



УДК 577.182.99'15

## ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ СОЕДИНЕНИЙ АНТРАЦИКЛИНОВОГО РЯДА НА ИХ ИНТЕРКАЛЯЦИЮ В ДНК

*Брикентштейн В. Х., Баранов Е. П., Пштина Л. Р.,  
Бушелев С. Н. \**

*Научно-исследовательский институт по биологическим испытаниям  
химических соединений, г. Кулава Московской обл.;*

*\* Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Методом «остановленной струи» определены константы скоростей процесса интеркаляции в ДНК различных производных антрациклинового ряда. Показано, что для рассмотренных соединений прямые константы скорости процесса интеркаляции отличаются менее чем в 3 раза. То же справедливо и для обратных реакций. Таким образом, заместители (в положении С9) слабо влияют на связывание антибиотиков с ДНК. Этот вывод согласуется с результатами модельных расчетов потенциальной энергии взаимодействия соединений антрациклинового ряда с парами оснований ДНК.

Антрациклиновые антибиотики широко применяются в химиотерапии злокачественных опухолей [1, 2]. Мишенью действия антрациклиновых антибиотиков в клетке является ДНК, конечный эффект реализуется через подавление ДНК-зависимых синтезов ДНК и РНК [3–5]. Результаты многочисленных исследований, например [4–6], свидетельствуют о том, что при образовании комплекса агликон антибиотика интеркалирует между парами оснований ДНК.

К настоящему времени синтезировано более 200 антрациклиновых аналогов и их число продолжает увеличиваться. При этом большинство новых полусинтетических соединений получено путем модификации заместителей в положении С9 ацетильной группы для трех природных антибиотиков: адриамицина, рубомицина и карминомицина (рис. 1). Активность новых препаратов изучается, как правило, либо на животных, либо по подавлению роста клеточных культур. При этом очень сложно установить, на каком из этапов действия препаратов наиболее существенно сказывается изменение в молекулярной структуре испытуемых соединений и в связи с этим сложно также наметить путь направленного синтеза новых эффективных препаратов.

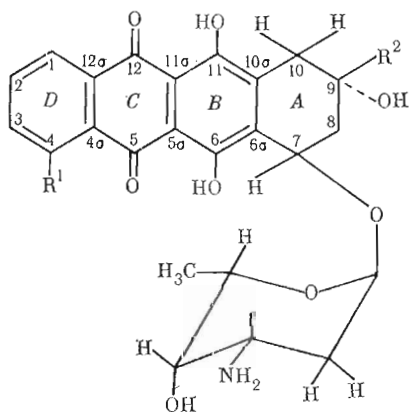


Рис. 1. Общая структурная формула антрациклиновых производных (см. табл. 1 и 2)

Механизм биологического действия антрациклинов даже на клеточном уровне достаточно сложен и включает в себя несколько этапов, ключевыми из которых, по-видимому, являются проникновение антибиотиков через цитоплазматическую и ядерную мембраны и последующее связывание с ДНК [7]. Поэтому для установления связи структура — активность в ряду антрациклиновых производных целесообразно исследовать влияние заместителей на каждый из этих процессов отдельно.

Настоящая работа посвящена в основном изучению влияния заместителей в положении С9 агликона антрациклинов на процесс их интерка-

