

A 03.00.02  
A-868

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ  
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՏԻԳՐԱՆ ՍԱՄՎԵԼԻ ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

ԴՆԹ-*cis*-ԴԴՊ ԿՈՄՊԼԵՔՍՆԵՐԻ  
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Գ.00.02. Կենսաֆիզիկա մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների  
թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 2006

---

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА  
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ԱՐՄԵՆԻԱՆ ԿԵՆՏՐԱԼԻ ՍԱՄՎԵԼՈՎԻՉ

ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ *cis*-ДДП-ДНК

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности

03.00.02 – Биофизика

ЕРЕВАН - 2006

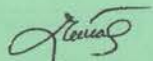
Ատենախոսության բեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝ կենսաբանական գիտ. դոկտոր,  
պրոֆեսոր Պ.Հ. Վարդևանյան  
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ ֆիզ. մաթ. գիտ. դոկտոր,  
պրոֆեսոր Ա.Թ. Կարապետյան  
կենս. գիտ. թեկնածու Ն.Հ. Կարապետյան  
Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության  
ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2006թ. ապրիլի 28-ին,  
ժամը 14<sup>00</sup>-ին Երևանի պետական համալսարանում գործող 051  
Մասնագիտական Խորհրդի նիստում (375025, Երևան, Ալեք Մանուկյան 1,  
ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ԵՊՀ գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2006թ. մարտի 24-ին

051 Մասնագիտական Խորհրդի  
գիտական քարտուղար,  
կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր  Լ.Լ. Նափասարյան

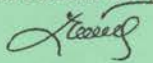
Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель: доктор биологических наук,  
профессор П.О. Вардеванян  
Официальные оппоненты: доктор физ.-мат. наук,  
профессор А.Т. Карапетян  
кандидат биол. наук Н.Г. Карапетян  
Ведущая организация: Институт молекулярной биологии НАН РА

Защита диссертации состоится 28 апреля 2006г., в 14<sup>00</sup> часов на заседании  
Специализированного Совета 051 при Ереванском государственном универ-  
ситете (375025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЕГУ

Автореферат разослан 24 марта 2006г.

Ученый секретарь Специализированного Совета 051,  
доктор биол. наук, профессор  Լ.Ա. Նավասարդյան



18.04-2006

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы: Известно, что при функционировании ДНК меняет свою конформацию в зависимости как от последовательности, так и от условий среды. Механизмы этих изменений различны. При одном из них происходит разрушение упорядоченной двуспиральной структуры ДНК и образуются неупорядоченные одноцепочечные клубки. Другой тип структурного превращения наблюдается в пределах двухцепочечного состояния. Принципиально эти превращения отличаются во внешних проявлениях, однако термодинамически они схожи. С этой точки зрения выяснение особенностей структурных превращений ДНК, а также механизмов влияния физико-химических факторов среды на эти превращения являются важнейшими проблемами молекулярной биофизики.

На функциональную активность ДНК существенное влияние оказывают различные органические и неорганические соединения (белки, другие нуклеиновые кислоты, ионы металлов и т.п.), которые активно участвуют в процессах репликации, транскрипции. На ДНК существенное влияние оказывают также биологически активные соединения различной природы, которые способны проникнуть в клетку. Эти вещества могут влиять на ДНК опосредовано, или непосредственно, проникнув в ядро клетки и связываясь с ДНК.

Среди биологически активных соединений важное место занимают противоопухолевые препараты, среди которых особое место занимают платину содержащие соединения, в частности *cis*- и *trans*-диаминдихлорплатина (*cis*- и *trans*-ДДП). Для понимания биологической активности *cis*-ДДП важны исследования перехода спираль-клубок его комплексов с ДНК. В ходе жизнедеятельности в клетке могут изменяться физико-химические условия среды, в частности рН, поэтому важно также выяснение особенностей влияния

этого фактора на взаимодействие различных соединений или ионов металлов с ДНК.

С другой стороны, конформационные превращения ДНК могут быть обусловлены специфическим сродством молекул лиганда с определенными участками ДНК, поэтому важно также выяснение этих явлений. Другой важной проблемой является влияние концентрации лиганда на биологическую активность ДНК, особенно когда данное соединение с ДНК взаимодействует более, чем одним способом.

Оценка генотоксических свойств противоопухолевых соединений, и в частности, цисплатины является актуальной проблемой в связи с необходимостью знания механизмов формирования повреждений ДНК и поиском возможностей предотвращения их неблагоприятного побочного воздействия на нормальные клетки организма.

Метод ДНК-комет (гель-электрофорез отдельных клеток) является чувствительным и быстрым методом анализа повреждений и репарации ДНК. Одна из модификаций метода позволяет оценивать образование сшивок в молекуле ДНК

Цель и задачи исследования: Целью настоящей диссертационной работы явилось исследование особенностей взаимодействия ДНК с *cis*-ДДП методами теоретического конформационного анализа, спектроскопическими методами (УФ-спектроскопией, круговым дихроизмом) и методом ДНК-комет.

