

# ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼ ՍԱՐԱՆ

## ԱՄԻՐԲԵԿՅԱՆ ԿԱՐԵՆ ՅՈՒՐԻԿԻ

HOECHST 33258-Ի ԵՎ ԴՐԱՆՈՐ ԱՃԱՆՑՅԱԼ ՆԵՐԻ ՀԵՏ ԴՆԹ-Ի  
ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒ ԹՅԱՆ ՖԻԶԻԿԱՔԻՄԻԱԿԱՆ  
ՈՒՍՈՒ ՄԼԱՍԻՐՈՒ ԹՅՈՒՆԸ

### ԱՏԵՆԱԿՈՍՈՒ ԹՅՈՒՆ

Բ.00.04. – «Ֆիզիկական քիմիա» մասնագիտությունը ամբ

քիմիական գիտությունը և ներքին թեկնածուի

գիտական աստիճանի հայցման

Գիտական ղեկավար՝

քիմ. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Շ.Ա. Մարգարյան

ԵՐԵՎԱՆ 2016

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒ ԹՅՈՒՆ

**ՆԵՐԱՃՈՒ ԹՅՈՒՆ**

.....4

**ԳԼՈՒԽ1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ**

1.1. Դեզօքսիռիբոնոլ կլ եինաթթվի (ԴՆԹ)

կառուցվածքը .....8

1.2. Դիմեթիլ սուլֆօքսիդի քիմիական կառուցվածքը, հատկությունները և կենսաաթժշկական

նշանակությունը .....12

1.3. Hoechst 33258-ի կառուցվածքը և կիրառման

նկրտները .....15

1.4. Hoechst 33258-ի ածանցյալների կիրառումը տարբեր

կենսաաթիմիական

հետազոտություններում .....32

**ԳԼՈՒԽ2. ՓՈՐՁԱՐԱՐԱԿԱՆ ՄԱՍ**

2.1. Օգտագործված նյութերը

.....37

2.2. Օգտագործված մեթոդները եվ փորձարարական տեխնիկան

.....38

2.2.1. Էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիա

.....38

2.2.2. Ֆլուորեսցենսային սպեկտրոսկոպիա

.....39

2.2.3. Էլեկտրոնային կլանման և ֆլուորեսցենսային

սպեկտրոսկոպիաների կիրառությունը ԴՆԹ-ի ջերմային հալման  
նստմնասիրություններում .....42

2.2.4. Շրջանային դիքրոիզմի

սպեկտրոսկոպիա.....43

2.2.5. Մոլեկուլային դոքիմիա

մեթոդը .....46

2.2.6. Ֆլուորեսցենսային անիզոտրոպիայի

հիմունքները .....49

**ԳԼՈՒԽ3. ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ**

3.1. Hoechst 33258-ԴՆԹ կոմպլեքսի կայունությունը ուսումնասիրությունը ԴՄՍՕ-ի առկայությունը.....	52
3.2. ԴՆԹ-էթիդիումի բրոմիդի փոխազդեցությունը ուսումնասիրությունը Ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի միջոցով.....	55
3.3. Hoechst-ի նորածանցյալների կառուցվածքը և տարբեր ԴՆԹ-ների հետդրանց փոխազդեցությունը ուսումնասիրման համար կիրառված մեթոդները.....	60
3.4. ԴՆԹ-ի նկատմամբ Hoechst-ի նորածանցյալների խնամակցությունը ուսումնասիրությունը Էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի միջոցով.....	61
3.5. Պոլի[d(A-T) <sub>2</sub> ]-ի հետկապման ուսումնասիրությունը.....	65
3.6. Սպեկտրային տվյալներ՝ կիրառված կապման հաստատունների որոշման համար.....	68
3.7. Ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի չափումները.....	79
3.8. Ջերմային հալման չափումները.....	83
3.9. Շրջանային դիֆրոիզմի սպեկտրոսկոպիական չափումները.....	86
3.10. Տեսական մոլեկուլային մոդելավորման հետազոտությունները, մոլեկուլային դոքիմենտ.....	88
<b>ԵԶՐԱԿԱՑՈՒ ԹՅՈՒՆՆԵՐ</b> .....	93
<b>ՕԳՏԱԳՈՐԾՎԱԾ ՀԱՊԱՎՈՒՄՆԵՐԸ</b> .....	94
<b>ՆԱԼՈԹՈՒ ԹՅՈՒՆ</b> .....	95
<b>ԳՐԱԿԱՆՈՒ ԹՅՈՒՆ</b> .....	96