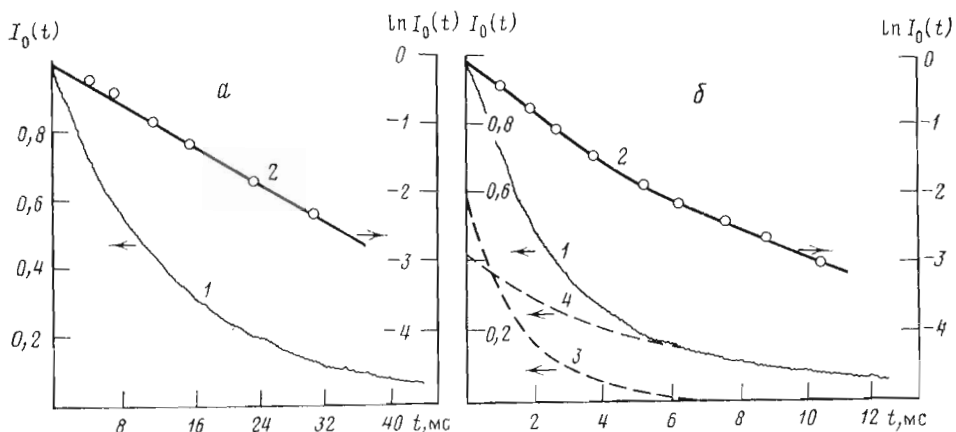


Рис. 2. Изменение интенсивности флуоресценции  $I_0$  со временем при добавлении ДНК для дауномицина (а) и рубомицина (б). Конечная концентрация ДНК в растворе  $2 \cdot 10^{-5}$  М п.о.,  $r=0,0125$ . а: 1 —  $I - I_0(t)$ , 2 —  $\ln I_0(t)$ ; б: 1 —  $I - I_0(t)$ , 2 —  $\ln I_0(t)$ , 3 —  $I_1 = ae^{-\lambda_1 t}$ , 4 —  $I_2 = be^{-\lambda_2 t}$ ,  $I_0(t) = I_1 + I_2$

ляции в ДНК. В первой части приведены экспериментальные данные, позволяющие определить константы скорости интеркаляции. Вторая часть работы посвящена модельному расчету потенциальной энергии взаимодействия с парами оснований ДНК.

*Определение констант, характеризующих процесс интеркаляции соединений антрациклинового ряда между парами оснований ДНК*

Кинетические измерения проводились при постоянном отношении ( $r=0,0125$ ) концентраций лиганда  $[A_0]$  и ДНК  $[B_0]$ . На рис. 2 (а, б) приведены экспериментальные кривые изменения со временем интенсивности флуоресценции растворов дауномицина (агликопа рубомицина) и рубомицина после добавления ДНК. В первом случае изменение интенсивности флуоресценции во времени описывается одной экспонентой  $I_i = C_i e^{-\lambda_i t}$  (индекс «i» относится к соответствующей концентрации ДНК  $[B_0]_i$ ). Для рубомицина кинетические кривые можно представить в виде суммы двух экспонент:

$$I_j(t) = a_j e^{-\lambda_{1j} t} + b_j e^{-\lambda_{2j} t} \quad (1)$$

при всех использованных значениях  $[B_0]_j$ :  $10^{-5}$  М,  $2 \cdot 10^{-5}$  М,  $4 \cdot 10^{-5}$  М (пар оснований). Относительный вклад «быстрого» участка, характеризуемый отношением  $a_j/b_j$ , возрастает с увеличением  $[B_0]$ . В контрольных экспериментах показано, что при уменьшении  $r$  до 0,008 форма кинетических кривых практически не меняется. Для всех исследованных антибиотиков были получены результаты качественно такие же, как для рубомицина.

Наличие двух экспонент в кинетической кривой связывания рубомицина с ДНК может определяться рядом причин.

а) *Гетерогенность мест связывания.* В этом случае изотермы адсорбции, построенные в координатах Скэтчарда ( $[n]/[m] = f([n])$ ), где  $[m]$  и  $[n]$  — концентрации свободного и связанного лигандов, имеют нелинейный характер. Нелинейность изотерм адсорбции рубомицина на ДНК была действительно обнаружена [8, 9]. Но, как показано в этих работах, данный эффект обусловлен не гетерогенностью мест связывания, а тем, что при взаимодействии лиганда с одномерным полимером, каким является ДНК, простая теория Скэтчарда, справедливая для изолированных мест посадки, неприменима даже для некооперативного связывания [10].

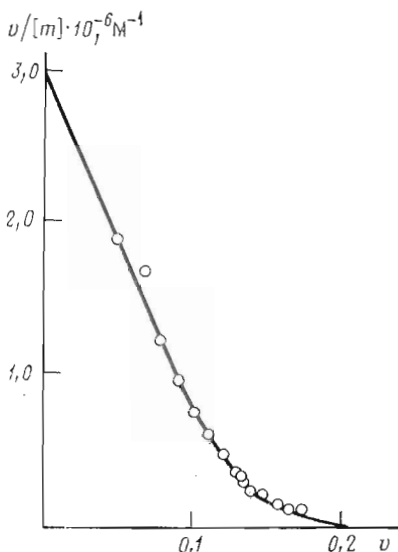


Рис. 3

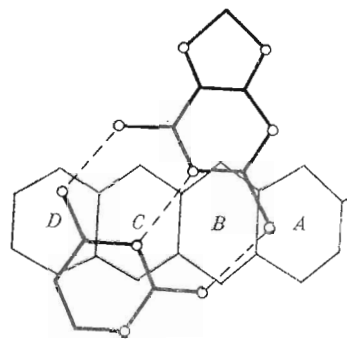


Рис. 4

Рис. 3. Флуоресцентное титрование рубомицином ДНК. Данные (точки) по титрованию приведены в координатах Скэтчарда, где  $v$  — отношение концентраций связанного антибиотика и ДНК,  $[m]$  — концентрация свободного антибиотика в растворе. Наилучшей аппроксимации (сплошная линия) экспериментальных точек в модели «исключенных мест посадки» (см. формулу (2)) соответствуют значения  $K_p = 3,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  и  $\alpha = 4,8$

