

ПЛАВЛЕНИЕ ДНК ОПУХОЛЕНОСЯЩИХ КРЫС, ЛЕЧЕННЫХ *мезо*-ТЕТРА(4-N-ГИДРОКСИЭТИЛПИРИДИЛ)ПОРФИРИНОМ И ЕГО Ag-, Zn-, Co-ПРОИЗВОДНЫМИ

© 2017 г. Н.Г. Карапетян, Г.В. Ананян, Е.Б. Далян, С.Г. Арутюнян

*Физический факультет Ереванского государственного университета,
0025, Ереван, ул. Ал. Манукяна, 1, Армения*

E-mail: nelkarapetyan@gmail.com

Поступила в редакцию 07.10.16 г.

После доработки 04.11.16 г.

Проведены сравнительные исследования вторичной структуры ДНК, выделенной из ткани печени здоровых крыс и из опухолевых тканей больных крыс, как леченых, так и нелеченых порфиринами. В качестве потенциальных противоопухолевых препаратов исследованы *мезо*-тетра(4-N-гидроксиэтилпиридил)порфирин и его Ag-, Zn-, Co-производные (H₂ТОЕРуР₄, Ag-ТОЕРуР₄, ZnТОЕРуР₄, СоТОЕРуР₄). Был использован метод, позволяющий выявить конформационное состояние ДНК путем исследования влияния ионов переходных металлов, в частности Mn²⁺, на внутримолекулярное плавление. Плавление ДНК проводили в присутствии ионов Mn²⁺ в различных стехиометрических концентрациях. Вычисляли основные параметры плавления – температуру и интервал плавления (T_m и ΔT). Параметры плавления ДНК, выделенной из опухолевой ткани, отличались от нормы. Крысы, получившие лечение порфиринами, имели параметры плавления ДНК, приближающиеся к норме. Полученные результаты показали, что AgТОЕРуР₄ и ZnТОЕРуР₄ имеют лучший противоопухолевый эффект, чем H₂ТОЕРуР₄ и СоТОЕРуР₄.

Ключевые слова: опухолевая ДНК, плавление ДНК, порфирин.

Известно, что вторичные структуры ДНК из нормальных и опухолевых клеток животных отличаются друг от друга по некоторым физико-химическим параметрам [1–4]. В образцах ДНК, выделенных из опухолевых клеток, как правило, обнаруживаются дефекты во вторичной структуре [2,3]. Согласно современным представлениям причинами возникновения дефектов могут быть негистоновые белки, прочно связанные с АТ-последовательностями опухолевой ДНК, а также изменение уровня метилирования ДНК в процессе опухолевого роста [1,3]. Указанные структурные изменения могут влиять на характер взаимодействия низкомолекулярного лиганда, в частности, иона Mn²⁺ с ДНК, что позволяет достоверно фиксировать структурные отличия ДНК, выделенной из нормальных и опухолевых клеток.

Известно, что на нуклеотидах имеются три типа центров связывания для ионов щелочных, щелочноземельных, а также переходных металлов. Это азотистые основания, фосфатные группы и рибоза или дезоксирибоза. Рибоза и дезоксирибоза считаются слабыми лигандами и поэтому не представляют интереса как потенциальные центры связывания. Фосфатные груп-

пы являются сильными лигандами по отношению к ионам металлов вследствие наличия в них атомов кислорода, несущих значительный отрицательный заряд. Азотистые основания также являются сильными лигандами для ионов переходных металлов.

Если на фосфатных группах имеется только одно место связывания, характеризующееся высокой плотностью отрицательного заряда, то на основаниях предпочтительными для связывания с ионами металлов являются также места с избыточной плотностью заряда, т.е. места, обладающие большей основностью.

Большую роль в процессе комплексообразования ДНК с ионами металлов играет не основность места связывания, а стерические факторы конкретного места. Так, например, двухвалентные ионы переходных металлов образуют наиболее устойчивые комплексы с N(7)-положениями пуриновых нуклеотидов (особенно гуанина) [6–8].

