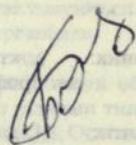


На правах рукопису



КРУГЛОВА ОЛЕНА БОРИСІВНА

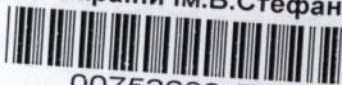
**МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ БАРВНИКІВ З
ПОЛІНУКЛЕОТИДНИМИ МАТРИЦЯМИ, ЩО ЗНАХОДЯТЬСЯ
У РІЗНИХ КОНФОРМАЦІЙНИХ СТАНАХ**

спеціальність 01.04.25 - біофізика

автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фізико-математичних наук

Харків - 1996

ІНСТИТУТ ФІЗИКИ
АН УРСР



Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті радіофізики та електроніки Національної академії наук України

Науковий керівник: доктор фізико-математичних наук,
професор Малеев Володимир Якович

Офіційні опоненти: 1. доктор фізико-математичних наук,
професор Суходуб Леонід Федорович

2. доктор фізико-математичних наук,
професор Веселков Олексій Никонович

Провідна організація: Фізико-технічний інститут низьких температур
ім. Б.І.Веркіна Національної академії наук України,
м. Харків

Захист дисертації відбудеться "26" 09 1996 р. о 18⁰⁰ годині на засіданні
Спеціалізованої вченої ради Д 02.02.13 Харківського державного університету,
310077, м.Харків, пл. Свободи, 4, ауд. 7-4.

З дисертацією можна ознайомитися у Центральній науковій бібліотеці
Харківського державного університету

Автореферат розісланий "22" 08 1996 р.

Вчений секретар Спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

Гаташ С.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Вивчення впливу біологічно активних речовин на організм є одним із найважливіших завдань сучасної молекулярної біології та біофізики. Проникаючи до клітини, ці речовини зв'язуються з нуклеїновими кислотами та порушують їх основні функції - кодування та передачу спадкової інформації. Цілий ряд органічних молекул, які мають такі властивості, широко використовуються як ліки, виявляють мутагенну активність та інактивуючи діють на мікроорганізми.

Ряд біологічно активних речовин щодня поповнюється новими об'єктами досліджень, що потребує вивчення їх комплексотвірної здатності з різними типами полінуклеотидів та з'ясування молекулярних механізмів їхньої біологічної дії. Оскільки детальне розуміння фізико-хімічних механізмів процесів комплексоутворення є дуже складним завданням навіть у найпростіших випадках, не викликає сумніву актуальність дослідження різних модельних систем, якими виступають системи біологічно активний барвник (ліганд) - природні та синтетичні поліелектроліти.

Отримана інформація має не тільки самостійний інтерес з точки зору вивчення процесів комплексоутворення та стійкості комплексів у залежності від фізико-хімічного стану розчинів, але й може бути використана для вивчення впливу шкідливих факторів зовнішнього середовища на генетичний апарат клітини, зокрема у випадку дії на організм низьких доз радіації. Розробка нових методів тестування, які дозволяють порівнювати пошкоджені та контрольні молекули ДНК є надзвичайно важливою проблемою.

Дуже важливим є також розробка нових методів комп'ютерного моделювання, які дозволяють на основі спектrophотометричного методу дослідження аналізувати різні моделі зв'язування лігандів з полінуклеотидними матрицями та отримувати параметри комплексоутворення, у тому числі у залежності від іонної сили розчинів.

Об'єкт та предмет дослідження. Об'єктом дослідження є комплекси барвників піроніну G та метиленового блакитного з полінуклеотидними матрицями у різних конформаційних станах та молекулами ДНК, які виділені із різних органів тварин, які постійно знаходилися в умовах тривалого опромінення у зоні Чорнобильської АЕС.

Теоретична та методологічна основа дослідження. Спектrophотометричний метод дослідження комплексоутворення у видимій та УФ областях є одним з найбільш придатних для кількісного та якісного аналізу взаємодії біологічно активних речовин, що мають хромофорні групи, з різними типами поліелектролітних матриць. Він припускає досконале дослідження у широкому інтервалі довжин хвиль та концентрацій реагуючих компонентів, що є важливим фактором для перевірки існуючих та побудови нових моделей комплексоутворення.

Оскільки навіть невеликі зміни у конформаційному стані полінуклеотидних матриць відбиваються на спектрах поглинання барвників, їх можна запропонувати як чутливі

спектрофотометричні мітки для тестування різних типів пошкоджень та деструктивних змін у матрицях біологічно значущих полімерних молекул - нуклеїнових кислот.

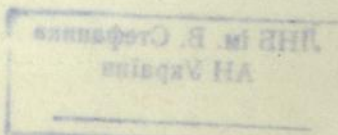
Мета роботи полягає в тому, щоб за допомогою різних моделей кооперативного зв'язування та спектрофотометричного методу аналізу висвітлити механізми комплексоутворення біологічно активних барвників з синтетичними та природними полінуклеотидами у залежності від фізико-хімічного стану розчинів та розробити нові тести, чутливі до пошкодження молекул ДНК в умовах впливу на організм тварин малих доз іонізуючої радіації.

