

КИНЕТИКА ИЗМЕНЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК ПРИ СВЯЗЫВАНИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ЦИСПЛАТИН

Е.Н. Галюк¹, Д.Ю. Ландо¹, В.П. Егорова¹, С.Г. Арутюнян²,
В.И. Варданян²

¹ *Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

² *Ереванский государственный университет, Ереван, Армения*

Цис-диамминдихлорплатина(II) (цисплатин) обладает сильной противоопухолевой активностью, которая осуществляется при его ковалентном бифункциональном связывании с клеточной ДНК и выражается в ингибировании ее репликации. При взаимодействии ДНК с цисплатином наблюдаются существенные изменения в ее структуре, которые проявляются в дестабилизации двойной спирали ДНК, т.е. снижении ее температуры плавления. В целом стабильность двойной спирали ДНК, как нативной, так и химически модифицированной препаратом цисплатин, зависит от ионной силы раствора, значения pH и присутствующих в растворе ионов. Ранее нами было показано, что в щелочной среде резко усиливается дестабилизирующее влияние препарата цисплатин, т.е. абсолютная величина разности температур плавления химически модифицированной и нативной ДНК резко возрастает. Последнее позволяет значительно увеличить чувствительность метода плавления ДНК при исследовании платиновых противоопухолевых соединений. Целью данной работы является исследование кинетики изменения стабильности ДНК при взаимодействии с цисплатином, используя разработанный ранее подход.

Материалы и методы. В работе использовали особо чистую ДНК тимуса теленка, выделенную по разработанной нами методике (содержание белка менее 0,2%, молекулярная масса около $3 \cdot 10^7$ Да). Платинирование ДНК проводили путем инкубирования с цисплатином в темноте в течение 48 часов при 37°C в 0,01М растворе NaClO_4 . Концентрация ДНК в реакционной среде 1,2 мг/мл. Количество атомов платины, приходящихся на один нуклеотид, составляло 0,05 ($\eta_b=0,05$). Реакцию платинирования останавливали добавлением ионов хлора (NaCl) до концентрации, равной 0,1М, с последующим замораживанием реакционной смеси. В качестве контроля использовали ДНК, инкубированную в тех же условиях без добавления цисплатина. Изучение стабильности двойной спирали платинированной и контрольной ДНК проводили методом термической денатурации на спектрофотометре СФ-26 в специальной термостатированной камере. Исследования проводили в нейтральной ($\text{pH}=7$) и щелочной ($\text{pH}=10,8$) средах в присутствии 0,1М NaCl и $5 \cdot 10^{-3}$ М ЭДТА (для связывания примесных ионов двухвалентных металлов).

Результаты и обсуждение. Исследование кинетики платинирования ДНК в нейтральной и щелочной среде ($\text{pH}=7,2$ и $\text{pH}=10,8$) показало, что с первых минут платинирования наблюдается снижение температуры плавления платинированной ДНК (рисунок). Скорость этого снижения максимальна в первые минуты инкубации. Существенное изменение стабильности продолжается в течение шести часов, а затем прекращается. Максимальная дестабилизация платинированной ДНК в нейтральной среде составляла $4,9^\circ\text{C}$, а в щелочной – $17,9^\circ\text{C}$.

На полулогарифмической зависимости изменения температуры плавления от времени четко видны две ярко выраженные стадии дестабилизации ДНК, которые проявляются независимо от кислотности среды при плавлении.

Известно, что при инкубации весь препарат цисплатин связывается с ДНК в течение 10 минут. Наблюдаемую динамику изменения температуры

плавления платинированной ДНК в ходе реакции можно объяснить увеличением концентрации цисплатина, связанного с ДНК, и образованием в первые минуты реакции монофункциональных аддуктов. Дальнейшее снижение температуры плавления может быть обусловлено перегруппировками соединений платины на двойной спирали и образованием бифункциональных аддуктов, вызывающих более сильную дестабилизацию.

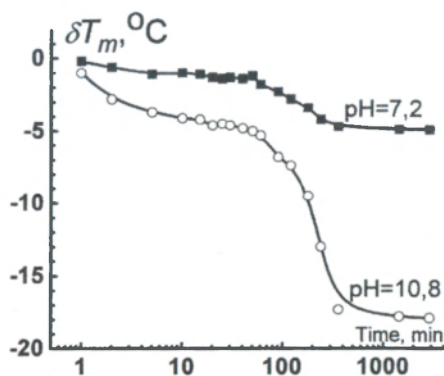


Рис. Динамика дестабилизирующего действия противоопухолевого препарата цисплатин ($r_b=0,05$) в ходе реакции платинирования ДНК. Условия плавления: pH=7,2 (черные символы) и pH=10,8 (белые символы).

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (грант X06P-102) и фондом МНТЦ (грант А301.2).