В соответствии с целью исследований в работе были поставлены следующие задачи:

- разработать модель связывания *cis*-ДДП с ДНК, описывающую среднее число связанных с ДНК молекул лиганда;
- используя метод термического плавления определить зависимость типа связывания *cis*-ДДП с ДНК при сверхнизких концентрациях *cis*-ДДП;

- методом кругового дихроизма изучить особенности конформационных переходов в ДНК при ее комплексообразовании с *cis*-ДДП;
- изучить влияние pH среды на параметры плавления комплексов *cis*-ДДП с ДНК;
- методом комет изучить *in vitro* повреждения ДНК при воздействии *cis*-ДДП.

Научная новизна: Данные, представленные в диссертационной работе выявляют некоторые особенности биологической активности противоопухолевого препарата *cis*-ДДП, поскольку:

- впервые рассмотрена модель, описывающая флуктуации среднего числа связанных с центрами связывания молекул лиганда и его дисперсию;
- на основании результатов плавления комплексов ДНК с *cis*-ДДП показано, что в зависимости от температуры и ширины интервала плавления комплексов, можно дифференцировать три области изменения концентрации *cis*-ДДП, при которых он с ДНК взаимодействует различными механизмами;
- показано, что при сверхнизких концентрациях *cis*-ДДП наблюдаются существенные изменения в третичной структуре макромолекулы, а именно, образуются кольцевые структуры в молекуле ДНК, вследствие чего она денатурирует при более высоких значениях температуры, чем ее линейная молекула. Показано также, что протонирование АТ нуклеотидных пар затрудняется и предпочтительным становится протонирование GC пар;
- обнаружено, что в комплексах *cis*-ДДП-ДНК с увеличением концентрации *cis*-ДДП на кривой зависимости  $\Delta T(pH)$  происходит монотонное перемещение точки минимума в сторону более низких pH и более высоких значений  $\Delta T$ . Показано, что подобное поведение  $\Delta T(pH)$  является результатом образования внутриветвистых разрывов в ДНК, которые уменьшают количество кольцевых структур в молекуле ДНК и увеличивают долю линейных участков;

– методом ДНК-комет в лимфоцитах человека выявлено образование сшивок *cis*-ДДП с ДНК.

Практическая ценность работы: Полученные в работе данные имеют практическое значение, поскольку проливают свет на особенности взаимодействия *cis*-ДДП с ДНК. Они выявляют некоторые аспекты биологической активности этого противоопухолевого препарата. Более того, на основании полученных данных можно получить дополнительную информацию о влиянии селективно связывающихся с ДНК соединений на ее функционирование и разработать новые подходы для целенаправленного регулирования работы генетического аппарата.

Необходимо также отметить, что исследования перехода спираль-клубок комплексов ДНК с *cis*-ДДП при различных значениях pH раствора выявляют особенности ионизации функциональных групп ДНК и ее взаимодействие с лигандами.

Данные работы могут быть использованы в специальных лекционных курсах соответствующих факультетов ЕГУ.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

На защиту выносились следующие положения:

1. влияние флуктуаций внешней среды на адсорбцию лигандов на макромолекуле на примере комплексов ДНК-*cis*-ДДП и расчет среднего числа связанных с ДНК молекул *cis*-ДДП и его дисперсия;
2. поведение параметров плавления комплексов *cis*-ДДП-ДНК в зависимости от концентрации лиганда при нейтральном и экстремальном значениях pH среды;
3. оценка количества сшивок в ДНК под действием *cis*-ДДП методом комет, с применением УФ-излучения.

Апробация работы: Материалы диссертационной работы были доложены на 13-ой и 14-ой (Albany, USA, 2003, 2005) международной конференциях по

стереодинамике биомacroмолекул, на международном симпозиуме по гидратации и термодинамике молекулярного распознавания (Цахкадзор, Армения, 2005).

Публикации: По теме диссертационной работы опубликовано 8 научных работ.

Объем и структура работы: Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов.

Работа изложена на 112 страницах машинописного текста, включающего 17 рисунков, 5 таблиц и списка литературы, насчитывающий 189 наименований.

Содержание работы: В первой главе дан обзор литературы по структуре и конформационным превращениям ДНК, механизмам взаимодействия лигандов с ДНК, а также исследованиям, касающихся повреждений в молекуле ДНК.

Вторая глава посвящена материалам и методам исследования. В работе использовались сверхчистые препараты ДНК, *cis*-ДДП, концентрация которого изменялась в интервале  $-10^{-5} < \tau_b < 10^{-3}$  ( $\tau_b$  число связанных молекул лиганда с ДНК). Исследования проводились в буфере  $10^{-2}$  М NaClO<sub>4</sub> +  $10^{-3}$  М NaCl. Ионная сила  $[Na^+] = 0.01$ .

В исследованиях применялись методы УФ-плавления, КД и метод комет. Кривые плавления снимались на спектрофотометре Unicam-SP8-100 (Англия). Нагрев осуществлялся с помощью Temperature Programme Controller SPX 876. Скорость сканирования температуры 0.25°C/мин.