Рис. 4. Геометрическая модель стэкинг-комплекса антрациклина (тонкие линии) с парой G-C (жирные линии), полученная методом молекулярной механики. Расстояние между плоскостями 3,4 Å, угла между главными осями 73°

В этом случае уравнение изотермы адсорбции в координатах Скэтчарда имеет вид

$$v/[m] = K_p (1 - \alpha v) \left( \frac{1 - \alpha v}{1 - (\alpha - 1)v} \right)^{\alpha - 1}, \quad (2)$$

где  $K_p$  — константа связывания лиганда с ДНК,  $v = [n]/[B_0]$ ,  $\alpha$  — число пар оснований, накрываемых лигандом на ДНК. При  $\alpha = 1$  уравнение 2 переходит в обычное уравнение Скэтчарда. Согласно [8, 9],  $\alpha = 3,5$  и  $K_p = = 7,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  при ионной силе раствора  $\mu = 0,2$ .

На рис. 3 приведена изотерма адсорбции рубомицина на ДНК. Здесь же пунктиром показан расчет по соотношению (2) при  $\alpha = 4,8$  и  $K_p = = 3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  (измерения проведены при  $\mu = 10^{-2}$ ; при  $\mu = 0,2$  значение  $K_p \approx 6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  в хорошем согласии с данными [8, 9]). Видно, что расчет в рамках модели «исключенных мест» [10] хорошо описывает экспериментальные данные. Таким образом, результаты равновесных измерений свидетельствуют, что при взаимодействии рубомицина с ДНК есть только один тип мест связывания.

Другим доводом, говорящим об отсутствии гетерогенности связывания, служат данные кинетических экспериментов для дауномицинона и рубомицина. Как уже указывалось выше, результаты, полученные с помощью разных методов [4–6], свидетельствуют, что при взаимодействии рубомицина с ДНК полициклическая часть молекулы антибиотика интеркалирует между парами оснований. Данные по взаимодействию дауномицинона с ДНК [11] показали, что в этом случае также происходит интеркаляция. Поскольку константа связывания рубомицина с ДНК более чем на порядок превышает ее значение для дауномицинона (при  $\mu = 10^{-2}$ ) и резко убывает с ростом ионной силы [8, 11], можно полагать, что положительно заряженный аминосахарный остаток рубомицина образует дополнительную связь с ДНК, например за счет электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными фосфатами (см., например, [4, 5]), т. е. взаимодействие сахарного остатка с ДНК является неспеци-

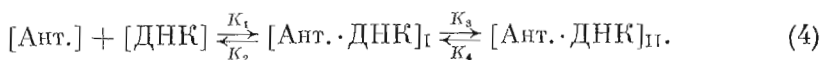
фическим. В то же время гетерогенность связывания определяется специфическим взаимодействием лиганда с различными парами оснований (или их последовательностями в ДНК). Поэтому тот факт, что кинетические кривые связывания дауномицинона с ДНК хорошо описываются одной экспонентой, говорит о существовании одного типа мест посадки антибиотика на ДНК.

б) Согласно работе [12], кинетика связывания лиганда с одномерным полимером является неэкспоненциальной даже для одного типа мест посадки. Это обусловлено тем, что число свободных мест связывания является нелинейной функцией числа связанных молекул. Однако можно полагать, что в условиях наших экспериментов такой эффект не играет существенной роли. Согласно [10], в стационарных условиях среднее число свободных мест связывания описывается выражением

$$[S] = [B_0] (1 - \alpha v) \left( \frac{1 - \alpha v}{1 - (\alpha - 1)v} \right)^{\alpha - 1}. \quad (3)$$

Величина  $v$  изменяется от нуля (при  $t=0$ ) до  $v_\infty$  (при  $t \rightarrow \infty$ ). Очевидно, что максимальное значение  $v_\infty$  равно  $r=0,0125$  (полное связывание рубомицина ДНК), т. е.  $[S]$  изменяется от  $[B_0]$  (при  $t=0$ ) до  $\sim 0,9 [B_0]$ . Поэтому указанным эффектом можно пренебречь и полагать  $[S] \simeq [B_0]$ . Правомерность этого допущения следует также из неизменности формы кинетических кривых при уменьшении  $r$ .