При виконанні роботи вирішувалися такі завдання:

1. Створення у рамках теоретичного методу кооперативного зв'язування лігандів на одномірній матриці узагальненої системи рівнянь, що дозволяє на основі даних спектрофотометричних вимірювань аналізувати різні моделі комплексоутворення у системах полінуклеотид - біологічно активний ліганд, та отримувати оптимальні параметри зв'язування;
2. Детальне спектрофотометричне дослідження взаємодії неорганічного поліфосфату, синтетичних полірібонуклеотидів та ДНК з різним АТ, GC складом з барвниками піроніном G та метиленовим блакитним в залежності від іонної сили та температури розчинів;
3. Апробація розроблених теоретичних та чисельних методів у реальних системах катіонний барвник-полінуклеотидна матриця та обчислення оптимальних параметрів комплексоутворення в таких системах на основі даних спектрофотометричних вимірювань;
4. Дослідження конформаційних змін, що відбуваються в молекулах ДНК з різним АТ, GC складом при їх розчиненні у чистій воді, та особливостей їх взаємодії з барвником піроніном G в умовах низьких іонних сил розчинів в залежності від температури;
5. Розробка нових спектрофотометричних методів тестування за допомогою барвникової мітки, чутливих до деструктивних пошкоджень в молекулах ДНК, виділених з різних органів тварин, які знаходилися у зоні відлучення Чорнобильської АЕС.

Наукова новизна

- Вперше розроблено нові методики комп'ютерного моделювання, які дозволяють аналізувати різні моделі комплексоутворення та встановлювати їх відповідність даним спектрофотометричних вимірювань у системах біологічно активний ліганд - поліелектролітна матриця для одно- і двохспіральных полінуклеотидів. Для кожної моделі складено відповідний алгоритм, який дозволяє обчислювати параметри комплексоутворення та спектри поглинання для різних типів зв'язаного ліганда.
- Вперше теоретичним та чисельним методами досліджено конкурентне зв'язування двох лігандів на одномірній матриці, одним з яких є барвник, а другим - позитивно заряджений іон низькомолекулярних солей, що додані до розчину. Оцінено вплив



іонної сили на спектри поглинання, спектрофотометричні концентраційні залежності, ізотерми зв'язування та параметри комплексоутворення в системах ДНК-ліганд.

- Вперше експериментально знайдено концентраційну залежність змін у вторинній структурі молекул ДНК з різним АТ, GC складом при їх розчиненні у воді, та досліджено вплив таких конформаційних змін на зв'язування ДНК з барвником піроніном G в залежності від температури.
- Розроблено нові методики тестування конформаційних змін в пошкоджених молекулах ДНК, які були виділені з різних органів щурів, що знаходилися в умовах тривалого опромінення низькими дозами радіації у зоні Чорнобильської АЕС.

Практична цінність роботи. Отримані результати розширюють фундаментальні уявлення про молекулярні механізми комплексоутворення біологічно активних речовин з полінуклеотидами різної природи в залежності від їх структури та конформації, а також фізико-хімічного стану розчинів.

Розроблені алгоритми оптимізації можуть бути використані для аналізу та інтерпретації спектрофотометричних концентраційних залежностей та отримання параметрів комплексоутворення для нових фармакологічно активних препаратів з ДНК, РНК і так далі, та побудови моделей комплексоутворення.

Розроблені спектрофотометричні тести на деструктивні зміни в молекулах ДНК у присутності забарвленої мітки можливо використовувати для аналізу радіочутливості різних тканин, їх дозової залежності та впливу низьких доз опромінення тварин на генетичний матеріал клітин.

Особистий внесок автора полягає у виконанні усього обсягу експериментальної частини дисертації, підборі та обробці літературних даних, побудові алгоритмів та обчислювальних програм, аналізу та інтерпретації отриманих результатів.

На захист виносяться такі положення:

- Використовуючи спектри поглинання у системах з кооперативним типом зв'язування у широкій області концентрацій реагуючих компонентів, за допомогою моделі одномірної адсорбції, можливо кількісно охарактеризувати процес комплексоутворення у системах біологічно активний барвник-полінуклеотидна матриця, тобто отримати параметри зв'язування та спектри поглинань різних типів комплексів. Модель конкурентного зв'язування двох лігандів на одомірній матриці, одним з яких є позитивно заряджений іон натрію, дозволяє кількісно охарактеризувати процес комплексоутворення у таких системах в залежності від іонної сили розчинів;
- З'ясовано спектрофотометричні особливості комплексоутворення у системах піронін G та метиленовий блакитний з різними типами полінуклеотидів: неорганічний поліфосфат, синтетичні полірібонуклеотиди, РНК, ДНК з різним АТ, GC складом у залежності від концентрацій, рН, температури та іонної сили розчинів;

- Знайдено фізико-хімічні особливості конформаційних змін, що відбуваються в молекулах ДНК з різним АТ, GC складом основ у розчинах з нулевою іонною силою, та їх вплив на комплексоутворення з барвником;
- Розроблено спектрофотометричні тести на деструктивні зміни, що відбуваються в молекулах ДНК, виділених з печінки та селезінки щурів різного віку та поколінь, що знаходилися в умовах тривалого опромінення у зоні відчуження Чорнобильської АЕС.

Головні результати роботи були апробовані на:

Міжнародному симпозиумі "Біофізика нуклеїнових кислот та нуклеопротеїдів" (Таллінн, 1981), IV - VII Всесоюзних конференціях з спектроскопії біополімерів (Харків, 1981, 1984, 1988, 1991), Радіобіологічному з'їзді (Київ, 1993), I-ому з'їзді Українського біофізичного товариства (Київ, 1994), XVII Міжнародному конгресі по біохімії та молекулярній біології (Бангарор, 1994), VI Європейській конференції з спектроскопії біологічних молекул (Ліль, 1995).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 11 статей у журналах, які реферуються.

Структура і об'єм роботи. Дисертація складається із вступу, шести глав, заключення та висновків і перелику використаної літератури з 161 пунктів. Роботу викладено на 148 сторінках, вона містить 39 рисунків та 6 таблиць.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ РОБОТИ

У першій главі подано огляд літератури, що висвітлює сучасні дослідження комплексоутворення біологічно активних речовин з полінуклеотидними матрицями, зокрема умови утворення різних типів комплексів та моделей зв'язування лігандів. Розглядаються основні методи, що дозволяють кількісно описувати експериментальні результати в таких системах за допомогою ряду параметрів комплексоутворення та їх залежності від температури та іонної сили розчинів. Подано аналіз теоретичних методів, що по-різному описують кооперативний тип зв'язування лігандів з поліелектролітними матрицями в рамках моделі одномоірної адсорбції.