Кометы анализировались на флюоресцентном микроскопе. Статистический анализ проводился с использованием теста ANOVA из пакета STATGRAPHICS Plus.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

1. Адсорбция *cis*-ДДП на ДНК в флуктуирующей среде: Во всех работах, посвященных исследованию взаимодействия *cis*-ДДП с ДНК, исследования проводятся при фиксированных значениях параметров внешней среды, т.е. в отсутствии внешнего шума, хотя очевидно, что внешний шум никогда не бывает строго равным нулю. По этой причине естественным является исследование влияния флуктуаций внешней среды на адсорбцию *cis*-ДДП на ДНК, поскольку, как показывают теоретические и экспериментальные исследования, поведение физико-химической системы в флуктуирующей среде может сильно отличаться от поведения детермированной системы. Исследование влияния внешнего шума на систему представляется важным еще и потому, что экспериментатор при воздействии на исследуемую систему по своему усмотрению может изменять вид шума и, исследовав систему, получать дополнительную информацию о ней. Следует отметить, что наряду с внешним шумом, на систему действует внутренний шум, обусловленный случайным характером взаимодействия *cis*-ДДП с ДНК. Возникает важная проблема идентификации источника шума, т.е. возникает необходимость выяснить чем обусловлены экспериментально измеренные флуктуации числа адсорбированных *cis*-ДДП на ДНК - внешним шумом или же случайным характером взаимодействия *cis*-ДДП с ДНК (внутренним шумом).

Адсорбцию и десорбцию *cis*-ДДП на ДНК представим как квазихимическую реакцию связывания и распада *cis*-ДДП с адсорбционным центром на ДНК:



где:  $(LM)$ - комплекс *cis*-ДДП с ДНК,  $k_1$  и  $k_{-1}$ - константы скоростей образования и распада комплекса. ДНК представим в виде одномерного

кристалла с  $N$  мест связывания, а *cis*-ДДП, имеющий намного меньшие линейные размеры, при адсорбции занимает  $n$  мест на ДНК. Принимая, что число адсорбированных лигандов на макромолекуле равно  $x$ , для случая малого заполнения получено уравнение, описывающее изменение во времени числа адсорбированных на макромолекуле лигандов. В качестве параметров в уравнение входят: константы скоростей образования и распада комплекса ДНК с *cis*-ДДП ( $k_1$  и  $k_{-1}$ ); полное число мест связывания на ДНК ( $N$ ); число мест на ДНК, с которыми может связываться одна молекула *cis*-ДДП ( $n$ ); концентрация свободных молекул *cis*-ДДП в растворе ( $c_f$ ).

Отметим, что малые заполнения не только позволяют относительно просто описать процесс адсорбции, но имеют и самостоятельный интерес. В условиях реальной клеточной системы в подавляющем большинстве случаев заполнение лигандами макромолекул можно считать малым. Малые заполнения представляют интерес еще и потому, что малое количество лигандов на макромолекуле, при прочих равных условиях, слабо возмущает систему и, полученные результаты адекватно описывают систему.

Под воздействием внешней случайной среды начнут флуктуировать параметры  $N, c_f, k_1, k_{-1}$ , входящие в уравнение. Чтобы излишне не загромождать работу вычислениями, а результаты исследования сделать более наглядными, рассмотрен случай, когда флуктурует число адсорбционных мест  $N$ , что может происходить в результате изменения сродства адсорбционного центра на ДНК под воздействием случайно изменяющихся факторов внешней среды. Как правило, причиной флуктуации является действие не одного выделенного фактора, а действие множества независимых факторов, так что их суммарное воздействие согласно центральной предельной теореме имеет гауссовское распределение, и следовательно  $N(t)$  можно представить в виде

суммы среднего  $\bar{N}$  и гауссовского шума  $\xi(t)$ , среднее значение которого равно нулю, т. е.  $\overline{\xi(t)} = 0$ . Имеем следующее выражение для  $N(t)$

$$N(t) = \bar{N} + \sigma_n \cdot \xi(t), \quad (2)$$

где:  $\sigma_n$  - интенсивность шума. Принимаем, что интенсивность шума не зависит от  $t$ , т. е. имеем стационарный шум. Как правило, в подавляющем большинстве случаев время корреляции флуктуаций внешней среды много меньше характерного времени изменения переменной в системе, так что часто "быстрые" флуктуации среды заменяют шумом без "памяти", т. е. переходят к пределу белого шума. Таким образом, принимаем, что для  $N(t)$  имеем гауссовский белый шум, с характеристиками:  $\overline{\xi(t)} = 0$ ,  $\overline{\xi(0) \cdot \xi(t)} = \delta(t)$ , где:  $\delta(t)$  - дельта функция и все коммулянты выше второго равны нулю. Подставив (2) в уравнение, описывающее во времени числа адсорбированных на ДНК молекул лигандов, получим стохастическое дифференциальное уравнение, стационарное решение которого является изотермой связывания лигандов с ДНК. Учитывая, что *cis*-ДДП сильно связывается с ДНК, получено следующее приближенное выражение для среднего числа связанных с ДНК молекул *cis*-ДДП в виде

$$\bar{x} = \frac{\bar{N}}{2n-1} \left( 1 - \frac{1}{(2n-1)Kc_f} \right) \quad (3)$$

где  $K = k_1/k_{-1}$  - константа равновесия квазихимической реакции (1).

Уравнение (3) описывает прямолинейную зависимость  $r$  ( $r = \bar{x}/\bar{N}$ ) от  $1/c_f$  и отсекает на оси абсцисс отрезок, равный  $K(2n-1)$ , и отрезок  $1/2n-1$  на оси ординат (рис. 1).