в) *Последовательный механизм связывания.* Учитывая сказанное, для объяснения результатов эксперимента представляется разумным предположить последовательный механизм реакции, включающий в себя стадию взаимодействия аминосохара с сахарофосфатным остовом ДНК:



Для схемы (4), полагая по-прежнему  $[S] \simeq [B_0]$ , найдем обратные величины характерных времен реакции:

$$\lambda'_{1,2} = \frac{\lambda_1}{2} \left[ 1 \pm \left( 1 - \frac{4\lambda_2}{\lambda_1} \right)^{1/2} \right], \quad (5)$$

где

$$\lambda_1 = K_1 [B_0] + K_2 + K_3 + K_4, \quad (6)$$

$$\lambda_2 = \frac{K_2 K_4 + K_1 [B_0] (K_3 + K_4)}{\lambda_1}. \quad (7)$$

Измеряемые величины  $\lambda'_{1,2}$  и параметры  $\lambda_{1,2}$ , фигурирующие в уравнениях (5), (6), связаны простыми соотношениями

$$\lambda_1' + \lambda_2' = \lambda_1, \quad (8)$$

$$\lambda_1' \lambda_2' = \lambda_1 \lambda_2 = K_2 K_4 + K_1 [B_0] (K_3 + K_4). \quad (8')$$

Отношение предэкспоненциальных множителей  $a_j/b_j$  в соотношении (1) равно




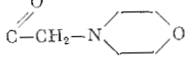
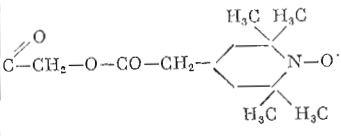
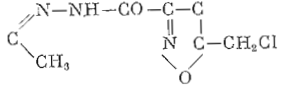
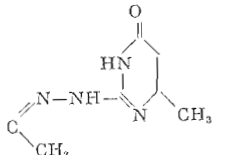
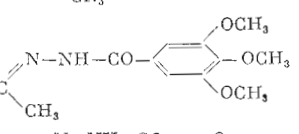
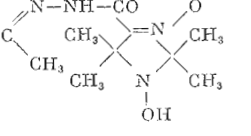
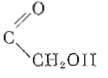


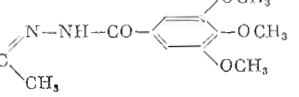
$$a_j/b_j = \frac{K_1 [B_0]_j - \lambda'_{2j}}{\lambda'_{1j} - K_1 [B_0]_j}. \quad (9)$$

При выводе (9) учитывалось, что  $[A_0] \gg [A(\infty)]$ , где  $[A(\infty)]$  — концентрация антибиотика, не связанного с ДНК, при  $t \rightarrow \infty$ .

Наиболее надежно из экспериментальных данных определяется константа скорости  $K_1$ , которую можно найти из измерений  $\lambda_1'$  и из отношения  $a_j/b_j$  при разных  $[B_0]_j$ . Полученные таким образом значения  $K_1$  хорошо совпадают друг с другом. Из величины произведения  $\lambda_1' \lambda_2'$  надежно определяется сумма констант  $(K_3 + K_4)$ . Подставляя ее значение в уравнение (8) и используя значение  $K_1$ , вычисляем константу скорости  $K_2$ . Раздельное определение  $K_3$  и  $K_4$  с помощью уравнений (8) и (8') затруднительно, поскольку оказалось, что величина  $K_2 K_4$  мала по сравнению с  $K_1 [B_0] (K_3 + K_4)$ . Значения  $K_1$  и  $K_2$  приведены в табл. 1.

Значение кинетических констант  $K_1$  и  $K_2$  (см. схему (2))  
для производных антрациклинового ряда (см. рис. 1)

Таблица 1

№	Соединение	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	$10^{-7} \cdot K_1$ , M <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup>	K <sub>2</sub> , с <sup>-1</sup>
1	Дауномицинов (агликон)	OCH <sub>3</sub>		0,11±0,03 *	55±13
2	Рубомицин	OCH <sub>3</sub>		2,4±0,6	124±45
3	Дигидрорубо- мицин	OCH <sub>3</sub>		1,8±0,5	68±23
4	14-Морфоли- нилрубоми- цин	OCH <sub>3</sub>		2,8±0,8	43±17
5	P-105	OCH <sub>3</sub>		1,6±0,5	83±26
6	Рубозамин	OCH <sub>3</sub>		1,7±0,6	57±19
7	Рубоуразин	OCH <sub>3</sub>		1,7±0,6	66±19
8	Рубометоксин	OCH <sub>3</sub>		1,9±0,7	80±22
9	Рубозол	OCH <sub>3</sub>		1,0±0,3	62±18
10	Адриамицин	OCH <sub>3</sub>		2,1±0,7	96±25
11	Карминомицин	ОН		2,3±0,7	112±32
12	13-Дигидрокар- миномицин	ОН		1,9±0,5	72±21
13	Карминометоксин	ОН		2,2±0,6	74±22