У другій главі описано основні характеристики використаних поліаніонів та речовин, а також методики обробки даних спектрофотометричних вимірювань. Спектри поглинання реєструвалися на спектрофотометрі Specord M40 та Hitachi - 356 у видимій та УФ областях у термостатованих кюветах. В роботі використовувалися реактиви фірм Serva, Sigma, Fluka.

Описано розрахунковий метод, що дозволяє на базі даних спектрофотометричних вимірювань за допомогою нелінійного метода найменших квадратів (НМНК) отримувати значення параметрів комплексоутворення в системах полінуклеотид - ліганд.

Одержані результати представлено на рис. 1 - 9 та обговорено у третій - шостій главах.

У третій главі досліджено процес димерізації плоских ароматичних молекул у водних розчинах. Характер змін, що відбуваються у спектрах поглинання розчинів багатьох

фармакологічно активних речовин при зростанні їх концентрації пов'язують з димерізацією цих молекул. Для гетероциклічних барвників ксантенового, тіонінового та акридинового рядів при димерізації зменшується інтенсивність у максимумі поглинання вільного барвника і з'являється нова смуга у довгохвильовій області спектра. За допомогою квантово-хімічного методу CNDO/S розраховано зміни у спектрі димера катіонів незаміщеного піроніну в залежності від відстані між площинами молекул. Отримані дані порівнюються з спектрами димерів барвників піроніну G та метиленового блакитного, обчислених за допомогою оптимізації спектрів поглинання кожного з барвників в широкій концентраційній області.

Знайдено оптимальні спектри поглинання та константи димерізації K_D у залежності від іонної сили розчинів. Спектри поглинання барвників у мономерній та димерній формах та величини констант димерізації (Рис.1) використовуються подальше як відомі при розгляді різних моделей комплексоутворення цих барвників з поліелектролітними матрицями різних типів.

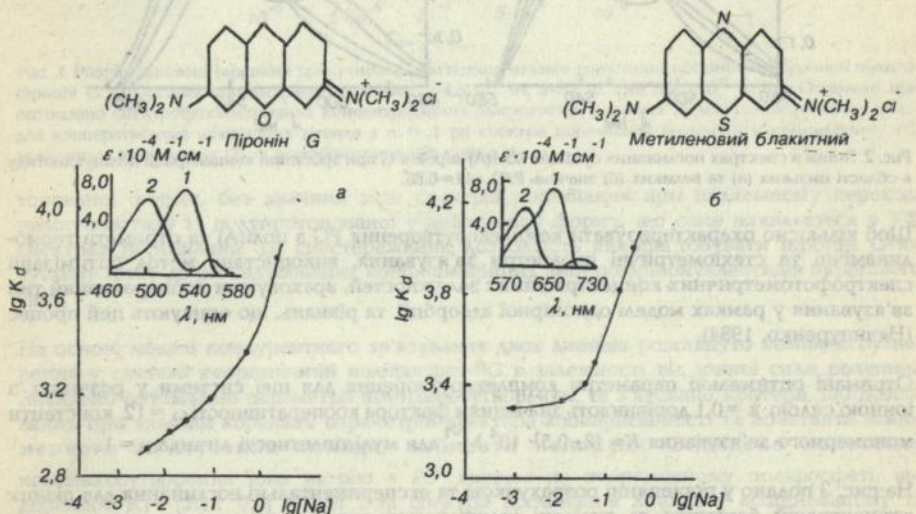


Рис. 1. Залежність констант димерізації піроніна G (а) і метиленового блакитного (б) від іонної сили розчинів, обчислених для оптимальних спектрів поглинання мономерної (1) та димерної (2) форм барвників.

Четверта глава присвячена експериментальним та теоретичним дослідженням комплексоутворення полінуклеотидів з різним складом основ з барвником піроніном G (PG) у залежності від концентрацій компонентів, температури та конформаційного стану полінуклеотидів, а також впливу на комплексоутворення змін концентрацій одновалентних катіонів низькомолекулярних солей.

При взаємодії PG з матрицею пурінового типу полі(A) у нейтральному середовищі утворюються різні типи комплексів, кількість яких залежить від концентрацій реагуючих

компонентів або відношення P/D , де P - концентрація негативно заряджених груп PO_4^- , а D - концентрація барвника (ліганда). Асоціація молекул барвника на матриці полі(А) приводить до з'явлення короткохвильової смуги в області малих значень P/D , а в області великих P/D характерним є зсув спектра поглинання сумішів в довгохвильову область, що свідчить про зростання кількості частково інтеркалірованого ліганда (Рис. 2).

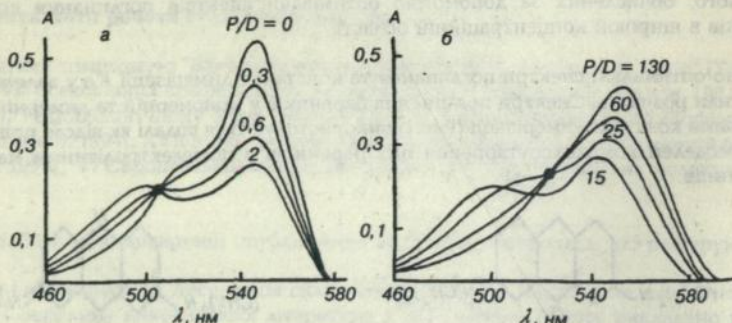


Рис. 2. Зміни в спектрах поглинання сумішей полі(А)-піронін G при зростанні концентрації полінуклеотиду в області низьких (а) та великих (б) значень P/D , $pH = 6,86$.

