Зная ΔG и ΔH , можно оценить изменение энтропии при связывании по формуле (4). Расчеты показывают, что величина ΔS поло-

жительно и составляет 14 ± 2 кал/моль·град для комплексов митоксантрон-поли(G)-поли(C).

Если сравнить изменение термодинамических параметров при связывании митоксантрона и аметантрона с ДНК и РНК, можно заключить, что для комплексов препарат-ДНК и препарат-РНК эти параметры изменяются аналогичным образом. Следовательно, их связывание с ДНК и РНК происходит аналогичным образом. Разница в значениях параметров, характеризующих связывание указанных соединений с ДНК и РНК, обусловлена тем, что ДНК в исследуемых условиях находится в В-форме, а РНК — в А-форме, геометрии спиралей которых существенно отличаются друг от друга.

Институт кардиологии МЗ РА

Ереванский государственный университет

Республиканский противоопухолевый диспансер

Հայաստանի ԳԱԱ ակադեմիկոս Ս. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ս. Գ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ,
Ռ. Ս. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Յու. Ս. ԲԱԲԱՅԱՆ, Ն. Վ. ԽՈՒՂԱՎԵՐԴՅԱՆ, Լ. Գ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

Հակառուտացրային անտիբիոտիկներում միտոքսանտրոնի և ամետանտրոնի կապվելը կրկնակի պարուրային սինթետիկ պոլիոիբոնուկլեոտիդների հետ

Աշխատանքում ուսումնասիրված է հակառուտացրային անտիբիոտիկներ միտոքսանտրոնի և ամետանտրոնի փոխազդեցությունը կրկնակի պարուրային սինթետիկ ՌՆԹ-ի հետ:

Աշխատանքի նպատակն է պարզել ուսումնասիրվող դեղամիջոցների փոխազդեցության բնույթը կրկնակի պարուրային ՌՆԹ-ի հետ և հաշվել փոխազդեցությունը բնութագրող թերմոդինամիկական, պարամետրերի փոփոխությունը կապվելու հետևանքով:

Փորձնական հետազոտությունների ժամանակ օգտագործվել են պոլի (A)՝պոլի(U), պոլի(G)՝պոլի(C) և պոլի (I)՝պոլի(C) սինթետիկ պոլիոիբոնուկլեոտիդները: Տեսանելի տիրույթում ՌՆԹ-ի հետ կապման շնորհիվ, ըստ դեղանյութի կլանման սպեկտրների փոփոխով՝ կառուցվել են կապման իզոթերմները Սկեպչարդի կոորդինատներով տարբեր ջերմաստիճաններում և հաշվել կապման հաստատունի (K) և փոխազդեցության հազեցման դիպքում դեղանյութի մեկ մոլեկուլին բաժին ընկնող զույգ հիմքերի թիվը (n): Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ փոխազդեցությունը ունի ինտերկալացիոն բնույթ, ընտրողական է (սպեյի ուժեղ է GC — զույգ հիմքերի հետ), որի պատճառով ՌՆԹ-միտոքսանտրոն կոմպլեքսների համար $n \approx 6 \div 8$ և $k \approx 10^4$ կախված միջավայրի ջերմաստիճանից:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- 1 Ю.С.Бабаян, Д.Манзини, Молекулярная биология, т.24, №4, с.1084-1094 (1990).
- 2 Ю.С.Бабаян, Д.Манзини, Л.Е.Ксоза, Биофизика, т.36, №2, с.266-270 (1991).
- 3 Ю.С.Бабаян, В.А.Тумян, В.М.Асланян, Биофизика, т.35, №4, с.679-680 (1990).
- 4 S.G.Hagoutiunian, B.Bruni, R.Monnanni e.a., Inorganica Chimica Acta, v.184, p.127-132 (1991).
- 5 J.W.Lown, A.R.Morgan, S.F.Yen e.a., Biochemistry, v.24, 15, p.4028-4035 (1985).
- 6 Ю.С.Бабаян, Д.Манзини, Ф.Квадрифолио, Молекулярная биология, т.22, №4, с.898-910 (1988).
- 7 А.С.Заседателев, Г.В.Гурский, М.В.Волькенштсйн, Молекулярная биология, т.5, №2, с.245-252 (1974).