Ионы переходных металлов, благодаря своей незавершенной *3d*-электронной конфигурации, могут образовывать с атомами донора ковалентные координационные связи. Кристал-

лографические данные, полученные для ионов Mn^{2+} , выявили хелатообразное связывание ионов с N(7) гуанина, O(2) цитозина и кислородом фосфатной группы [6].

В литературе обсуждается также вопрос о возможности связывания ионов металлов с аминогруппами оснований [6]. Однако показано, что они являются плохими лигандами по той причине, что неподеленная пара π -электронов делокализована и поэтому неспособна к связыванию с ионом металла. Однако после депротонирования они могут участвовать в связывании металла с нуклеотидом. Следовательно, активность места связывания на нуклеотиде зависит от внешних условий, в частности, от pH среды, концентрации ионов, температуры и т.д.

Все предложенные в отмеченных работах механизмы связывания ионов переходных металлов (в частности, ионов Mn^{2+}) предполагают избирательное связывание последних с определенными нуклеотидными парами. В зависимости от того, с каким именно местом на нуклеотиде связывается ион металла, структура и, соответственно, физические свойства полученных комплексов будут сильно отличаться. Большую информацию о структуре и свойствах ДНК – металл комплексов можно получить методом исследования термической денатурации этих комплексов [9–11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты *in vivo* проводили на крысах линии Wistar (масса 120–140 г, возраст шесть–восемь недель). Для индукции опухоли применяли канцероген 7,12-диметилбенз(а)антрацен (DMBA, Cat # D3254, Sigma, США), относящийся к группе полициклических ароматических углеводородов. Исследуемые препараты $CoTOEPyP4$ и $ZnTOEPyP4$ вводили крысам в дозе 15 мг/кг, $H_2TOEPyP4$ и $AgTOEPyP4$ – в дозе 10 мг/кг, что соответствует $1/2LD_{50}$. Соединения вводили в течение 150 суток, начиная с седьмых суток после аппликации DMBA.

Порфирины (рис. 1) были синтезированы на кафедре фармакологической химии Ереванского государственного медицинского университета по описанной методике [12].

ДНК из печени и опухолевой ткани крыс выделяли стандартным хлороформным методом [13]. После очистки определяли оптические характеристики ДНК по соотношениям $A_{260}/A_{280} = 1,8$, $A_{260}/A_{230} = 2,0$, которые соответствовали значениям оптических характеристик для высокоочищенной ДНК [14].

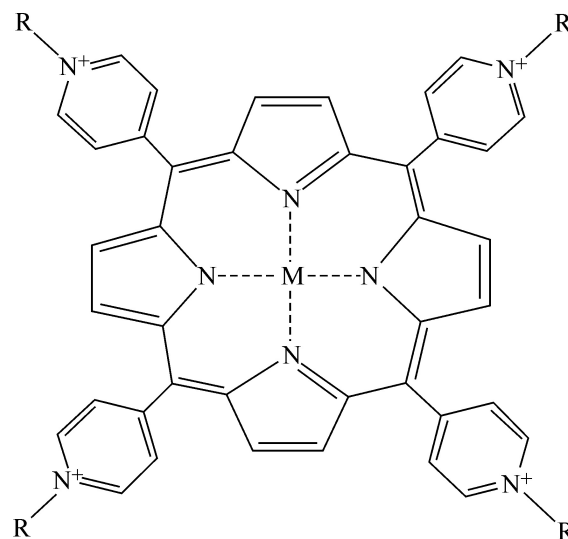


Рис. 1. Структурная схема порфиринов: $M = H_2, Ag, Zn, Co$; $R = -CH_2 - CH_2 - OH$.

Спектры поглощения и спектрофотометрические кривые плавления ДНК регистрировали на спектрофотометре Lambda 800 UV/VIS (Perkin-Elmer, США). Использовали десяти миллиметровые термостатируемые кварцевые кюветы с плотно притертыми тефлоновыми пробками. Нагрев осуществляли со скоростью $0,25^\circ C/мин$. Измерения проводили в водно-солевых растворах 0,1 SSC (1 SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M цитрат натрия), pH 7,5 в интервале температур $35-95^\circ C$, при длине волны 260 нм. Эксперименты по плавлению проводились при молярных соотношениях ионов Mn^{2+} к нуклеотидам ($[Mn^{2+}]/[ДНК]$), равных 1–4.