Щоб кількісно охарактеризувати комплексоутворення PG з полі(А) та отримати термодинамічні та стехіометричні параметри зв'язування, використано метод оптимізації спектрофотометричних концентраційних залежностей, враховуючи кооперативний тип зв'язування у рамках моделі одномірної адсорбції, та рівнянь, що описують цей процес (Нечипуренко, 1984).

Отримані оптимальні параметри комплексоутворення для цієї системи у розчинах з іонною силою $\mu = 0,1$ дорівнюють значенням фактора кооперативності $\omega = 12$, константи мономерного зв'язування $K = (2 \pm 0,5) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ для мультиплетності ліганда $n = 1$.

На рис. 3 подано у порівнянні розрахункові та експериментальні поглинання для різних концентрацій барвника та виділені індивідуальні спектри поглинання різних типів зв'язаного ліганда.

Пок'зано, що розглянута модель та знайдені параметри комплексоутворення пояснюють усі концентраційні залежності змін, що спостерігаються при комплексоутворенні у цій системі: лінійну залежність поглинання від P/D у області P/D менше за 1; невеликі зміни у спектрах поглинання сумішей при $1 < P/D < 10-20$; зміни у спектрах поглинання для різних концентрацій барвника та довгохвильовий зсув при великих значеннях P/D та ін.

Виявлено, що спостережені істотні зміни у комплексоутворенні PG із полінуклеотидами полі(А) та сополімером полі(А:U)(90:10) у залежності від кислотності середовища пов'язані з конформаційним переходом полінуклеотида із повністю протонованої до полупро-

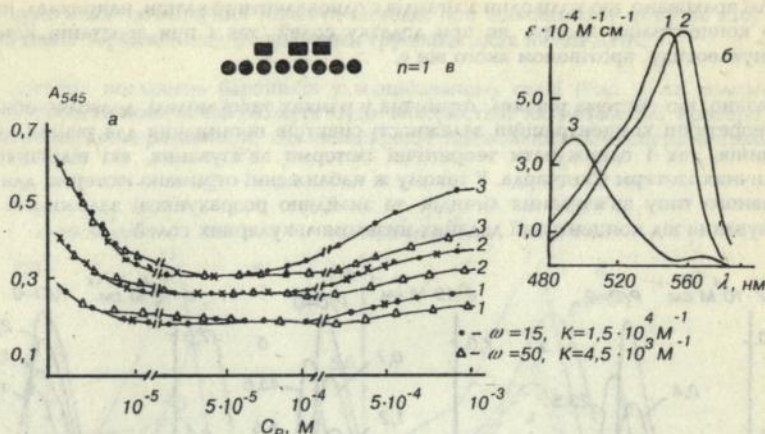


Рис. 3. Розрахунковані (кранки і трикутники) і експериментальні (хрестики) поглинання сумішей полі(А)-піронін G для різних концентрацій барбітука: $1-4,5 \cdot 10^{-6} M$; $2-6,2 \cdot 10^{-6} M$; $3-9,5 \cdot 10^{-6} M$ (а). Отримані при оптимізації спектрофотометричних концентраційних залежностей у рамках моделі одновірної адсорбції для кооперативного зв'язування ліганда з $n = 1$ (в) спектри поглинання барбітука у мономерному (1), мономерно зв'язаному (2) та асоційованому (3) станах (б).

тонованої форми, без значних змін спектрів поглинання при подальшому переході полінуклеотиду із полупротонованої у нейтральну форму, що саме виявляється в УФ спектрах поглинання. Ці спостереження дозволяють використовувати піронін G як чутливу мітку до рН-індукованих конформаційних змін полірібонуклеотидів пуринового типу.

На основі моделі конкурентного зв'язування двох лігандів розглянуто комплексоутворення у системі неорганічний поліфосфат-PG в залежності від іонної сили розчинів. Знайдено оптимальні параметри комплексоутворення, та з'ясовано критерії, що дозволяють при значній кореляції параметрів (фактора кооперативності та константи мономерного зв'язування ліганда) вибирати найкращі. Знайдено константу комплексоутворення іона натрію з PO^- групою на неорганічному поліфосфаті, що дорівнює $K_1 = (2,3 \pm 0,6) \cdot 10^2 M^{-1}$, та спектри поглинання ліганда у асоційованому та мономерно зв'язаному станах.

Якісно зафіксовано специфічність зв'язування піроніну G з полірібонуклеотидними матрицями з різним нуклеотидним складом (полі(А), полі(С), полі(Г)), що знаходяться у розчинах в різних конформаційних станах.

П'ята глава описує результати теоретичних та експериментальних досліджень комплексоутворення лігандів з ДНК різного нуклеотидного складу в залежності від іонної сили розчинів. Щоб кількісно охарактеризувати вплив низькомолекулярних катіонів на процес комплексоутворення за кооперативним типом зв'язування, розглянуто теоретичний метод конкурентного зв'язування двох лігандів з поліелектролітною матрицею. У

методі враховано, що коли один з лігандів є одновалентний катіон, наприклад, іон натрію, його концентрація зростає як при додатку солей, так і при зростанні концентрації полінуклеотиду, протіоном якого він є.

Показано, що система рівнянь, отримана у рамках такої моделі, дозволяє обчислювати як теоретичні концентраційні залежності спектрів поглинання для різних іонних сил розчинів, так і одержувати теоретичні ізотерми зв'язування, які відрізняються від класичних ізотерм Скетчарда. У такому ж наближенні отримано ізотерми для некооперативного типу зв'язування лігандів, та знайдено розрахункові залежності констант зв'язування від концентрації доданих низькомолекулярних солей.