Для случая связывания *cis*-ДДП с ДНК получено следующее приближенное выражение для дисперсии связанных *cis*-ДДП с ДНК

$$\frac{\Delta x^2}{k_{-1}\sigma_n^2} = \frac{Kc_f}{2(2n-1)} \quad (4)$$

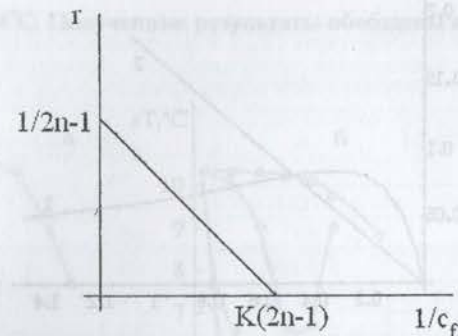


Рис. 1. Зависимость количества адсорбированного лиганда ( $r$ ), приходящегося на пару оснований от  $1/c_f$ .

Полученные формулы (3) и (4) могут служить основой для анализа связывания *cis*-ДДП с ДНК в флуктуирующей среде в случае, когда под воздействием внешнего шума случайным образом изменяется число мест связывания на ДНК. Из (3) видно, что, как и ожидалось, при больших  $Kc_f$   $\bar{x}$  выходит на насыщение, а из (4) видно (см. рис. 2, кривая 2), что  $\frac{\Delta x^2}{k_{-1}\sigma_n^2}$  линейно зависит от  $Kc_f$ . Сопоставление формулы (3) с экспериментальными данными позволит определить как константу связывания *cis*-ДДП с ДНК ( $K$ ), так и число мест на ДНК, с которыми может связаться одна молекула *cis*-ДДП ( $n$ ).

Анализ дисперсии (4) и его сопоставление с экспериментальными данными позволяет выяснить, чем обусловлены экспериментально наблюдаемые флуктуации числа адсорбированных *cis*-ДДП на ДНК - внешним шумом или же случайным характером взаимодействия *cis*-ДДП с ДНК (внутренним шумом).

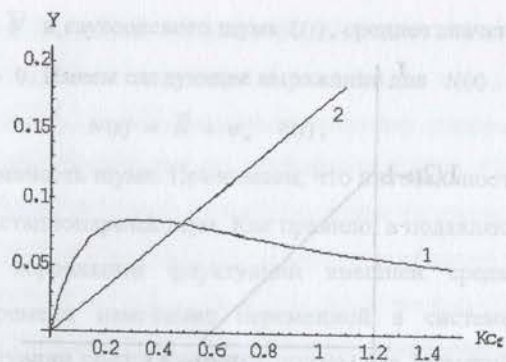


Рис. 2. Зависимость дисперсии  $Y$  от  $c_f$ , выраженной в единицах константы связывания  $K$ . На оси  $Y$  нанесены значения дисперсии  $\frac{\Delta x^2}{N}$  для случая, когда дисперсия обусловлена внутренним шумом (кривая 1) и значения дисперсии  $\frac{\Delta x^2}{k_{-1} \cdot \sigma_n^2}$  для случая, когда дисперсия обусловлена внешним шумом (кривая 2) при  $n=2$ .

2. Исследование комплексов ДНК- *cis*-ДДП: Известно, что различные факторы среды (ионная сила, рН и т.п.) могут существенно влиять на структуру и функционирование ДНК, а также на ее взаимодействие с лигандами. С этой точки зрения влияние рН на комплексообразование ДНК с *cis*-ДДП мало изучено. Для выяснения влияния протонирования или депротонирования на взаимодействие *cis*-ДДП с ДНК нами исследовался переход спираль-клубок комплексов *cis*-ДДП-ДНК при экстремальных значениях рН раствора.

На рис.3. приведены зависимости температуры  $T_m(\text{pH})$  (а) и ширины интервала плавления  $\Delta T(\text{pH})$  (б) комплексов ДНК тимуса телят с *cis*-ДДП при концентрациях лиганда  $10^{-2} < \Gamma_b < 10^{-5}$  при кислых значениях рН. Как видно из рисунка, в присутствии *cis*-ДДП процесс протонирования ДНК происходит более эффективно, при этом, уменьшение температуры и ширины интервала плавления начинается при более высоких рН. В присутствии *cis*-ДДП, уже при

концентрациях платинового комплекса  $\Gamma_b=10^{-5}$ , температура плавления ДНК растет более, чем на  $4^\circ\text{C}$ . Полученные результаты обобщены в табл.1.

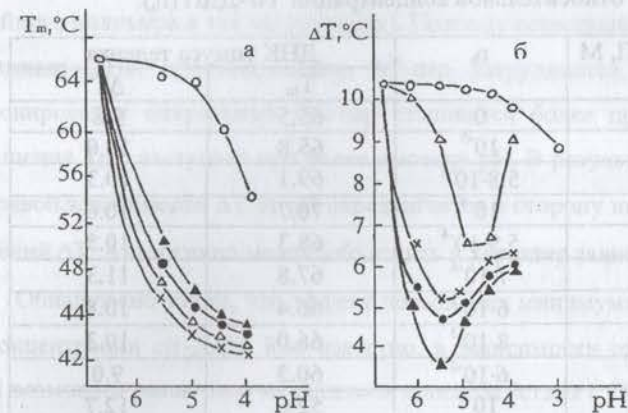


Рис.3. Зависимость температуры и интервала плавления ДНК тимуса телят от рН среды при различных концентрациях *cis*-ДДП: (o) - чистая ДНК, (▲) -  $\Gamma_b = 10^{-5}$ ; (●) -  $\Gamma_b = 10^{-4}$ ; (x) -  $\Gamma_b = 10^{-3}$ ; (Δ) -  $\Gamma_b = 10^{-2}$ .