Значение $1 - \theta$ рассчитано по формуле $1 - \theta = \frac{A - A_{min}}{A_{max} - A_{min}}$, где θ – степень спиральности, A – оптическая плотность раствора ДНК, A_{max} и A_{min} – ее значения, отвечающие полностью клубкообразному и полностью спиральному состояниям ДНК. Кривые плавления удобно характеризовать двумя параметрами – температурой плавления (T_m), отвечающей точке перегиба кривой, и шириной интервала плавления (ΔT), равной разности температур, при которой касательная в точке перегиба пересекает уровни $\theta = 0$ и $\theta = 1$, т.е. $\Delta T = \left(\frac{\partial \theta}{\partial T} \right)_{T=T_m}^{-1}$. Эти параметры дают сведения о термостабильности и наличии дефектов во вторичной структуре ДНК [15].

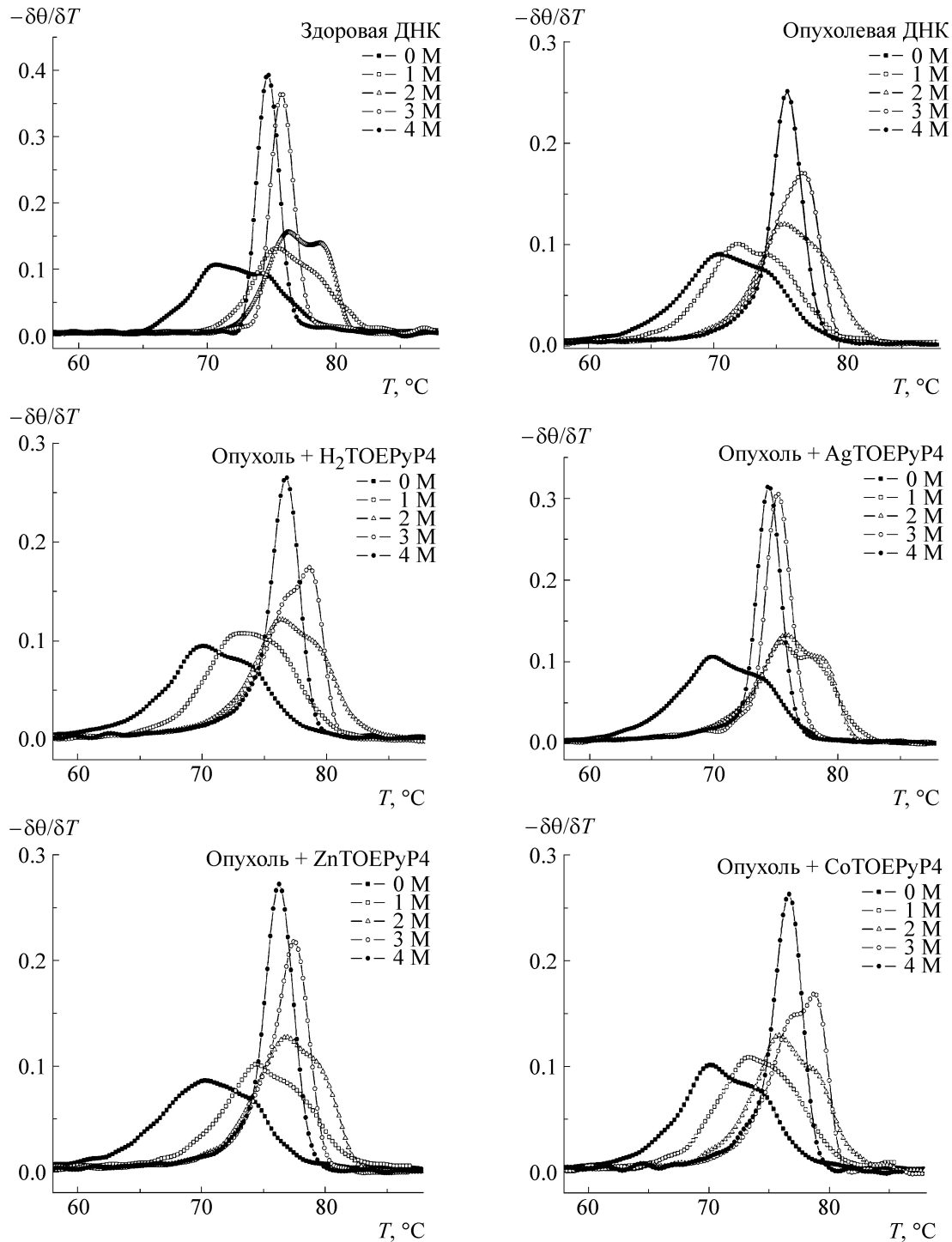


Рис. 2. Дифференциальные кривые плавления ДНК из печени здоровых, опухолевой ткани больных и леченых порфиринами крыс. Плавление ДНК проводили в присутствии ионов Mn^{2+} в различных стехиометрических концентрациях (0–4 М Mn^{2+} на один фосфат, т.е. на один нуклеотид).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наряду с ныне используемыми в клинике противоопухолевыми препаратами активно синтезируются и исследуются все новые и новые

соединения на основе порфиринов. Эти соединения должны удовлетворять определенным требованиям: иметь высокую селективность к раковым клеткам и слабо задерживаться в нормальных тканях, обладать низкой токсичностью

Температура (T_m) и интервал плавления (ΔT) ДНК из печени здоровых, опухолевой ткани больных и леченых порфиринами крыс при различных концентрациях ионов Mn^{2+}