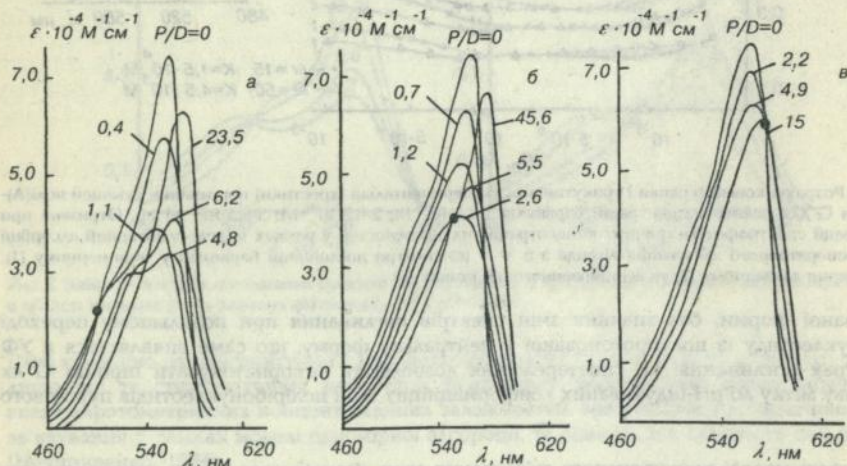


Рис. 4. Залежність спектрів поглинання сумішей ДНК-піронін G для ДНК із тімуса теляти від концентрації полінуклеотиду (P/D) у розчинах з концентраціями NaCl: 0 М (а); $4 \cdot 10^{-3}$ М (б); 0.2 М (в).

Характер та величина змін у видимих та УФ спектрах поглинання для сумішей ДНК-піронін G та ДНК-метиленовий блакитний свідчать про істотну частку комплексів в цих системах, що утворюються за кооперативним типом зв'язування, особливо в областях з низькими P/D, у розчинах з низькими іонними силами та у воді (Рис. 4). Це, зокрема, дозволяє зробити висновок, що молекулярні механізми комплексоутворення у цих системах пов'язані не тільки з інтеркаляцією барвників, а також з утворенням значної кількості асоціатів катіонів-лігандів на негативно заряджених фосфатах матриці ДНК. Таким чином, зовнішнє зв'язування лігандів з ДНК також можна моделювати, як кооперативне зв'язування ліганду, приймаючи до уваги утворення асоціатів. Інтеркаляцію ліганда моделюємо рівнянням для некооперативного типу зв'язування. У такому випадку система з шести рівнянь описує усі можливі типи комплексів в таких системах, що дозволяє знаходити параметри комплексоутворення при оптимізації знайдених спектрів, офотометричних концентраційних залежностей у широкій області довжин хвиль. Показано, що експериментальним даним якнайкраще задовольняє модель з значенням

$n=2$, що припускає розміщення молекул лігандів при зовнішньому типі зв'язку між двома негативно зарядженими фосфатними групами двох нитей ДНК.

Знайдені спектри поглинання барвників у асоційованому стані (Рис. 5) та положення отриманих ізобестичних точок можуть бути використані як незалежні критерії при виборі факторів кооперативності, що якнайкраще задовольняють експериментальним даним.

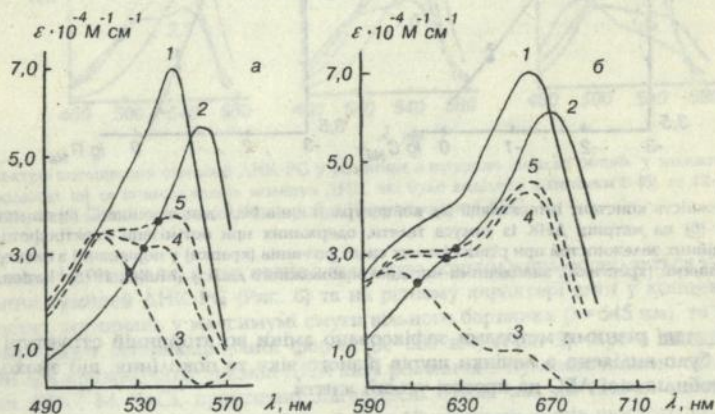


Рис. 5. Спектри поглинання барвників у вільному (1), інтеркалірованому (2) та асоційованому станах на матрицях ДНК для піроніна G (а) та метиленового блакитного (б) для різних значень фактора кооперативності: $w=30$ (3); $w=80$ (4); $w=150$ (5).

Показано, що отримані величини констант комплексоутворення по типу інтеркаляції для PG та MB лінійно залежать від $\lg C_{\text{Na}^+}$ (Рис. 6), а знайдена величина константи зв'язування іонів Na^+ з PO^- групами на матриці ДНК має мале значення: $K_1 = 12 \pm 4 \text{ M}^{-1}$ із даних оптимізації спектрофотометричних концентраційних залежностей у системі ДНК-PG та $K_1 = 4,7 \pm 0,8 \text{ M}^{-1}$ із даних оптимізації у системі ДНК-MB.

Показано, що при розчиненні у воді порушується вторинна структура молекул ДНК і ступінь цих конформаційних змін залежить від концентрації ДНК по-різному для АТ-чи GC-збагачених ДНК (Рис. 7). Проте при комплексоутворенні із барвником PG, який стабілізує молекулу ДНК, навіть при нулевих іонних силах, змін у вторинній структурі ДНК не виникає, що зафіксовано на прикладі ДНК із тимуса теляти та ДНК_{M.tut}.