Как видно из таблицы, уже при концентрациях *cis*-ДДП  $\Gamma_b=10^{-5}$  имеет место сильное (почти скачкообразное) изменение параметров  $T_m$  и  $\Delta T$  ДНК.

Следует отметить, что использованные концентрации так малы (на 10000 пар нуклеотидов приходится 1-2 молекулы *cis*-ДДП), что объяснить столь значительные изменения параметров плавления, используя известные теории плавления ДНК-лиганд комплексов, нельзя. Подобное поведение параметров перехода можно объяснить, исходя из того, что *cis*-ДДП вызывает образование псевдо-кольцевых структур ДНК посредством сшивания линейной участков ДНК, отдаленных друг от друга вдоль цепи. Необходимо также отметить, что специфичный для интервала плавления минимум, наблюдаемый на кривых  $\Delta T(\text{pH})$  для чистой ДНК при рН  $2.8 \pm 3.0$ , смещается к рН 5.5.

Таблица 1

Зависимости температуры ( $T_m$ ) и интервала плавления ( $\Delta T$ ) ДНКот относительной концентрации *cis*-ДДП ( $r_b$ ).

C, <i>cis</i> -ДДП, М	$r_b$	ДНК тимуса теленка	
		$T_m$	$\Delta T$
0	0	65.5	9.8
$10^{-9}$	$10^{-5}$	65.8	10.0
$5 \cdot 10^{-9}$	$5.8 \cdot 10^{-5}$	69.1	10.3
$10^{-8}$	$10^{-4}$	70.7	10.6
$5 \cdot 10^{-8}$	$5.9 \cdot 10^{-4}$	68.3	10.5
$10^{-7}$	$7 \cdot 10^{-4}$	67.8	11.3
$5 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-3}$	66.4	10.8
$10^{-6}$	$8 \cdot 10^{-3}$	66.0	10.3
$5 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-2}$	60.3	9.0
$10^{-5}$	$10^{-1}$	52.0	12.7
$5 \cdot 10^{-5}$	$5.8 \cdot 10^{-1}$	50.5	13.0

Аналогично, в сторону более высоких рН сдвигается и температура плавления (уменьшение  $T_m$  начинается с рН 6.0, вместо рН 4.0). Наличие минимума на кривой  $\Delta T$ (рН) объясняется протонированием АТ-пар только в расплавленной форме и GC-пар как в расплавленной, так и в спиральной формах. Подобный характер механизмов протонирования пар азотистых оснований приводит к тому, что  $T_{AT}$  непрерывно уменьшается с понижением рН, а  $T_{GC}$  выходит на насыщение, начиная с определенного значения рН. В результате, как это следует из формулы Франк-Каменецкого ( $\Delta T = K(T_{GC} - T_{AT})$ ) для гетерогенной блочной ДНК,  $\Delta T$  при некотором значении должен пройти через минимум. Исходя из этого можно заключить, что образование псевдокольцевых структур ДНК, и, следовательно сильное изменение третичной структуры макромолекулы не может не повлиять на механизм ионизации азотистых оснований. Дело в том, что плавление линейной и кольцевой ДНК с одним и тем же GC-содержанием существенно отличаются друг от друга. Для

кольцевых ДНК физика перехода спираль-клубок существенно отличается от ее линейного аналога (с энергетической точки зрения плавление кольцевой ДНК, в связи с ее топологическими особенностями, происходит труднее, чем для линейного полимера в тех же условиях). Поэтому естественно полагать, что для кольцевых ДНК протонирование АТ-пар затрудняется, в то время как протонирование спиральных GC-пар становится более предпочтительным и насыщение  $T_{GC}$  наступает при более высоких рН. В результате этого минимум на кривой зависимости  $\Delta T$  от рН передвигается в сторону низких рН и высоких значений  $\Delta T$ . Аналогично можно объяснить и характер зависимости  $T_m$ (рН).

Обнаружено также, что эффект повышения минимума на  $\Delta T$ (рН) зависит от концентрации *cis*-ДДП. Как известно, в зависимости от концентрации *cis*-ДДП возможны различные механизмы взаимодействия с ДНК. С увеличением концентрации *cis*-ДДП меняются и механизмы комплексообразования, при этом одним из основных типов комплексообразования является внутрицепочечные бидентальные взаимодействия *cis*-ДДП с ДНК. Этот тип взаимодействия приводит к возникновению дополнительного напряжения вдоль цепи ДНК. Энергия этих напряжений приводит к разрыву внутри колец, вследствие чего уменьшается доля кольцевых структур в ДНК. Тем самым увеличивается доля линейной фракции ДНК, поэтому параметры плавления приближаются к таковым, свойственным линейной ДНК. Аналогичные результаты были получены при щелочных значениях среды, что является подтверждением того, что при сверхнизких концентрациях лиганда в молекуле ДНК действительно образуются кольцевые структуры, вследствие чего меняется рК АТ- и GC пар.

