

УДК 537.323.2

**ФОРМИРОВАНИЕ АГРЕГАТОВ ПРОИЗВОДНОГО АКТИНОЦИНА,
СОДЕРЖАЩЕГО В АМИДНЫХ ГРУППАХ РАДИКАЛЫ 4'-БЕНЗО-15-КРАУН-5,
И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МОЛЕКУЛОЙ ДНК**© 2011 **Е.Б. Морошкина^{1*}, О.Б. Седова², Т.А. Урусова¹**¹Санкт-Петербургский государственный университет²Костромской государственный университет им. Н.А. Некрасова

Статья поступила 11 мая 2011 г.

Методами спектрофотометрии, спектрополяриметрии и вискозиметрии исследованы механизмы самоорганизации в растворе краун-содержащего производного актиноцина (I), обладающего противоопухолевой активностью, а также взаимодействие образующихся агрегатов с молекулой ДНК. Наличие радикала 4'-бензо-15-краун-5 в структуре исследованного соединения определяет наблюдаемые различия в механизме его комплексообразования в присутствии ионов Na^+ и K^+ . Процесс агрегации в присутствии ионов K^+ сопровождается смещением длинноволновой полосы спектра поглощения в коротковолновую (образование агрегатов Н-типа) или в длинноволновую (образование агрегатов J-типа) области в зависимости от концентрации ионов K^+ в растворе. В присутствии ионов Na^+ независимо от их концентрации в растворе формируются агрегаты J-типа. Предложена схема формирования комплексов и их взаимных превращений при изменении ионного состава среды. Исследование взаимодействия данного соединения с ДНК показало, что в присутствии ионов K^+ оно связывается с молекулой ДНК в виде мономеров и/или димеров, не образуя крупных надмолекулярных агрегатов. Н- и J-структуры, сформированные в K^+ -содержащих растворах соединения I, при взаимодействии с ДНК разрушаются. Если раствор соединения I добавлять в раствор ДНК, содержащий ионы Na^+ , агрегаты J-формы образуются непосредственно на поверхности молекулы ДНК. В то же время J-структуры, первоначально сформированные в Na^+ -содержащем растворе соединения I, практически не взаимодействуют с ДНК. Исследование данной системы показывает, что введение краун-группировки в молекулу соединения, имеющего гетероциклический хромофор, дает возможность с помощью ионного состава среды влиять на его средство и способ связывания с молекулой ДНК.

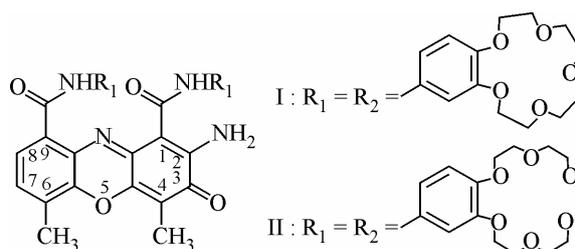
Ключевые слова: ДНК, бензо-краун-содержащие производные феноксазона, спектрофотометрия, круговой дихроизм, вискозиметрия, интеркаляция, Н-агрегаты, J-агрегаты.

ВВЕДЕНИЕ

Молекула ДНК является мишенью действия многих агентов, обладающих противоопухолевой активностью. Среди них — антибиотик актиномицин D, содержащий в положениях 1 и 9 актиноцинового хромофора пентапептидлактонные группировки. В процессе направленного поиска новых активных противоопухолевых препаратов на кафедре органической химии Санкт-Петербургского государственного технологического института (СПбГТИ) были синтезированы многочисленные аналоги этого антибиотика, содержащие вместо пентапептидлактонных группировок радикалы различной природы [1]. Спектральными, гидродинамически-

* E-mail: evmorosh@mail.ru

Рис. 1. Структурная формула производных актиноцина



ми и оптическими методами было показано, что способность актиноцинового хромофора интеркалировать в двойную спираль ДНК зависит от ионного состояния лиганда [2] и от положения катионоидного центра [3]. Заместители, способные специфическим образом взаимодействовать с ДНК в составе молекулы лиганда, могут препятствовать интеркаляции хромофора в двойную спираль ДНК [4]. Было установлено, что пептидлактонные группировки актиномицина D способны, подобно краун-эфирам, связывать катионы Na^+ [5]. Это явилось предпосылкой создания новой группы производных актиноцина, содержащих в амидных группах различные краун-группировки.