Показано, що комплексоутворення із барвником PG для GC-збагаченої ДНК_{M.tut} відрізняється більшими константами комплексоутворення по типу інтеркаляції у порівнянні із ДНК з тимуса теляти, та підвищеною стабільністю комплексів до термічної денатурації.

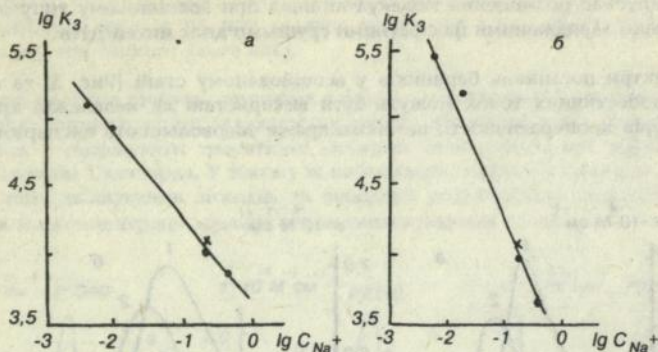


Рис. 6. Залежність констант інтеркаляції від концентрації іонів Na^+ для піроніна G (а) та метиленового блакитного (б) на матриці ДНК із тимуса теляти, одержаних при оптимізації спектрофотометричних концентраційних залежностей при різних іонних силах розчинів (крапки) у порівнянні з експериментальними значеннями (хрестики), знайденими методом рівноважного діалізу (Muller, 1975; Norden, 1982).

У шостій главі різними методами зафіксовано зміни во вторинній структурі молекул ДНК, які було виділено з печінки щурів різного віку та покоління, що знаходилися у зоні Чорнобильської АЕС на протязі усього життя.

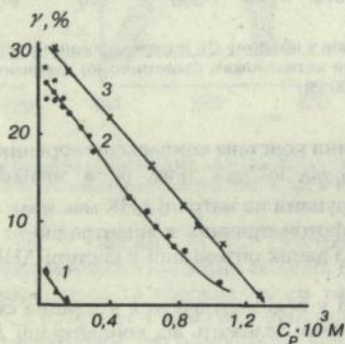


Рис. 7. Зміни ступеня денатурації від концентрації ДНК для молекул ДНК з різними (АТ):(GC) складом у розчинах з нулевою іонною силою ($T = 23^\circ C$): 1-ДНК_{М.Іут} (28:72); 2-ДНК_{Тин} (57:43); 3-ДНК_{Сі.реп} (72:28).

Зокрема показано, що у порівнянні з контрольними зразками ДНК та ДНК з селезінки, у зразках ДНК з печінки опромінених тварин зростає частка низькомолекулярних фрагментів, змінюються величини гіперхромних ефектів, та криві плавлення ДНК при тепловій денатурації, на яких з'являються низькотемпературні області плавлення. Змінюється також характер концентраційних залежностей при розчиненні цих зразків ДНК у чистій воді.

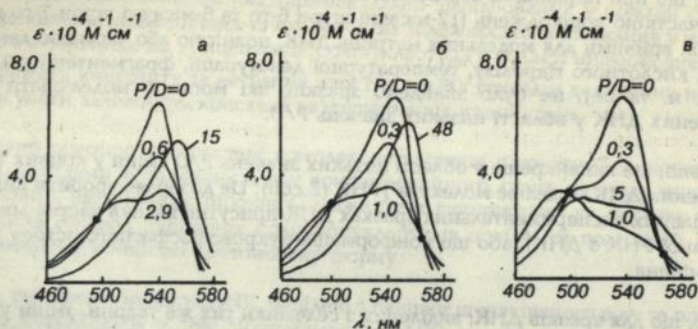


Рис. 8. Спектри поглинання сумішей ДНК-PG у розчинах з нулевою іонною силою у залежності від P/D для контрольних (а) та пошкоджених молекул ДНК, які було виділено з печінки 6-(б) та 12-місячних (в) щурів шостого покоління, що знаходилися у зоні Чорнобильської АЕС.

Встановлено, що тенденція, пов'язана з кількістю пошкоджень, виявляється на спектрах поглинання сумішей ДНК-PG (Рис. 8) та на різному характері змін у концентраційних залежностях поглинань у максимумі смуги вільного барвника ($\lambda = 545$ нм), та максимумі поглинання його інтеркалірованої форми ($\lambda = 560$ нм) (Рис. 9). Криві титрування, що одержані для контрольних зразків ДНК як у розчинах з нулевою іонною силою, так і у розчинах $4 \cdot 10^{-3}$ М NaCl, практично збігаються. В той час, як такі ж залежності, що одержані для ДНК, виділеної з печінки 3, 6 та 12-місячних щурів шостого та 6-місячних щурів сьомого покоління значно відрізняються від контрольних кривих.

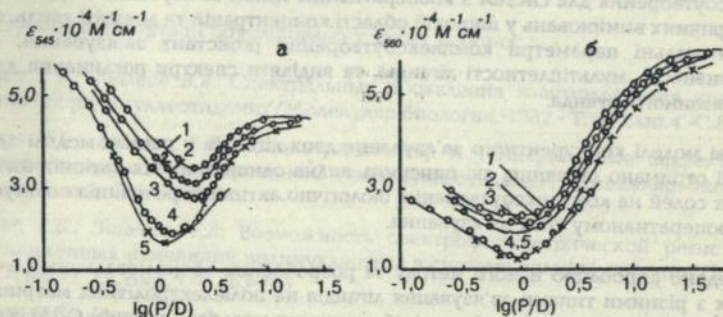


Рис. 9. Концентраційні залежності поглинання сумішей ДНК-PG у розчинах з нулевою іонною силою в максимумі поглинання вільного барвника (а) та його інтеркалірованої форми (б) для 1- контрольних зразків ДНК з печінки 3- і 6-місячних щурів; 2,3,4-ДНК з печінки 3-, 6- та 12-місячних щурів шостого покоління; 5-ДНК з 6-місячних щурів сьомого покоління, що знаходилися у зоні Чорнобильської АЕС.