3. Образование повреждений в комплексах ДНК *cis*-ДДП: Для использования УФ-излучения, вызывающего разрывы в ДНК нами вначале был определен уровень репарации сшивок ДНК, индуцированных *cis*-ДДП, так как сшивки ДНК, образуемые *cis*-ДДП также могут со временем репарироваться. Уровень

миграции ДНК сравнивался в вариантах непосредственно после обработки цис-платиной и после репарации. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Действие *cis*-ДДП на миграцию ДНК непосредственно после обработки и после 1 часа репарации в лейкоцитах человека

Обработка	Доза ( $\mu\text{M}$ )	Уровень повреждений ДНК непосредственно после обработки в у.е. (M $\pm$ SEM)	Уровень повреждений ДНК после 1 часа репарации в у.е. (M $\pm$ SEM)
Контроль		2.0 $\pm$ 0.0	12.7 $\pm$ 3.0
Цис- <i>CIS</i> -ДДП	0.6	12.5 $\pm$ 7.5	14.0 $\pm$ 13.0
	6	9.0 $\pm$ 6.0	8.5 $\pm$ 8.5
	60	2.5 $\pm$ 2.5	13.5 $\pm$ 9.5
	300	28.0 $\pm$ 9.0	1.0 $\pm$ 0.0
	600	24.5 $\pm$ 9.5	2.5 $\pm$ 0.5

P > 0.05 при сравнении всех вариантах (ANOVA test)

Показано, что нет статистически достоверной разницы в уровне миграции ДНК между контрольными и обработанными *cis*-ДДП вариантами и между вариантами с и без инкубации ( $p > 0.05$  во всех сравниваемых случаях). Следовательно, сшивки *cis*-ДДП-ДНК в течение одного часа не репарируются. Наши результаты подтверждаются литературными данными. Показано, что *in vitro* уровень репарации сшивок ДНК, вызванных *cis*-ДДП очень низкий, а *in vivo* все *cis*-ДДП ДНК аддукты из крови раковых больных полностью удаляются только через 21 час.

На втором этапе работы для оценки образования сшивок ДНК *cis*-ДДП клетки облучались УФ волнами для индукции разрывов ДНК. Сравнивалась миграция ДНК при действии только УФ-облучения и при комбинированном действии УФ-облучения и *cis*-ДДП. Полученные результаты представлены в

таблице 3. На основе результатов исследований были разработаны 5 рабочих концентраций *cis*-ДДП, вызывающие сшивки ДНК от минимального (уровень УФ-индуцированной миграции ДНК при действии *cis*-ДДП не изменяется) до максимального уровня (УФ-индуцированная миграция ДНК при действии *cis*-ДДП снижается до уровня контрольных вариантов).

Таблица 3.

Комбинированное действие *cis*-ДДП с УФ-облучением на миграцию ДНК в лейкоцитах человека

Обработка	Доза ( $\mu\text{M}$ )	(M $\pm$ SEM) в у.е.
Контроль		12.7 $\pm$ 3.0
УФ-облучение		214.3 $\pm$ 73.0
<i>cis</i> -ДДП+УФ-облучение	0.6	234.0 $\pm$ 11.0
	6	202.0 $\pm$ 11.0
	60	160.0 $\pm$ 16.0*
	300	19.5 $\pm$ 12.5**
	600	6.5 $\pm$ 4.5***

\*P < 0.05, \*\*P < 0.001 и \*\*\*P < 0.001 (ANOVA test)

Представленные результаты получены на основании 2-4 независимых экспериментов (Рис.4). *cis*-ДДП в концентрациях 0.6 $\mu\text{M}$  (234.0 $\pm$ 11.0 у.е.) и 6  $\mu\text{M}$  (202.0 $\pm$ 11.0 у.е.) не вызывает достоверного снижения вызванной УФ-облучением миграции ДНК (214.3 $\pm$ 73.0 у.е.,  $p > 0.05$ ). *cis*-ДДП, при концентрациях 60 и 300  $\mu\text{M}$  достоверно снижает миграцию ДНК от 214.3 $\pm$ 73.0 до 160.0 $\pm$ 16.0 ( $p < 0.05$ ) и 19.5 $\pm$ 12.5 у.е. ( $p < 0.001$ ) соответственно. При самой высокой концентрации 600  $\mu\text{M}$  миграция ДНК снижается примерно в 30 раз по сравнению с уровнем, индуцированным УФ-облучением (6.5 $\pm$ 4.5 против 214.3 $\pm$ 73.0 у.е.,  $p < 0.001$ ).

Эффект комбинированной обработки *cis*-ДДП и УФ-облучения был представлен также в процентах от повреждений ДНК, индуцированных УФ-облучением. При этом, уровень повреждений ДНК, вызванный УФ-

облучением, условно принимался за 100%. Исходя из этого вычислялся уровень миграции при комбинированной обработке. Величина миграции ДНК была рассчитана с помощью формулы:

$$\frac{У.Е(УФ+сис-CIS-ДДП) - У.Е(К)}{У.Е(УФ) - У.Е(К)} \times 100\%$$

*cis*-ДДП в концентрациях 60 и 300  $\mu$ М приводит к 28 и 95.8 % снижению миграции ДНК в у.е. по сравнению УФ-облучения, тогда как 600  $\mu$ М приводит к полной задержки миграции ДНК.