Источник ДНК	$[Mn^{2+}]/[ДНК]^*$	$T_m, ^\circ C$	$\Delta T, ^\circ C$
Норма, печень	0	71,85	7,1
	1	75,83	6,5
	2	76,76	5,35
	3	75,66	2,4
	4	74,64	1,7
Опухоль	0	68,9	9,5
	1	72,45	8,2
	2	75,65	7,5
	3	75,74	6,5
	4	75,39	5,3
Опухоль + $H_2TOEPyP_4$	0	70,5	8,7
	1	73,71	7,5
	2	76,54	6,84
	3	76,82	5,66
	4	76,23	4,44
Опухоль + $AgTOEPyP_4$	0	70,9	7,4
	1	75,75	7,15
	2	75,8	6,2
	3	74,9	3,77
	4	74,2	3,1
Опухоль + $ZnTOEPyP_4$	0	71,4	8,1
	1	74,6	7,2
	2	76,7	6,3
	3	76,6	4,6
	4	75,9	3,5
Опухоль + $CoTOEPyP_4$	0	70,7	8,4
	1	73,9	7,5
	2	76,1	6,5
	3	76,9	5,6
	4	76,1	4,4

Примечание. * – Молярное соотношение концентрации ионов Mn^{2+} к концентрации ДНК. Концентрация ДНК приводится в молях нуклеотидов.

и легко выводиться из организма, быть устойчивыми при хранении и введении в организм, обладать флуоресценцией. Фотосенсибилизация порфиринов может приводить как к некрозу, так и к апоптозу опухолевых клеток [16,17].

В качестве нативных препаратов ДНК были использованы ДНК из печени здоровых крыс, опухолевых клеток больных и леченых порфиринами крыс. По спектрофотометрическим кривым плавления ДНК в присутствии ионов Mn^{2+} судили о структурных отличиях ДНК, выделенных из нормальных и опухолевых клеток.

Исследование плавления ДНК в присутствии ионов Mn^{2+} в различных стехиометрических концентрациях позволяет судить о структурных изменениях в молекуле ДНК. На рис. 2 приводятся дифференциальные кривые плавления исследуемых ДНК. В зависимости от кон-

центрации иона металла происходит значительное изменение формы кривой плавления.