Показано, що при порівнянні отриманих кривих титрування для зразків ДНК з максимальною часткою пошкоджень (12-місячні щури 6-го та 6-місячні щури 7-го покоління) з такими ж кривими для модельних матриць ДНК, повністю або частково деградованих (в умовах кислотного гідролізу, температурної денатурації, фрагментації ультразвуком до 500 п. н. та ін.), не було знайдено зразків, які могли б моделювати криві для пошкоджених ДНК у області низьких значень P/D.

Встановлено, що якнайкраще у області низьких значень P/D зміни у кривих титрування пошкоджених ДНК моделює молекула тРНК (*E.coli*). Це дозволяє зробити висновок, що або у виділених експериментальних зразках ДНК присутня велика частка домішки РНК (чи зв'язаної РНК з ДНК), або що конформація цукрофосфатного остову таких ДНК значно змінена.

Показано, що для зразків ДНК, виділених з селезінки тих же тварин, зміни у молекулах ДНК, що фіксуються, значно менші. Тільки для 12-місячних щурів шостого покоління було знайдено зміни у кривих титрування з барвником піроніном G у порівнянні з контролем. Отримані результати порівнюються з літературними даними про морфофункціональний стан різних органів тварин при їх опроміненні низькими дозами іонізуючої радіації та свідчать про те, що специфічне опромінення тварин в умовах зони ЧАЕС чітко виявлюється на рівні молекул ДНК.

ВИСНОВКИ

1. З'ясовано молекулярні механізми комплексоутворення біологічно активних катіонів барвників з плоскими гетероциклами з поліелектролітними матрицями різного типу від найбільш простих (неорганічний поліфосфат) до значно складніших (молекули ДНК).

2. Запропоновано новий кількісний метод, що дозволяє на основі конкретної моделі комплексоутворення для систем з кооперативним типом зв'язування та даних спектrophотометричних вимірювань у широкій області концентрацій та довжин хвиль, обчислювати оптимальні параметри комплексоутворення (констант зв'язування, факторів кооперативності, мультиплетності ліганда), та виділяти спектри поглинання для різних типів зв'язаного ліганда.

На основі моделі конкурентного зв'язування двох лігандів у рамках моделі одновірної адсорбції отримано рівняння, які описують вплив одновалентних катіонів низькомолекулярних солей на комплексоутворення біологічно активних речовин з полінуклеотидами по кооперативному типу зв'язування.

3. Проведено апробацію нового методу та розроблених обчислювальних алгоритмів у системах з різними типами зв'язування лігандів на поліелектролітних матрицях: неорганічний поліфосфат - піронін G, полірібоаденілова кислота - піронін G, ДНК - метиленовий блакитний та ДНК - піронін G; у першій, третій та четвертій системах - у залежності від іонної сили розчинів.

Показано, що запропонований обчислювальний метод дозволяє у розглянутих системах отримати оптимальні величини параметрів комплексоутворення та виділити спектри поглинання лігандів для різних типів комплексів. Знайдені параметри задовольняють

ряду характерних особливостей, експериментально зафіксованих у кожній системі: у кількості і положенні ізобестичних точок, лінійних залежностей поглинання у максимумі смуги вільного барвника від концентрації полінуклеотида в області низьких значень P/D та ін. та отримати константу зв'язування іона Na^+ з PO^- групами для різних поліелектролітів і з'ясувати залежність констант зв'язування від іонної сили.

4. Зафіксовано різницю у характері комплексоутворення піроніну G з синтетичними полірібонуклеотидами в залежності від конформаційного стану та типу нуклеїнових основ. Показано, що барвник піронін G може бути використано як чутливу мітку на рН-індукований перехід пуринових полірібонуклеотидів полі(A) та полі (A:U) (90:10) із полупротонованої у повністю протоновану форму.

5. Показано, що зразки молекул ДНК, виділені з печінки щурів різного віку та покоління, які постійно знаходилися у зоні Чорнобильської АЕС, частково деградовані і ступінь пошкоджень зростає з віком тварин та номером покоління.

Розроблено метод тестування змін у дефектних ДНК за допомогою забарвленої мітки, заснований на порівнянні спектрів комплексів різних модельних та контрольних зразків ДНК з PG з відповідними спектрофотометричними кривими титрування для пошкоджених ДНК у широкій області концентрацій полінуклеотиду при постійній концентрації барвника.

Знайдено, що для зразків ДНК з селезінки тих самих щурів зміни у кривих спектрофотометричного титрування в присутності барвника значно менші. Для цих зразків ДНК запропоновано новий метод тестування, що дозволяє фіксувати деструктивні зміни в молекулах ДНК при порівнянні кривих плавлення в присутності двох конкуруючих лігандів, одним з яких є барвник PG, а другим - фармакологічно активний препарат цитозинарабіозид.

Головні результати дисертації опубліковано у таких роботах:

1. *Круглова Е.Б., Малеев В.Я.* Спектральные проявления взаимодействия красителя пирина G с полинуклеотидами // Молекуляр. биология. -1982.- Т.16, Вып.4.-С.865-869.
2. *Круглова Е.Б., Малеев В.Я.* Концентрационные и температурные эффекты при взаимодействии красителя пирина G с полинуклеотидами // Молекуляр. биология. -1985.-Т.19, Вып.2.-С.565-570.
3. *Круглова Е.Б., Зиненко Т.Л.* Возможность спектрофотометрической регистрации конформационных изменений полинуклеотида в системе поли(A)-пиронин G // Биофизика. -1988.-Т.33, Вып.5.-С.763-766.
4. *Круглова Е.Б., Пегаш Ю.Ф., Круглов В.О.* Интерпретация электронного спектра поглощения ксантовых красителей при димеризации // Журнал прикладной спектроскопии. -1990.-Т.52, N1.-С.159-163.
5. *Круглова Е.Б.* Спектрофотометрический метод определения параметров кооперативного связывания в системах полинуклеотид-лиганд // Молекуляр. биология. -1990.- Т.24, Вып.2.-С.514-523.