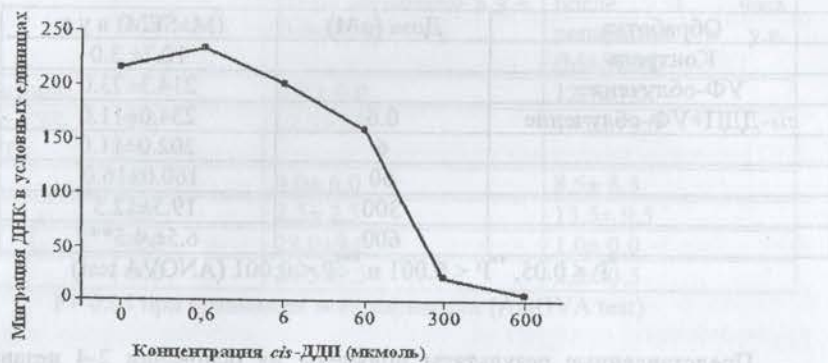


Рис. 4 Результаты комбинированной обработки ДНК с *cis*-ДДП и УФ-облучением в методе ДНК-комет.

Полученные результаты совпадают с исследованиями S. Pfuhrer и H. Wolf (1996), в которых индукция сшивок ДНК-*cis*-ДДП изучалась с использованием метилметансульфоната (MMS) как индуктора разрывов ДНК. По данным авторов, *cis*-ДДП при концентрации 330  $\mu$ М приводит к уменьшению хвоста кометы на 85%, а концентрация 1000  $\mu$ М уменьшает хвост на 95% по сравнению с MMS. Следовательно, модели для изучения сшивок ДНК с применением УФ-облучения методом комет имеют ту же чувствительность, что и модели с

применением MMS. Следует особо отметить, что под микроскопом ядра клеток, подверженных воздействию *cis*-ДДП, благодаря образованию сшивок, были более компактны, чем ядра клеток в контроле. Полученные результаты свидетельствуют о том, что *cis*-ДДП формирует сшивки (кольцевые структуры) в ДНК, что согласуется с механизмом их действия на ДНК в условиях *in vitro*.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных в работе данных можно отметить, что изменения параметров плавления и спектров КД комплексов *cis*-ДДП-ДНК претерпевают существенные изменения при сверхнизких концентрациях *cis*-ДДП, что обусловлено изменениями в структуре ДНК (образованием кольцевых структур). Образование кольцевых структур в линейной молекуле ДНК приводит к изменению ионизации азотистых оснований, отражающийся на поведении  $\Delta T$  и  $T_m$  при различных значениях pH раствора. Эти результаты подтверждаются данными, полученными методом ДНК комет, который выявляет образование сшивок в молекуле ДНК.

Проведенное исследование также указывает и на то, что вопросы, связанные с пониманием механизмов действия металл содержащих соединений еще далеки от своего окончательного разрешения. С этой точки зрения полученные в данной работе результаты могут иметь определенную ценность в исследованиях, посвященных выявлению молекулярных механизмов действия металл содержащих соединений на геном.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые в работе изучено влияние флуктуаций внешней среды на адсорбцию лигандов на макромолекуле на примере комплексов ДНК-*cis*-ДДП и рассчитано среднее число связанных с ДНК молекул *cis*-ДДП и его дисперсия.
2. Показано, что конкретный тип связывания *cis*-ДДП с ДНК зависит от концентрации лиганда. Поведение параметров плавления комплексов *cis*-ДДП-ДНК выявило, что резкое увеличение температуры и ширины интервала плавления в области сверхнизких концентраций *cis*-ДДП обусловлено изменениями в третичной структуре ДНК, в частности, образованием кольцевых структур.
3. Получено, что при связывании ДНК с *cis*-ДДП имеет место В→А "подобный" конформационный переход. При этом указанный эффект более выражен в случае GC богатых ДНК.
4. Показано, что при комплексообразовании *cis*-ДДП с ДНК протонизация кольцевой молекулы ДНК в AT участках затрудняется и более предпочтительным становится протонизация GC участков. В присутствии *cis*-ДДП меняются значения рК протонизации азотистых оснований. В случае кислых рН значения  $\Delta T(pH)$  сдвигается в сторону более высоких значений рН, при щелочных же – в сторону более низких значений рН. Аналогичным образом меняется также поведение  $T_m(pH)$  и в кислых, и в щелочных средах.
5. Обнаружено, что внутрицепочечные разрывы в молекуле ДНК снижают количество кольцевых структур, вследствие чего скорость уменьшения  $\Delta T$  понижается и минимум на зависимости  $\Delta T(pH)$  немного поднимается вверх и в случае кислых рН сдвигается в сторону более высоких значений рН, при щелочных значениях – в сторону более низких значений рН.
6. Методом ДНК-комет с применением УФ-излучения оценена индукция сшивок под действием *cis*-ДДП в лимфоцитах человека. Полученные результаты согласуются с данными по изучению комплексов *cis*-ДДП с ДНК во внеклеточных системах.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Arakelyan V.B., Haroutunian S.G., Arakelyan H.V., Haroutunian T.S. // Adsorption of ligands on macromolecules in the fluctuating medium. J. Biomol. Struct. & Dyn., 2002, v. 20, N 1, p. 1-5.
2. Haroutunian T.S., Sarkisyan Sh.S., Antonyan A.P., Haroutunian S.G., Dalyan Y.B., Vardevanyan P.O. // Melting of complexes of DNA-*cis*-DDP in acidic Media. J. Biomol. Struct. & Dyn. 13<sup>th</sup> Conversation, Albany, USA, 2003, v. 20, N 6, p. 886.
3. Dalyan Y.B., Haroutunian T.S., Haroutunian S.G., Vardevanyan P.O. // Melting of complexes of DNA-*cis*-DDP in acidic environment. Experimental and Molecular Medicine, 2003, v. 35, N 6, pp. 534-537.
4. Hovhannisyan G.G., Haroutunian T.S., Artyunyan R.M. // Evaluation of *cis*-platin-DNA crosslink's formation with UV-C Application by the Alkaline Comet- Assay. Exp. Oncol., 2004, v. 26, N 3, p. 240-242.
5. Arakelyan V.B., Abgaryan H.H., Arakelyan H.V., Haroutunian T.S. // Influence of the multiplicative noise on ligand adsorption on macromolecules. In Abstracts Intern. Conf. on "Hydration and Thermodynamics of Molecular Recognition", Tsakhadzor, 2005, March 1-5, p. 40.
6. Haroutunian T.S., Vardevanyan P.O. // Melting of complexes of DNA-*cis*-DDP in acidic environment. In Abstracts Intern. Conf. on "Hydration and Thermodynamics of Molecular Recognition", Tsakhadzor, 2005, March 1-5, p. 51.
7. Haroutunian T.S., Vardevanyan P.O. // The stability of DNA structure of complexformation with *cis*- and *trans*- DDP. J. Biomol. Struct. & Dyn. 14<sup>th</sup> Conversation, Albany, USA, 2005, v. 22, N 6, p. 862.
8. Арутюнян Т.С. // Изменения третичной структуры ДНК при взаимодействии с цисплатиной. Ученые записки ЕГУ, 2006, N 1, с. 150-151.