Рассмотрим теперь, каким физическим процессам могут соответствовать отдельные стадии в схеме реакций (4). Возможны два варианта:

1) на первой стадии происходит фиксация антибиотика за счет образования связи между аминсахаром и ДНК, на второй агликон антибиотика интеркалирует между парами оснований;

2) вначале происходит интеркаляция, затем образовавшийся комплекс дополнительно стабилизируется за счет взаимодействия между сахарным остатком рубомицина и фосфатами ДНК.

В нашей предыдущей работе [11] было показано, что тушение флуоресценции рубомицина при связывании с ДНК объясняется образованием комплекса с переносом заряда в результате интеркаляции хромофора антибиотика между парами оснований ДНК. Тогда, при варианте (1) молекулы рубомицина, находящиеся в растворе и образовавшие комплекс  $[\text{Ант.} \cdot \text{ДНК}]_I$ , имеют близкие квантовые выходы флуоресценции. Отношение концентраций двух типов комплексов  $[\text{Ант.} \cdot \text{ДНК}]_I / [\text{Ант.} \cdot \text{ДНК}]_{II} = K_{p2} = K_3 / K_4 = K_p / K_{p1} - 1 \approx 14$  ( $K_{p1} = K_1 / K_2$ ), т. е. даже в условиях полного связывания антибиотика мы можем наблюдать тушение его флуоресценции в 14 раз, тогда как в эксперименте интенсивность свечения рубомицина при связывании с ДНК уменьшается более чем в 50 раз [11, 13]. В том же случае, когда хромофор антибиотика на первой стадии реакции интеркалирует в ДНК (вариант 2), обоим типам комплексов отвечает интеркалированное состояние рубомицина, что объясняет наблюдаемое в эксперименте тушение флуоресценции антибиотика при связывании с ДНК.

Таким образом, экспериментально определяемые константы скорости  $K_1$  и  $K_2$  характеризуют процесс интеркаляции рубомицина в ДНК. Поскольку, как уже указывалось выше, для всех исследованных в работе соединений были получены качественно сходные результаты, естественно считать, что схема реакций (4) справедлива не только для рубомицина, но и для остальных исследованных производных. Значения  $K_1$  и  $K_2$  для изученных веществ суммированы в табл. 1.


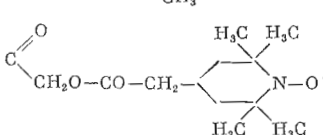
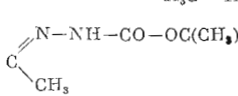
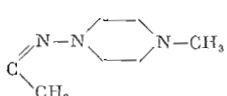
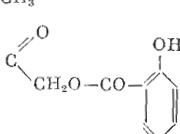



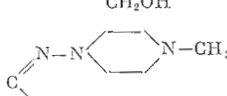
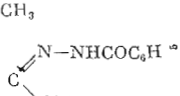

Из данных табл. 1 следует, что введение в положение С9 заместителей, даже значительно различающихся по своей молекулярной структуре, слабо сказывается на процессе интеркаляции. Этот результат становится понятным в свете данных работ [14, 15] по структуре комплекса рубомицина с ДНК (рис. 4), согласно которым кольцо А молекулы лиганда экспонировано в большой желоб ДНК и связь определяется в основном взаимодействием колец В и С молекулы антибиотика с парами оснований ДНК. Такая структура комплекса объясняет также близкие значения констант скорости интеркаляции для рубомицина и карминомицина, которые различаются заместителями в положении С4.