6. *Круглова Е.Б.* Один из возможных подходов к учету влияния противоионов на процессы комплексообразования в системах полиэлектролит-лиганд// Молекуляр. биология.-1991.-Т.25, Вып.1.-С.60-68.
7. *Круглова Е.Б.* Спектрофотометрический анализ поведения растворов ДНК в воде и при низких ионных силах//Биополимеры и клетка.-1992.-Т.8, N1.- С.56-62.
8. *Круглова Е.Б., Зиненко Т.А.* Экспериментальные и теоретические исследования образования комплексов ДНК с биологически активными лигандами, содержащими хромовые группы в зависимости от ионной силы растворов//Молекуляр.биология.-1993.-Т.27, Вып.3.-С.655-665.
9. *Гасан А.И., Красницкая А.А., Круглова Е.Б., Малеев В.Я.* Структурные изменения в ДНК, выделенной из печени крыс разного возраста, находившихся в зоне Чернобыльской АЭС//Докл.АН Украины.-1993.- N4.-С.149-153.
10. *Круглова Е.Б.* Спектрофотометрический анализ процессов кооперативного связывания в системе полифосфат-окрашенный лиганд//Биофизика.-1994.-Т.39, Вып.2.-С. 280-288.
11. *Круглова Е.Б., Красницкая А.А., Малеев В.Я.* Спектрофотометрия комплексов нуклеиновых кислот с красителем пиронином G в качестве теста радиационных повреждений ДНК//Молекуляр.биология.-1995.-Т.29, Вып. 1.- С.125-134.

АННОТАЦИЯ

Круглова Е.Б. Молекулярные механизмы взаимодействия красителей с полинуклеотидными матрицами, находящимися в различных конформационных состояниях. На правах рукописи. Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.25 - биофизика. Харьковский государственный университет, г.Харьков, 1996.

Методом спектрофотометрического анализа в видимой и УФ областях исследовано комплексообразование красителей пиронина G (PG) и метиленового голубого (MB) с полирибонуклеотидами и ДНК разного нуклеотидного состава в зависимости от физико-химического состояния растворов и температуры. Количественный анализ полученных спектрофотометрических концентрационных зависимостей был проведен с использованием нового метода оптимизации спектров поглощения на основе модели кооперативного связывания лиганда с полиэлектролитной матрицей. Для учета влияния ионов Na^+ на процесс связывания был использован метод конкурентного связывания двух лигандов. Вычислены оптимальные параметры комплексообразования в системах неорганический полифосфат-пиронин G, полирибоадениловая кислота-пиронин G, ДНК-метиленовый голубой и ДНК-пиронин G и выделены оптимальные спектры поглощения лигандов в разных связанных состояниях. Показано, что молекулы ДНК, выделенные из печени крыс разного возраста и поколений, постоянно находившихся в зоне специфического облучения Чернобыльской АЭС, существенно деградированы. Разработаны методы тестирования деструктивных изменений в таких ДНК, основанные на сравнительном анализе спектров комплексов дефектных ДНК с пиронином G в качестве метки, с

соответствующими кривыми, полученными для контрольных ДНК и разных модельных полинуклеотидных матриц.

SUMMARY

Kruglova E.B. The molecular mechanisms of interaction of dyes with polynucleotide matrixes in the dependence on these different conformational states. Thesis for a Candidate's degree of Physical and Mathematical Sciences on Speciality 01.04.25 - Biophysics. Kharkov State University, Kharkov, 1996.

The binding of two dyes (pyronin G (PG) and methylene blue (MB)) with the different polyelectrolyte matrixes and DNA in the dependence of physico-chemical states of solutions and temperature have been studied spectrophotometrically in the visible and UV ranges. The theoretical model of the cooperative binding of the ligand was used for the computation of the complexation parameters. The ion Na^+ is the concurrent for negatively charged sites of binding and it is introduced into the system both from NaCl and from polyelectrolyte. The optimal parameter values and extinction coefficients values in the different ligand binding states have been computed.

It is found that DNA from the liver of experimental animals of different age, permanent inhabitants of the Chernobyl zone, have the radiation damages in DNA. A method for testing the defects in a DNA secondary structure based on comparative analysis of the spectra for the complexes of different nucleic acids with pyronin G, as label, and relative curves of spectrophotometric titration have been developed.

КЛЮЧОВІ СЛОВА

Нуклеїнові кислоти, ДНК, комплексоутворення, спектрофотометрія у видимій та УФ областях, барвники піронін G та метиленовий блакитний, радіаційні пошкодження ДНК

Наукове видання

Круглова Олена Борисівна

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ БАРВНИКІВ З
ПОЛІНУКЛЕОТИДНИМИ МАТРИЦЯМИ, ЩО ЗНАХОДЯТЬСЯ
У РІЗНИХ КОНФОРМАЦІЙНИХ СТАНАХ

Під. до друк. 18.07.96 р. Формат 60*84/16.
Папір офс. Офс. друк. Умов. друк. ар. 1.0. Обл.-вид. ар. 1.1
Тираж 100 прим. Зав. 52. Безкоштовно.

Ротапринт ІРЕ НАН України
Харків-85, вул. Акад. Проскури, 12

Ab 32. H3E

87.5834