По полученным кривым рассчитали параметры плавления ДНК, которые суммированы в таблице.

Из полученных данных следует, что параметры плавления ДНК из нормальной и опухолевой тканей в присутствии ионов Mn^{2+} изменяются по-разному. В здоровых клетках при молярном соотношении $[Mn^{2+}]/[ДНК]$, равно единице, ионы металлов экранируют отрицательно заряженные фосфатные группы нуклеиновых кислот. В результате наблюдается увеличение значения T_m ($T_m = 75,83$ вместо $T_m = 71,85$ в норме, см. таблицу). При увеличении концентрации Mn^{2+} до значения молярного соотношения $[Mn^{2+}]/[ДНК]$, равного двум, наблюдалось повышение T_m во всех образцах ДНК. При дальнейшем повышении концентрации ионов

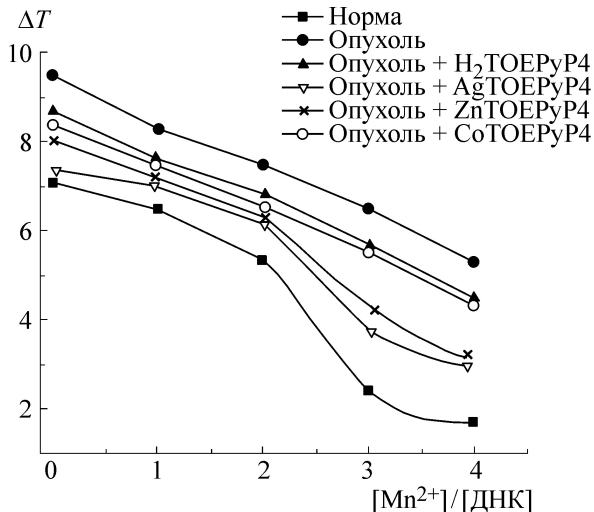


Рис. 3. Зависимости интервала плавления (ΔT) от концентрации ионов Mn^{2+} в образцах ДНК, выделенных из печени здоровых, опухолевой ткани больных и леченых порфиринами крыс.

металла величина T_m ДНК в норме уменьшалась.

В образцах ДНК здоровых животных ион Mn^{2+} связывается с местами избыточной плотности зарядов на гуаниновых основаниях, приводя к избирательной дестабилизации ГЦ-пар. Это приводит к выравниванию термостабильностей АТ- и ГЦ-пар и, следовательно, к сужению интервала плавления ΔT . Однако при молярном соотношении $[Mn^{2+}]/[ДНК]$, равном единице, интервал плавления сужается резко, а при более высоких концентрациях Mn^{2+} сужение замедляется.

Так как во вторичной структуре опухолевой ДНК имеются дефекты, обусловленные различными факторами, то доступ ионов металла к дефектным участкам осложняется, что приводит к меньшему сужению интервала плавления опухолевой ДНК по сравнению с нормальной.

На рис. 3 приведены графики зависимости интервала плавления ΔT от молярного соотношения $[Mn^{2+}]/[ДНК]$.

Так, по сравнению с ДНК здоровых животных, где параметр ΔT при молярном соотношении $[Mn^{2+}]/[ДНК]$, равном четырем, уменьшается в 4,17 раз, в опухолевой ДНК ΔT уменьшается в 1,79 раз. Согласно литературным данным, это свидетельствует о наличии дефектов в структуре опухолевой ДНК. Значение ΔT , полученное при плавлении ДНК из опухоли

больных животных, леченых порфиринами $H_2TOEPyP_4$, $AgTOEPyP_4$, $ZnTOEPyP_4$ и $CoTOEPyP_4$, уменьшается в 1,95, 2,38, 2,31 и 1,9 раз соответственно. Как видно из полученных данных, лечение крыс порфиринами приводит к приближению значения параметра ΔT к норме. Полученные результаты выявили, что порфирины $AgTOEPyP_4$ и $ZnTOEPyP_4$ в большей степени приближают параметры плавления опухолевой ДНК к норме, нежели $H_2TOEPyP_4$ и $CoTOEPyP_4$.