Наличие краун-группировок в составе молекулы сообщает ей новые свойства, поскольку краун-эфиры являются эффективными комплексообразующими агентами катионов щелочных металлов. В зависимости от размера катиона могут образовываться комплексы различной стехиометрии [6, 7]. Синтез соединений, содержащих помимо группы, взаимодействующей с двойной спиралью ДНК, краун-группировки, селективные к различным катионам, является перспективным направлением создания новых биологически активных препаратов, специфичных к ионным условиям среды [8—10]. Были синтезированы краун-содержащие производные различных интеркалирующих в двойную спираль ДНК соединений: феназина [11], метидиума и псоралена [12], акридина [13].

В СПбГТИ был синтезирован ряд производных актиноцина, содержащих краун-фрагменты, способные ассоциировать ионы Na^+ и K^+ , бензо(15-краун-5) и бензо(18-краун-6) [14, 15]. Исследование взаимодействия этих соединений с ДНК спектральными, оптическими и гидродинамическими методами [16] показало, что благодаря наличию двух краун-группировок молекула может принимать различные конформации в зависимости от длины спейсера, соединяющего краун-группировки с хромофором, или от количества ионов щелочного металла. Конформация молекулы определяет способ ее связывания с двойной спиралью ДНК. Расположение бензо-краун-группировок непосредственно в амидных группах (рис. 1) ограничивает их подвижность и возможность образования внутримолекулярных комплексов типа "сэндвич", способствуя образованию димеров за счет межмолекулярного взаимодействия краун-группировок.

Соединение I (см. рис. 1) обладает наибольшей в этом ряду противоопухолевой активностью [17]. В то же время это соединение проявляет уникальные спектральные свойства, свидетельствующие об образовании упорядоченных агрегационных структур в водных растворах, содержащих ионы K^+ и Na^+ .

В настоящей работе методами спектрофотометрии (СФ) и кругового дихроизма (КД) исследовано образование упорядоченных агрегатов соединения I в растворах с различной концентрацией ионов Na^+ или K^+ . Методами вискозиметрии, спектрофотометрического титрования (СФТ) и спектрополяриметрического титрования (СПТ) изучено взаимодействие этих агрегатов с молекулой ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Соединения I и II были синтезированы на кафедре органической химии СПбГТИ [15]. Соединения растворяли в этиловом спирте, насыщенном NaCl или KCl , и затем разбавляли водно-солевым раствором фиксированной ионной силы μ до нужной концентрации. Коэффициент экстинкции обоих соединений в этиловом спирте $\epsilon_{450} = 25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Концентрация спирта в разбавленных растворах не превышала 2%. Процесс образования агрегатов соединения I в водных растворах контролировали измерением спектров поглощения и КД.

Взаимодействие различных форм соединения I с ДНК исследовали с помощью параллельного СФТ и СПТ двух типов. В первом случае в водные растворы с различной концентрацией

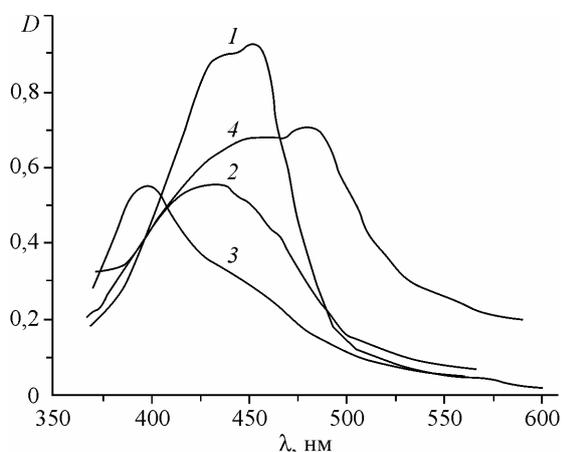
цией ДНК ($V = 10$ мл), содержащие ионы K^+ или Na^+ $\mu = 0,1, 0,01$ или $0,001$, добавляли концентрированный спиртовой раствор соединения I ($V = 0,1$ мл) в мономерной форме. Во втором случае концентрированный спиртовой раствор соединения I предварительно разбавляли водно-солевым раствором KCl или NaCl $\mu = 0,1, 0,01$ или $0,001$. После образования агрегационной формы лиганда полученный раствор смешивали с растворами ДНК, содержащими ионы K^+ или Na^+ , соответствующей ионной силы.