Вывод о слабом влиянии заместителей в положении С9 на процесс взаимодействия антрациклинов с ДНК, который следует из данных кинетических измерений (табл. 1), согласуется с результатами равновесных измерений констант связывания различных производных антрациклинового ряда с ДНК. Результаты измерений  $K_p$  по данным работ [16, 17] суммированы в табл. 2. Сопоставление данных табл. 1 и 2 показывает, что вещества, имеющие близкие значения  $K_1$  и  $K_2$ , характеризуются и близкими значениями  $K_p$  ( $K_p = K_1 / K_2 \cdot (1 + K_3 / K_4)$  для реакций (4)), т. е. константы  $K_3$  и  $K_4$  изменяются незначительно при варьировании заместителей в указанных положениях. Это представляется вполне естественным, поскольку исследовались соединения с одним и тем же аминсахарным остатком.

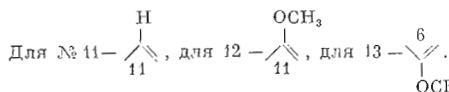
#### *Расчет потенциальной энергии взаимодействия соединений антрациклинового ряда с парами оснований ДНК*

Для оценки влияния заместителей в положении С9 и С4 на процесс интеркаляции был проведен модельный расчет энергии межмолекулярного взаимодействия ( $E_{mv}$ ) агликонов ряда соединений антрациклинового ряда с парой оснований G·C. Мы провели расчет энергии взаимодействия с одной парой оснований, так как учет взаимодействия со второй парой в стэкинг-комплексе, приводящее к значительному усложнению расчета, качественно не изменяет выводов. При расчете использовали молекулярную геометрию комплекса, которая была определена для рубомицина по данным рентгеноструктурного анализа [14] и подтверждена поздние результаты ЯМР [15]. Расчет  $E_{mv}$  проводили по методу молекулярной механики с парными атом-атомными потенциалами. Электростатический вклад в  $E_{mv}$  учитывали при помощи кулоновского потенциала для точеч-

Константы связывания  $K_p$  (каж) антрациклиновых производных с ДНК\* (см. рис. 1)

№	Соединение	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	$K_p$ (каж): ·10 <sup>-2</sup> , M <sup>-1</sup>
1	Рубомицин С	OCH <sub>3</sub>		1,8
2	P-105	OCH <sub>3</sub>		2,4
3	Бутоксикарбонил-гидразон рубомицина	OCH <sub>3</sub>		1,55
4	Метилпиперазинилимнорубомицин	OCH <sub>3</sub>		5,8
5	14-Салицилокси-рубомицин	OCH <sub>3</sub>		0,9
6	Карминомицин	ОН		1,1
7	13-Дигидрокарминомицин	ОН		1,6
8	14-Оксикарминомицин	ОН		0,6
9	Метилпиперазиниламинокарминомицин	ОН		2,3
10	Бензоилгидразон карминомицина	ОН		2,6
11	11-Дезоксирубомицин	OCH <sub>3</sub>		1,9
12	Рубомицин-11-метилловый эфир			9·10 <sup>-2</sup>
13	Рубомицин-6-метилловый эфир			3,5·10 <sup>-2</sup>
14	Рубомицин (daunorubicin)			15,4

\* Данные табл. 2 взяты для веществ 1—10 из [16], 11—14 — из [17].



Сравнивать константы связывания можно только для ряда антрациклинов, исследованного одними авторами, разброс значений констант даже для одного антибиотика — рубомицина, определяемых в разных работах (см., например, [8]), оказывается слишком велик.

Значения  $E_{\text{мв}}$  пары оснований G-C с различными антрациклонами

№	Соединение	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	$E_{\text{мв}}$ , ккал/моль
1	4-Дезметокси-13-дезацетилдауномицинон	H	H	-28,72
2	Карминомицинон	OH	COCH <sub>3</sub>	-30,31
3	Дауномицинон	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	-31,11
4	Адриамицинон	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> OH	-31,17
5	14-Дауномицинонбензоат	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OCOC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-31,32
6	14-Дауномициноннафтацетат	OCH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> OCOC <sub>10</sub> H <sub>7</sub>	-31,37

ных зарядов. Эффективные заряды на атомах для каждого из компонентов комплекса (пары G-C и антибиотика) определяли по методу CNDO/2 [18].

Молекулярная геометрия рубомицина и карминомицина хорошо изучена экспериментально [19, 20] и теоретически [21, 22]. Геометрия пары G-C была выбрана такой, как в структуре в ДНК. Оптимизацию геометрии комплекса проводили при помощи минимизации потенциальной энергии межмолекулярного взаимодействия по методу Хука-Дживса [23]. Оптимизированная геометрия комплекса оказалась очень близкой к найденной экспериментально в работе [14] (рис. 4).