Таким образом, можно заключить, что порфирины $AgTOEPyP_4$ и $ZnTOEPyP_4$ обладают некоторыми терапевтическими свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. М. Асланян, Ю. С. Бабаян, С. Г. Арутюнян и др., *Вопр. онкологии* **1**, 48 (1989).
2. Г. П. Жижина, С. И. Бобович, К. А. Авакян и О. Е. Петров, *Докл. АН СССР* **235** (3), 703 (1977).
3. Г. П. Жижина, С. И. Скалацкая, Е. Ф. Бунина и др., *Докл. АН СССР* **265**(5), 1268 (1982).
4. Ю. С. Бабаян, П. О. Вардеванян, Д. В. Гарибян и др., *Биофизика* **2**, 313 (1984).
5. M. Daune, *Studia Biophysica* **24-25**, 287 (1970).
6. Ц. Зигель, *Ионы металлов в биологических системах* (Мир, М., 1982).
7. W. Saenger, *Principles of nucleic acids structure* (Springer-Verlag, New-York, 1984).
8. М. Н. Shamsi and Н. J. Kraatz, *Inorg. Organomet. Polym.* **23**, 4 (2013).
9. Ю. П. Благой, В. А. Сорокин, В. А. Валеев и др., *Молекуляр. биология* **11**, 748 (1977).
10. E. Dore, C. Frontali, and E. Gratton, *Biopolymers* **11** (10), 2033 (1972).
11. G. L. Eichorn and Y. A. Shin, *J. Amer. Chem. Soc.* **90** (26), 7323 (1968).
12. R. K. Ghazaryan, L. A. Sahakyan, and A. G. Tovmasyan, *Patent of the Republic of Armenia*, No 1715A 2, (2006).
13. Н. Г. Карапетян, Г. В. Ананян, Л. В. Торосян и Е. Б. Далян, *Вестн. СПбГУ* **4**, 53 (2007).
14. J. Sambrook, in *Molecular cloning: A laboratory manual*, Ed by E. F. Fritsch and T. Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2012), pp. 91–930.
15. Y. L. Lyubchenko, M. D. Frank-Kamenetskii, et al., *Biopolymers* **15**, 1019 (1976).
16. N. L. Oleinick and H. E. Evans, *Radiat. Res.* **150**, 146 (1998).
17. D. Kessel and Y. Luo, *J. Porphyrins and Phthalocyanines* **5**, 181 (2001).

The Melting of DNA from Tumor Diseased Rats Treated by *meso*-Tetra(4-N-hydroxyethylpyridyl)porphyrin and Its Ag-, Zn-, Co-derivatives

N.H. Karapetyan, G.V. Ananyan, E.B. Dalyan, and S.G. Haroutiunian

Faculty of Physics, Yerevan State University, ul. Al. Manoogiana 1, Yerevan, 0025 Armenia

The comparative investigations of the secondary structure of DNA isolated from the liver of normal rats, from the tumor tissue of treated and not treated by porphyrins rats were carried out. The *meso*-tetra(4-N-hydroxyethylpyridyl)porphyrin and its Ag-, Zn-, Co-derivatives ($H_2TOEPyP_4$, Ag-TOEPyP₄, ZnTOEPyP₄, CoTOEPyP₄) have been investigated as potential anticancer drugs. In the present work we used a method that allows revealing the conformational state of DNA by investigating the influence of transition metal ions, such as Mn^{2+} on the intramolecular melting. The DNA melting was conducted in the presence of different stoichiometric concentrations of Mn^{2+} ions. The main melting parameters – the melting temperature and the melting range (T_m and ΔT) was calculated. The melting parameters of the DNA isolated from the tumor tissue differed from the normal DNA. The melting parameters of the DNA isolated from the rats treated by porphyrins were approaching to normal. The obtained results revealed that AgTOEPyP₄ and ZnTOEPyP₄ porphyrins have a better antitumor effect, than $H_2TOEPyP_4$ and CoTOEPyP₄.

Key words: tumor DNA, DNA melting, porphyrin