В работе использовали ДНК из тимуса теленка фирмы "Serva" с молекулярной массой $M = 10^7$ Да. Коэффициент экстинкции ДНК $\varepsilon_{259} = 6400\text{—}6700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord UV-Vis". Спектры КД регистрировали с помощью дихрографа "Jobin—Ivon Mark 5". Способ связывания соединений I и II с ДНК определяли на основании анализа изменений специфической вязкости η_{sp} ДНК в зависимости от концентрации соединений, полученных с помощью низкоградиентного магнитного ротационного вискозиметра [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование агрегатов. Форма и положение длинноволновой полосы спектра поглощения спиртового раствора соединения I (рис. 2, кривая 1) аналогичны соответствующим характеристикам спектра других производных актиноцина [19] и отвечают мономерной форме соединения. При переходе к водно-спиртовому растворителю, содержание спирта в котором менее 2 %, форма и положение длинноволновой полосы поглощения изменяются в зависимости от концентрации и природы противоиона в растворе (см. рис. 2). Спектр поглощения соединения I в присутствии ионов K^+ при $\mu = 0,1$ (см. рис. 2, кривая 2) совпадает с полученным ранее в тех же условиях спектром соединения II и соответствует спектру поглощения димеров актиноцина, образованных в результате взаимодействия хромофоров [20]. В этих условиях димерная форма соединения I стабильна во времени. Уменьшение ионной силы раствора до $\mu = 0,02$ вызывает изменение формы спектра и сдвиг его максимума в коротковолновую область (см. рис. 2, кривая 3), что позволяет сделать предположение о формировании в этих условиях агрегатов Н-типа [21]. В агрегатах такого типа центры хромофоров находятся на одной оси, перпендикулярной плоскости молекул, образуя "стопку". Дальнейшее уменьшение ионной силы приводит к дестабилизации Н-формы, которая проявляется в изменении во времени формы спектра поглощения с появлением длинноволновой составляющей (см. рис. 2, кривая 4). Сдвиг спектра поглощения в длинноволновую область может свидетельствовать об образовании агрегатов J-типа [22]. В агрегатах такого типа перпендикуляр к плоскости хромофора и направление роста агрегатов составляют угол, отличный от нуля градусов. В растворах KCl, ионная сила которых находится в интервале $0,01 < \mu < 0,02$, можно наблюдать последовательный переход димерной формы соединения I в Н-форму, а затем в J-форму (рис. 3, а). Последний переход сопровождается появлением КД, сопряженного с длинноволновой



новой полосой поглощения (см. рис. 3, б). Агрегаты Н- и J-типа могут образоваться в результате взаимодействия краун-группировок разных молекул с образованием структур типа "сэндвич". Уменьшение ионной силы ($\mu < 0,01$) уменьшает время перехода Н- в J-форму. Увеличение ионной силы растворов KCl приводит к разрушению как Н-, так и J-формы. В обоих случаях образуется исходная димерная форма. На рис. 4 изобра-

Рис. 2. Спектры поглощения соединения I в различных растворителях: этиловый спирт (1), 0,1 М KCl (2), 0,02 М KCl (3), 0,001 М KCl (4); $C_1 = 7,2 \cdot 10^{-6}$ М