В табл. 3 приведены расчетные значения  $E_{\text{мв}}$  для рубомицина и некоторых его производных по положению C9 и C4, а также для карминомицина и адриамицинона. Из данных табл. 3 следует, что существенные изменения природы заместителя в положении C9 очень слабо сказываются на энергии «гидрофобного связывания» ароматической части хромофора (кольца B и C) с основаниями ДНК при интеркаляции: увеличение молекулярного размера заместителя понижает энергию примерно на 0,1 ккал/моль (менее 1%) на каждые дополнительные 5–6 атомов. При введении заместителей в положение C4, т. е. при переходе от дауномицинона к карминомицинону и 4-дезметоксидауномицинону, абсолютная величина  $E_{\text{мв}}$  также изменяется незначительно и это не может привести к заметным изменениям констант скорости интеркаляции, что подтверждается данными табл. 1. Однако данное изменение (~1 ккал/моль) на порядок больше, чем для производных, различающихся только заместителями в положении C9.

Значительно более существенные изменения в константах связывания антрациклиновых антибиотиков с ДНК наблюдали в работе [17] при замещениях в положениях C6 и C11 (см. табл. 2). Следует отметить, что уменьшение констант связывания в данном случае непосредственно коррелировало с противоопухолевой активностью: в случае 11-дезоксипроизводной противоопухолевая активность уменьшалась, а метилирование приводило к полной потере активности. Эффект метилирования можно объяснить появлением дополнительных стерических затруднений для процесса интеркаляции при замене протона на метильную группу. С другой стороны, в случае 11-дезоксипроизводной, очевидно, сказывается влияние замещения на электронную, в частности  $\pi$ -электронную, структуру ароматической части молекулы агликона, так как при этом удаляется атом кислорода, содержащий  $\pi$ - и  $n$ -электроны. Предположение о существенном влиянии  $\pi$ -электронной структуры на константы интеркаляции антрациклинов было высказано в теоретической работе [21] и подтверждается данными спектральных измерений [11], согласно которым сильное уменьшение квантового выхода флуоресценции (более чем в 50 раз) рубомицина и его агликона при интеркаляции обусловлено межплоскостным взаимодействием хромофора с парами оснований ДНК. Механизм этого взаимодействия не установлен. Перечисленные факты показывают, что требуется дальнейшее исследование электронной структуры комплекса антрациклиновых антибиотиков с ДНК с целью более глубокого понимания его структуры.



Следует также отметить, что существенное влияние на процесс образования комплекса антрациклинов с ДНК оказывает сахарный остаток. Как видно из данных табл. 1, величина  $K_1$  для рубомицина на порядок больше, чем для его агликона. Поскольку в настоящее время синтезированы производные антрациклинов с различными сахарными остатками, представляет несомненный интерес исследовать влияние этих замещений на связывание с ДНК и транспорт через мембрану. Таким образом, экспериментальные данные в согласии с результатами расчета убеждают в малом влиянии заместителей в положении С9 на связывание соединений антрациклинового ряда с ДНК. Поэтому для таких веществ корреляцию структура — активность на клеточном уровне следует искать в первую очередь на уровне транспорта антибиотиков через цитоплазматическую и ядерную мембраны.

Авторы благодарят А. Б. Шапиро (ИХФ АН СССР) и Л. С. Поварова (ВНИИ по изысканию новых антибиотиков АМН СССР), любезно предоставивших вещества для испытаний.

### Экспериментальная часть

Измерения проводили в трис-НСI-буфере (10 мМ), рН 7,2, содержащем 5 мМ EDTA, 0,01 М NaCl, приготовленном на бидистиллированной воде. Использовались хроматографически чистые препараты соединений антрациклинового ряда\*. ДНК получена из спермы лосося, содержание белка не превышало 1,1% (по Лоури), гиперхромный эффект составлял 34%. Перед экспериментами ДНК осветляли центрифугированием (100 000g, 50 мин).

