

СПЕКТРАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ АМІТОЗИНУ З НУКЛЕЇНОВИМИ КИСЛОТАМИ

Ящук В.М., Дудко О.В., Круглова Е.Б.¹, Ермак² Е.Л., Корнелюк О.І.³,
Кордиш М.А., Волощук Т.П.³, Потопальська Ю.А.³, Потопальський А.И.³,
Заїка Л.А.³, Болсунова О.І.³, Терентьев А.Г.³

Київський Національний Університет ім. Тараса Шевченка, м. Київ, Україна;

¹Інститут радіофізики та електроніки НАН України, Харків, Україна;

²Харківський Національний Університет ім. В.Н.Каразіна, Харків, Україна;

³Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна.

Протираковому препарату амітозину притаманна противірусна та імунотропна активність. Проте тонкі механізми його впливу на клітину залишаються не до кінця з'ясованими. Отже, вивчення механізмів дії амітозину та алкалоїдів, які входять до його складу, вельми актуально, бо відкриває нові можливості для розширення його застосування в клініці.

У даній роботі для з'ясування молекулярних механізмів взаємодії препаратів з ДНК та РНК застосовано люмінесцентні та спектрофотометричні методи досліджень, які є найбільш чутливими та інформативними щодо взаємодії біополімерів з лігандами.

Матеріал та методики досліджень.

Використовували для досліджень амітозин, берберин хлорид (Бх), тімусну ДНК, транспортна РНК, етідіум бромід (ЕБ) та аналог актиміцину Д - ActH для вивчення конкурентного зв'язку двох лігандів із ДНК .

Спектри флуоресценції та фосфоресценції реєструвалися за допомогою спектрометра, сконструйованого в лабораторії (Університету ім. Тараса Шевченка) і спектрофлюориметрів "Cary Eclipse" та "Hitachi" (Model 850). Спектри поглинання записані на спектрофотометрі Specord UV VIS.

Результати та їх обговорення

Дослідженнями реакції бласттрансформації лімфоцитів виявлено, що амітозин в терапевтичних дозах достовірно стимулює синтез ДНК(1). Це навело на думку про взаємодію амітозину із ДНК. Дослідження флюоресценції та фосфоресценції водних розчинів амітозину та одного із алкалоїдів цього препарату – берберину, в присутності ДНК, показали що спектр флюоресценції амітозину залежить від довжини хвилі збуджуючого випромінення (що є ознакою багатокomпонентності цього препарату)(2). Проте спектр флюоресценції берберину, як і очікувалось, не залежить від довжини хвилі збудження. Крім того зафіксовано, що інтенсивність флюоресценції берберину в присутності ДНК зростає приблизно в 60 разів порівняно з водним розчином берберину без ДНК. На нашу думку це може бути пов'язане з зв'язуванням молекули берберину з ДНК (можливо шляхом інтеркаляції). Такий ефект, як відомо, пов'язаний зі зменшенням ймовірності безвипромінювальної релаксації збудження та відповідного зростання квантового виходу флюоресценції. Подібний ефект спостерігається і для водних розчинів амітозину, однак аналіз отриманих результатів вказує на те що з усіх алкалоїдів амітозину з ДНК взаємодіє не лише берберин. Спектр флюоресценції амітозину в присутності ДНК відрізняється від спектру флюоресценції зв'язаного з ДНК берберину, хоча інтенсивність флюоресценції цього препарату значно зростає. Для ідентифікації компонент амітозину що зв'язуються з ДНК необхідні подальші дослідження.

Дослідження спектрів фосфоресценції показало що триплетне збудження переноситься вздовж макромолекули ДНК і локалізується на молекулах берберину (спектр фосфоресценції берберину дуже мало відрізняється від спектру фосфоресценції берберину з ДНК). Дослідження інтенсивності фосфоресценції в залежності від відносної концентрації берберину і пар основ ДНК показали, що мінімальна відстань, на яку передаються збудження, складає 20 пар основ ДНК або 7 нанометрів (3).

Отже, вище наведені дані підтверджують факт взаємодії амітозину та Берберину з ДНК. Тому метою роботи було з'ясування способу зв'язування берберину та амітозину з ДНК. Одним з підходів у даному напрямку були спектрофотометричні дослідження у видимій та ультрафіолетовій областях спектру. Використовували різні концентрації ДНК та постійні концентрації препаратів. Як показали спектрофотометричні виміри у видимій і в УФ областях відбувалось зміщення смуги поглинання, але із зменшенням інтенсивності її та появою ізобестичних точок. Останнє вказує на зв'язок цих речовин із матрицею ДНК та на утворення тільки одного типу зв'язку в області малих значень P/D. Такі спектрофотометричні прояви характерні для зв'язування етидія бромистого (ЕБ) з тимусною ДНК, для якого характерне утворення комплексу типу інтеркаляції. При цьому слід відмітити, що при великих концентраціях ДНК Бх спектри поглинання сумішей не проходять через ізобестичні точки, що вказує на утворення другого типу зв'язку комплексоутворення.

За різними методами розрахункових програм визначались точніші значення констант та величин зв'язку препаратів. Слід відмітити, що константа зв'язку із тимусною ДНК у ЕБ була на 2 порядки вище в порівнянні із алкалоїдами, які ми вивчали.

Для більш глибокого розуміння механізму зв'язку алкалоїдів Амітозину із ДНК проведено дослідження конкурентного зв'язку його алкалоїду Бх із ДНК в присутності інтеркалятора ЕБ. Результати досліджень, показали що ЕБ впливає на зв'язок Бх із ДНК, але слід відмітити, що він є конкурентом за місце зв'язку, який проходить в основному по другому типу зв'язку.

Нами показано (спектрофотометричними та флуоресцентними методами), що при зв'язуванні препарату амітозину з ДНК реалізується другий тип зв'язку – зв'язування в борозенку.

Вивчення спектральної взаємодії алкалоїду берберину із тРНК показало, що спектр зміщується від 480 нм до 535 нм і при цьому

інтенсивність флуоресценції збільшувалась. Розрахунки константи асоціації та стехіометрії зв'язування проведені на одному класі сайтів зв'язування Бх на молекулі тРНК показали, що при взаємодії алкалоїда із тРНК утворився специфічний комплекс Бх із упорядкованою просторовою структурою тРНК, при цьому слід відмітити, що стехіометрія указує на взаємодію, в усякому разі, 3-х молекул ліганда з нуклеїновою кислотою. Характер спектральних змін указує на вірогідний механізм інтеркаляції планарної катіонної молекули Бх між площинами азотистих основ спіральних ділянок тРНК. У цьому відношенні взаємодія Бх із тРНК ототожнюється із зв'язком цього інтеркалятора із ДНК, який описаний раніше .

Висновки

1. За допомогою флюоресцентних та спектрофотометричних методів дослідження було доведено про зв'язок берберину з ДНК шляхом інтеркаляції.
2. Спектрофотометричні та люмінесцентні дослідження показали, що компоненти амітозину зв'язуються з ДНК, переважно утворюючи комплекси другого типу (можливо, шляхом зв'язування з ДНК у борозенці).
3. Флуорометрія взаємодії Бх із тРНК свідчить про утворення специфічного комплексу берберина із упорядкованою просторовою структурою тРНК, стехіометрія якої указує на взаємодію, не менше ніж 3 молекул ліганда із нуклеїновою кислотою, що також підтвержує можливий зв'язок через інтеркаляцію.