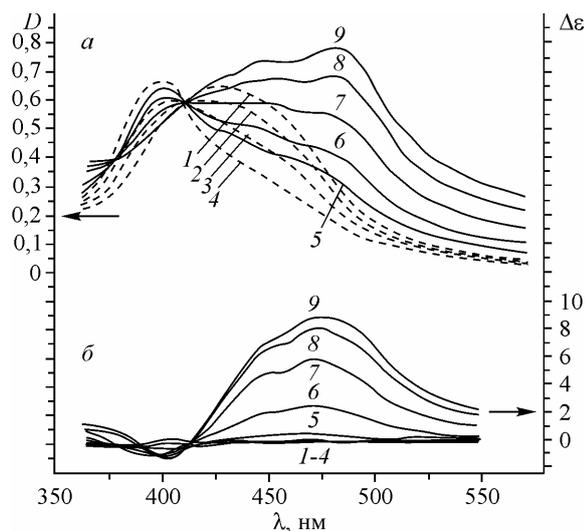


Рис. 3. Изменение во времени спектров поглощения (а) и КД (б) соединения I в 0,0125 М КСl; $C_1 = 10^{-5}$ М, время после приготовления раствора, мин: 0 (1), 2 (2), 5 (3), 12 (4), 24 (5), 26 (6), 29 (7), 35 (8), 40 (9)

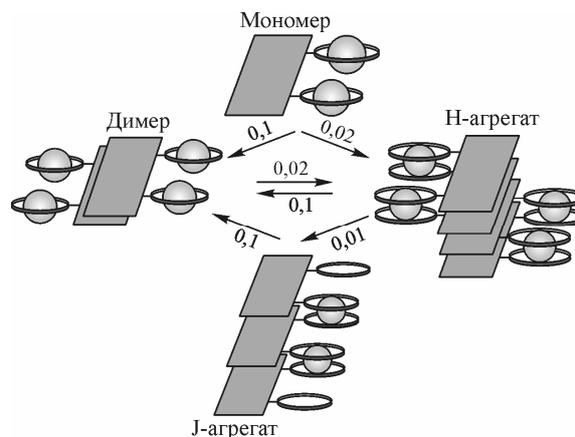


Рис. 4. Структурные переходы соединения I в растворе КСl при изменении μ (цифры у стрелок — значения μ , при которых происходит переход)

жена схема предполагаемых структурных переходов соединения I в растворах КСl при изменении ионной силы раствора.

В растворах NaCl независимо от ионной силы формируются агрегаты J-типа, скорость образования которых зависит только от концентрации соединения I. Интенсивность КД этих агрегатов на порядок ниже наблюдаемой в растворах КСl. Кроме того, J-агрегаты соединения I, сформированные в растворах NaCl, в отличие от J-агрегатов, образовавшихся в растворах КСl, не выпадают со временем в осадок. Можно предположить, что J-агрегаты, сформированные в присутствии ионов K^+ , обладают большими размерами по сравнению с аналогичными агрегатами, сформированными в присутствии ионов Na^+ .

Взаимодействие с ДНК. При разбавлении концентрированных спиртовых растворов соединения I ДНК-содержащими растворами КСl при $\mu = 0,1$, $0,01$ или $0,001$ в процессе СФТ и СПТ первого типа не наблюдается образования агрегационных форм соединения I (рис. 5). Спектры поглощения и КД не меняются во времени. Аналогичные кривые были получены ранее для соединения II, не образующего агрегационных форм в водно-солевых растворах и взаимодействующего с ДНК в виде димеров или мономеров в зависимости от соотношения молярных концентраций лиганда и ДНК ($r = C_l/C_{\text{ДНК}}$) [23]. Такое спектральное поведение соединения I в присутствии ДНК свидетельствует об отсутствии свободного лиганда в растворе во всем исследованном диапазоне r ($0,05 < r < 1,0$) и, следовательно, о большом сродстве соединения I к ДНК в растворах КСl. Кроме того, можно сделать вывод, что соединение I в этих условиях связывается с ДНК аналогично соединению II в виде димеров и мономеров.

Результаты СФТ H-формы соединения I практически совпадали с результатами титрования первого типа. Это означает, что H-форма не только не образуется в присутствии ДНК, но и распадается в случае ее предварительного образования. При титровании J-формы соединения I в $0,001$ М КСl наблюдаются изменения во времени спектров поглощения и КД (рис. 6). Спектры, соответствующие исходной J-форме соединения I, в присутствии ДНК в течение 20—30 мин приобретают вид, соответствующий спектрам связанного лиганда в форме димера или в форме мономера при избытке ДНК в растворе. Это означает, что J-форма соединения I также разрушается в присутствии ДНК, и связывание лиганда с ДНК в этих условиях происходит обычным для производных актиноцина образом.