Оптическое поглощение растворов определяли на спектрофотометре Duosrac-203 (Франция). Кинетику связывания лигандов с ДНК регистрировали по затуханию интенсивности их флуоресценции после смешения растворов. Измерения проводили на приборе Stopped-Flow RA 401 (Франция) с временем смешения 0,5 мс. Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 425 нм — в изобестической точке спектров поглощения свободных и связанных с ДНК лигандов. Кинетические кривые для каждой концентрации ДНК усредняли по результатам не менее пяти измерений.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Anthracyclines in cancer chemotherapy. In: Symposium on doxorubicin and related drugs in anticancer chemotherapy/Eds Beretta C., Garin A. M., Perevodchikova N. I., Praga C., Syrkin A. B. Milan: Farmitalia carlo erba, 476 p.
2. Противораковый антибиотик карминомицин и его применение в клинике/Ред. Гаузе Г. Ф. М.: Изд-во АМН СССР, 1980, с. 104.
3. Дудник Ю. В., Останина Л. Н., Козьян Л. П., Гаузе Г. Г. Антибиотики, 1974, т. 49, № 6, с. 514—517.
4. Arcamona F. In: Doxorubicin/Ed. Harcourt B. I. N.Y.: Acad. Press, 1981, v. 17, p. 103—112.
5. Calendi E., Di Marco A., Reggiani M., Scaprinato B., Valentini L. Biochim. et biophys. acta, 1965, v. 103, № 1, p. 25—49.
6. Zunino F., Di Marco A., Zaccara A. Chem. biol. interaction, 1979, v. 24, № 2, p. 217—225.
7. Skovsgaard T., Nissen N. I. Pharmacology therapeutic, 1982, v. 21, № 3, p. 293—311.
8. Chaires J. B., Dattagupta N., Crothers D. M. Biochemistry, 1982, v. 21, № 1, p. 3933—3940.
9. Schütz H., Golimik F. A., Stutter E. Stud. biophys., 1979, v. 75, № 2, p. 147—149.
10. Mc Ghee J. D., von Hippel P. H. J. Mol. Biol., 1974, v. 86, № 2, p. 469—489.
11. Баранов Е. П., Брикенштейн В. X., Дмитриевская Т. В., Барейбойм Г. М. Антибиотики, 1984, т. 29, № 3, с. 208—214.
12. Stutter E., Förster W. Stud. biophys., 1979, v. 75, № 3, p. 199—208.
13. Johnston F. P., Jorgenson K. F., Lin C. C., Van de Sande J. H. Chromosoma, 1978, v. 68, № 2, p. 115—129.
14. Quigley G. J., Wang A. H. J., Ughetto G., Van der Marel G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 12, p. 7204—7208.
15. Patel D. J., Kozlowski S. A., Rice J. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 6, p. 3333—3337.

\* Препараты 5—9, 13 (табл. 1) получены из ИХФ АН СССР, препараты 1—4, 10—12 — из ВНИИ по изысканию новых антибиотиков АМН СССР.

16. Дудник Ю. В. Исследование механизмов действия противоопухолевых антибиотиков – ингибиторов синтеза нуклеиновых кислот. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.: ВНИИ по изысканию новых антибиотиков АМН СССР, 1979. 30 с.
17. Quadrioglio F., Ciana A., Manzini G., Zaccara A., Zunino F. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1982, v. 4, № 7, p. 413–418.
18. Pople J. A., Beveridge D. L. In: *Approximate molecular orbital theory*/Eds Hume D. N. N. Y.: Mc-Graw-Hill, 1970, p. 85–127.
19. Angiuli R., Foresti E., Sanseverino R. *Nature New Biol.*, 1971, v. 234, № 1, p. 78–79.
20. Van Dreele R. B., Einck J. J. *Acta crystallogr., Sect. B*, 1977, v. 33, № 15, p. 3283–3288.
21. Бушелев С. Н., Грикина О. Е. *Журн. физ. химии*, 1984, т. 54, № 3, с. 661–664.
22. Nakato Y., Hopfinger A. J. *FEBS Lett.*, 1980, v. 117, № 1, p. 259–264.
23. Химмельблау Д. *Прикладное нелинейное программирование*. М.: Мир, 1975, с. 393.

Поступила в редакцию  
10.X.1984

## INFLUENCE OF MOLECULAR STRUCTURE ON THE ANTRACYCLINE DRUGS INTERCALATION IN DNA

BRIKENShteIN V. Kh., BARANOV E. P., PITINA L. R.,  
BUSHELEV S. N. \*

*Research Institute for Biological Testing of Chemical Compounds,  
Курган, Moscow Region; \* M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Kinetics of interaction of rubomycin, carminomycin, and their C9-analogues with deoxyribonucleic acid have been studied by the stop – flow method. Possible reasons of nonexponentiality of the kinetic curves are discussed. The rate constants of direct and reverse intercalation of the drugs between DNA base pairs were determined and relatively small differences found for various drugs. These data and of equilibrium binding studies of interaction of the antibiotics and their analogs with DNA led to conclusion that C9-modification of anthracyclines has little effect on the binding process. That was confirmed by quantum-mechanic calculations of potential energy of interaction between various anthracycline aglicones and DNA base-pairs.