ԴՆԹ-cis-ԴԴՊ կոմպլեքսների ուսումնասիրությունները

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ ԴՆԹ, cis-ԴԴՊ (cis-դիամիդիլքլորալատին), հալման ջերմաստիճան, հալման միջակայք, գիսաստղերի մեթոդ:

ԴՆԹ-cis-ԴԴՊ կոմպլեքսների օրինակով մշակված է մակրոնուկեոլների հետ լիզանոլների ադոբոքցիայի վրա արտաքին միջավայրի ֆուկտուացիաների ներգործության մոդել: Առաջարկված մոդելի շրջանակներում հաշվարկվել են cis-ԴԴՊ-ի կապված մոլեկուլների միջին թիվը և դրանց դիսպերսիան: Մշակված մոդելի միջոցով ցույց է տրվել, որ ԴՆԹ-ի հետ cis-ԴԴՊ-ի կոնկրետ տիպի փոխազդեցությունը կախված է պլատինային միացության կոնցենտրացիայից: Հարկ է նշել, որ նշված մոդելի շրջանակներում համեմատաբար մեծ ճշգրտությամբ տվյալներ կարելի է ստանալ փոքր հազեցումների դեպքում, այսինքն cis-ԴԴՊ-ի գերցածր կոնցենտրացիաների համար:

ԴՆԹ-cis-ԴԴՊ կոմպլեքսների փորձարարականորեն ստացված հալման բնութագրերի վարքը ի հայտ է բերել, որ հալման ջերմաստիճանը և հալման միջակայքը կտրուկ աճում են լիզանոլի գերցածր կոնցենտրացիոն տիրույթում, որը պայմանավորված է ԴՆԹ-ի 3-ային կառուցվածքում տեղի ունեցող փոփոխություններով, մասնավորապես օղակաձև կառուցվածքների առաջացումով: Այդ են վկայում նաև միջավայրի pH-ի էքստրեմալ արժեքների դեպքում ստացված տվյալները, որոնք բացահայտում են, որ cis-ԴԴՊ - ԴՆԹ կոմպլեքսառաջացման արդյունքում ԴՆԹ-ի օղակաձև մոլեկուլի պրոտոնացումը կամ դեպրոտոնացումը AT հատվածներում դժվարանում է և ավելի մախրնտրելի է դառնում GC հատվածների պրոտոնացումը: Այսինքն cis-ԴԴՊ-ի ներկայությամբ փոխվում են ազոտական հիմքերի պրոտոնացման (իոնիզացման) pK-երի արժեքները:

Առաջին անգամ ՈւՄ-ճառագայթման կիրառմամբ ԴՆԹ-ի գիսաստղերի մեթոդով գնահատվել է նաև cis-ԴԴՊ-ի ազդեցությամբ ԴՆԹ-ում առաջացած կարերի քանակը, ընդ որում *in vitro* ստացված տվյալները լավ կորելացվում են *in vivo* տվյալների հետ: Պարզվել է, որ ԴՆԹ-ում առաջացած վնասված տեղամասերի պատճառով cis-ԴԴՊ-ի ֆարմակոլոգիական կոնցենտրացիաների դեպքում ԴՆԹ-ի միզրացիայի մակարդակը մեծանում է:

Ընդհանրացնելով վերը նշվածը, կարելի է փաստել, որ մշակված տեսական մոդելը և փորձարարականորեն ստացված տվյալները կարող են հիմք հանդիսանալ ԴՆԹ-ի հետ փոխազդող կենսաբանական ակտիվ միացությունների սկրինինգի համար:

AUG 28 21