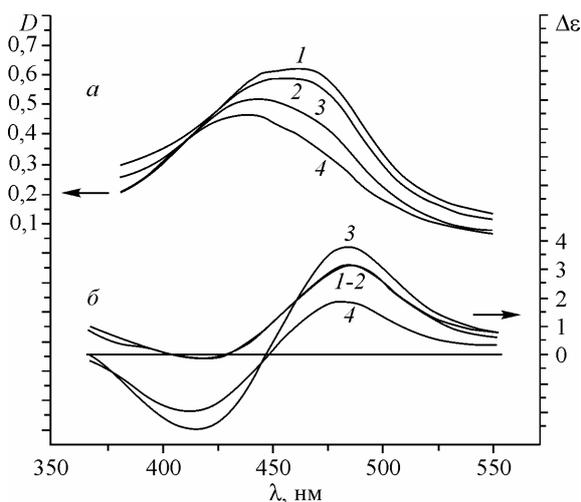


Рис. 5. Спектры поглощения (а) и КД (б) соединения I в 0,001 М КСl (титрование первого типа), $r = 0,05—0,1$ (1, 2), $r = 0,8$ (3), $r = 1,0$ (4), $C_1 = 10^{-5}$ М

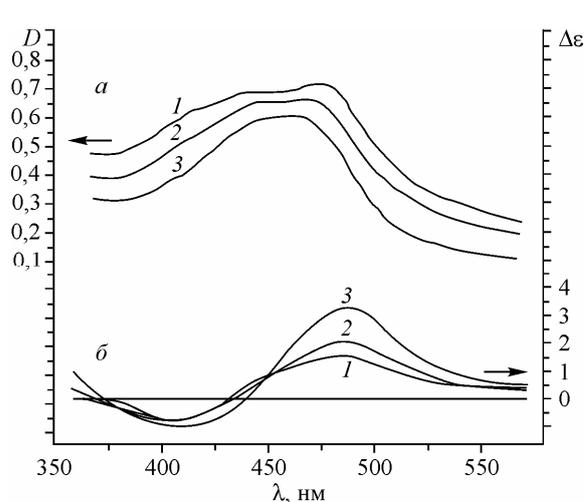


Рис. 6. Изменение во времени спектров поглощения (а) и КД (б) соединения I в 0,001 М КСl при титровании второго типа, $r = 0,05$, $C_1 = 10^{-5}$ М, время с момента приготовления, мин: 0 (1), 12 (2), 30 (3)

Процесс связывания с ДНК соединения I в растворах NaCl происходит совершенно иначе. При титровании первого типа, когда соединение I вводится в растворы, содержащие ДНК, в виде мономеров, наблюдаются изменения спектров поглощения и КД во времени (рис. 7). В этом случае начальные спектры, полученные сразу после смешения растворов ДНК и соединения I, соответствуют обычным для актиноцинов спектрам связанных димеров или мономеров. Затем в течение ~30 мин форма и интенсивность спектров меняется. Появление длинноволновой составляющей в спектре поглощения и интенсивного положительного КД может свидетельствовать об образовании структуры, аналогичной J-агрегату в растворах КСl. Однако выше мы показали, что в растворах NaCl J-агрегаты соединения I имеют КД очень низкой интенсивности. Мы полагаем, что в растворах NaCl J-подобные структуры соединения I образуются непосредственно на молекуле ДНК, в результате чего появляется интенсивный КД.

При добавлении растворов ДНК, содержащих ионы Na^+ , в растворы заранее сформированных в присутствии ионов Na^+ J-агрегатов соединения I изменения в спектрах поглощения практически отсутствуют независимо от концентрации ДНК в растворе. Это означает, что J-агрегаты, первоначально сформированные в присутствии ионов Na^+ , сохраняются и практически не взаимодействуют с молекулой ДНК.

Для определения структуры комплексов ДНК с соединением I было проведено вискозиметрическое титрование раствора ДНК мономерной (спиртовой) формой соединения I. Для сравнения аналогичное титрование было проведено для соединения II, не образующего H- и J-форм в водно-солевых растворах. На рис. 8 изображены зависимости относительного изменения специфической вязкости ДНК в зависимости от концентрации лиганда в растворе. Изменение специфической вязкости комплекса ДНК с соединением I в 0,001 М КСl аналогично соответствующим изменениям, наблюдаемым в случае соединения II. Увеличение η_{sp} ДНК является одним из признаков интеркаляции хромофоров лиганда в двойную спираль ДНК, поскольку может происходить в результате увеличения контурной длины макромолекулы [24]. В 0,001 М NaCl наблюдается некоторое уменьшение η_{sp} ДНК, что свидетельствует об отсутствии интеркаляции в двойную спираль ДНК в этих условиях. Уменьшение специфической вязкости может происходить за счет частичной экранировки фосфатных групп в результате внешнего присоединения лиганда к ДНК.

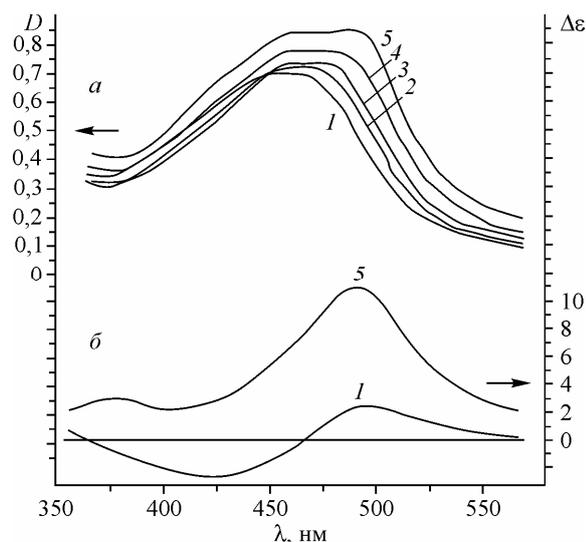


Рис. 7. Изменение во времени спектров поглощения (а) и КД (б) соединения I в 0,001 М NaCl при титровании первого типа, $r = 0,05$, $C_1 = 10^{-5}$ М, время с момента приготовления, мин: 0 (1), 4 (2), 12 (3), 20 (4), 30 (5)

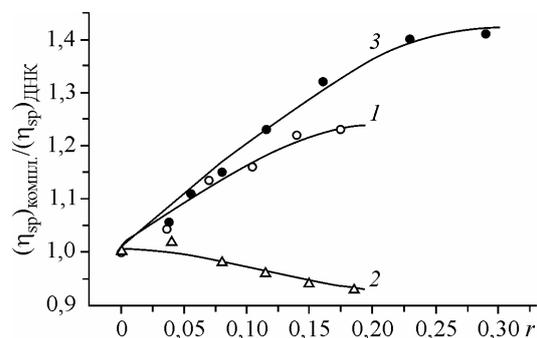


Рис. 8. Изменение η_{sp} ДНК в зависимости от r в присутствии соединения I в 0,001 М KCl (1), в 0,001 М NaCl (2) и соединения II в 0,001 М KCl (3); $C_{ДНК} = 0,002$ %

ВЫВОДЫ

С помощью спектральных методов обнаружено, что соединение I, являющееся производным актиноцина с радикалами 4'-бензо-15-краун-5 в обеих амидных группах, образует в водно-солевых растворах упорядоченные агрегационные структуры, тип которых зависит от природы и концентрации противоиона. Н-агрегаты образуются в растворах KCl при $\mu = 0,01 \div 0,02$; J-агрегаты — при $\mu < 0,01$. В растворах NaCl образуются J-агрегаты соединения I при различных μ .

Соединение I активно взаимодействует с молекулой ДНК. В присутствии ионов K^+ имеет место интеркаляция актиноцинового хромофора в двойную спираль ДНК независимо от исходной формы соединения. В присутствии ионов Na^+ наблюдается образование J-подобных структур соединения I непосредственно на поверхности молекулы ДНК.

Пример соединения I показывает, что введение краун-группировки в структуру соединения, имеющего гетероциклический хромофор, дает возможность с помощью ионного состава среды влиять на его сродство и способ связывания с молекулой ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Glibin E.N. In: Anti-Cancer Drug Design: Biological and Biophysical Aspects of Synthetic Phenoxazone Derivatives/ Eds. A.N. Veselkov, D.B. Davies. – Sevastopol: Sevntu Press, 2002. – P. 23 – 31.
2. Морошкина Е.Б., Кривцова М.А., Глибин Е.Н. // Молекулярная биофизика. – 2002. – **47**. – С. 438 – 443.
3. Морошкина Е.Б., Кузьменко Е.В., Кривцова М.А. // Молекуляр. биология. – 2000. – **34**. – С. 448 – 455.
4. Кривцова М.А., Морошкина Е.Б., Глибин Е.Н. // Молекуляр. биология. – 1984. – **18**. – С. 950 – 956.
5. Khorti A.G., Glibin E.N., Korshunova Z.I. // Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR. Division of Chemical Sciences. – 1991. – **40**, N 10. – P. 1983 – 1986.
6. Kimura K., Shono T. In: Cation Binding by Macrocycles / Eds. Y. Inoue, G.W. Gokel. – New York: Marcel Dekker, 1990. – P. 429 – 463.
7. Fery-Forgues S., Al-Ali F. // J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev. – 2004. – **5**. – P. 139 – 153.
8. Roomans G., von Euller A. // Cell Biol. Int. – 1996. – **20**. – P. 103 – 109.

9. *Smith P., Rhodes N.P., Shortland A.P. et al.* // FEBS Lett. – 1998. – **423**. – P. 19 – 24.
10. *Besson P., Gore J., Vincent E.* // Biochem. Pharmacol. – 1996. – **51**. – P. 1153 – 1158.
11. *Fernandez M.J., Grant K.B., Yerraiz F. et al.* // Tetrahedron Lett. – 2001. – **42**. – P. 5701 – 5704.
12. *Basak A., Dugas H.* // Tetrahedron Lett. – 1986. – **27**. – P. 3 – 6.
13. *Fukuda R., Takenaka S., Tagaki M.* // J. Chem. Soc. Chem. Commun. – 1990. – **15**. – P. 1028 – 1030.
14. *Глибин Е.Н., Плеханова Н.Г., Овчинников Д.В., Коршунова З.Н.* // Журн. орган. химии. – 1996. – **32**. – С. 406 – 408.
15. *Глибин Е.Н., Овчинников Д.В., Плеханова Н.Г.* // Журн. орган. химии. – 1997. – **33**. – С. 1573 – 1576.
16. *Морошкина Е.Б., Богданов А.А., Колоницова М.О., и др.* // Журн. структур. химии. – 2009. – **50**, № 5. – С. 1022 – 1028.
17. *Яворская Н.П., Голубева И.С., Кубасова И.Ю. и др.* // Хим.-фарм. журн. – 2001. – **35**. – С. 15 – 18.
18. *Фрисман Э.В., Щагина Л.В., Воробьев В.И.* // Коллоид. журн. – 1965. – **27**. – С. 130 – 133.
19. *Кривцова М.А., Морошкина Е.Б., Глибин Е.Н., Фрисман Э.В.* // Молекуляр. биология. – 1982. – **16**. – С. 149 – 155.
20. *Maleev V.Ya., Semenov M.A., Kruglova E.B.* In: Anti-Cancer Drug Design: Biological and Biophysical Aspects of Synthetic Phenoxazone Derivatives/ Eds. A.N. Veselkov, D.B. Davies. – Sevastopol: Sevntu Press, 2002. – P. 47 – 127.
21. *Eifeld A., Briggs J.S.* // Chem. Phys. – 2006. – **324**. – P. 376 – 384.
22. *Kobayashi T.* J-aggregate. – Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1996.
23. *Moroshkina E.B., Kvachadze E.A., Ovchinnikov D.V., Glibin E.N.* // Russ. J. Phys. Chem. – 2005. – **79**. – P. S54 – S59.
24. *Lerman L.S.* // J. Mol. Biol. – 1961. – **3**. – P. 18 – 24.