## Ն Ե Ր Ա Ն ՈՒ Թ Յ ՈՒ Ն

### Թեմայի արդիականությունը

Դեզօքսիռիբոկուկլետինաթթվի (ԴՆԹ-ի) տարբեր հատվածներին կապվող հետերոցիկլիկ միացությունների հետազոտությունները ներկայումս գտնվում են բազմաթիվ լաբորատորիաների ու շաղրուղյան կենտրոնում: Այսպիսի հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ որոշ միացություններ կարող են ազդել գենային արտահայտման վրա՝ արգելակելով կարգավորող սպիտակուցների կապումը ԴՆԹ-ին [1]: Գեների էքսպրեսիայի կառավարումը խթանեց մի շարք նոր հետերոցիկլիկ միացությունների սինթեզը և ԴՆԹ-ի հետ դրանց կապման հետազոտությունները: ԴՆԹ-ի փոքր ակոսներին կապվող լիգանդները, ինչպիսին են Hoechst 33228-ը, դիստիմիդինը, տրիպիրոլ պեպտիդը և այլն, կապվում են ԴՆԹ-ի փոքր ակոսների հետ առնվազն չորս ադենին-թիմին հիմնային զուգեր պարունակող հատվածներում [2]: ԴՆԹ-ի այն հատվածները, որոնք հարուստ են ադենին-թիմին հիմնային զուգերով, կարևոր դեր են կատարում էուկարիոտ օրգանիզմների (բույսերի և կենդանիների) գենոմի ձևավորման տարբեր փուլերում: Դրանք կարգավորում են նաև այդ գենոմի տարբեր ֆունկցիաները:

Նշված երևույթները կարելի է ուսումնասիրել մի շարք սպեկտրոսկոպիական մեթոդներով, որոնցից կարելի է նշել ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիան: Քանի որ նշված լիգանդները ունեն ֆլուորեսցենցելու հատկություն և մեծ զգայունություն շրջապատի փոփոխությունների նկատմամբ, ապա, հետևելով դրանց ֆլուորեսցենտային հատկությունների փոփոխությանը, կարելի է քանակապես նկարագրել ԴՆԹ-ի, ռիբոնուկլետինաթթվի (ՌՆԹ-ի), ռեպլիկացիային մասնակցող տարբեր սպիտակուցների հետ կատարվող փոփոխությունները: Վերջին տարիներին մեծ ուշադրություն է դարձվում ԴՆԹ-ի հետ տարբեր կառուցվածք ունեցող ֆլուորեսցենտային միացությունների կապման ուսումնասիրությանը: Այս հետազոտությունները թույլ են տալիս տեղեկություն ստանալ ԴՆԹ-ում ազոտային հիմքերի հաջորդական

դասավորության մասին, ԴՆԹ-ում վնասվածքների առկայության մասին և կատարել քանակական հետազոտություններ ԴՆԹ-ում ադենին-թիմին և գուանին-ցիտոզին հիմքերի պարունակության որոշման համար: Նշված լիզանդերից լայնորեն ուսումնասիրված է Hoechst 33258-ը, որը հանդիսանում է \$Լ ուրեցենտային նշանակիր և արտենցյալ հակաքաղցկեղային դեղամիջոց: Hoechst 33258-ի հետ կատարված ուսումնասիրությունները ցույց են տալիս, որ այն օժտված է ԴՆԹ-ի հետ կապման հաստատունի մեծ արժեքով և ունի արտահայտված բարձր խնամակցություն ԴՆԹ-ի ադենին և թիմին ազոտային հիմքերի նկատմամբ: Գրականության մեջ քիչ է ուսումնասիրված ԴՆԹ-Hoechst 33258 փոխազդեցությունը ջուր-օրգանական խառը լուծիչներում: Միևնույն ժամանակ կարևոր է նշել գրականության մեջ հայտնի և բազմակողմանիորեն ուսումնասիրված \$Լ ուրեցենտային նշանակիր էթիդիոլմի բրոմիդի և ԴՆԹ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը: Ի տարբերություն Hoechst 33258-ի, էթիդիոլմի բրոմիդը կապվում է ԴՆԹ հետինտերկալյացիոն մեխանիզմով:

Սույն ատենախոսությունը իր մեջ ներառում է Hoechst 33258-ԴՆԹ համակարգի և Hoechst-ի նոր ածանցյալների բազմակողմանի ուսումնասիրությունը Էլեկտրոնային կլանման, \$Լ ուրեցենտային սպեկտրոսկոպիայի, շրջանային սպեկտրոսկոպիայի և տեսական մեթոդների համատեղմամբ: Այն ընդգրկում է նաև ԴՆԹ-էթիդիոլմի բրոմիդ փոխազդեցության ուսումնասիրությունը \$Լ ուրեցենտային անիզոտրոպիայի մեթոդով:

Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս ի հայտ բերել ԴՆԹ-լիզանդ փոխազդեցության առանձնահատկությունները և կարող են կիրառվել` ԴՆԹ-լիզանդ փոխազդեցությունները կառավարելու համար տարբեր մեթոդների մշակման նպատակով:

**Աշխատանքի նպատակը**

Սույն ատենախոսության նպատակն է պարզել ԴՆԹ-Hoechst 33258 փոխազդեցության առանձնահատկությունները առանց դիմեթիլսուլֆոքսիդի (ԴՄՍՕ) և ԴՄՍՕ-ի առկայությամբ

սպեկտրոսկոպիական մեթոդների համատեղմամբ: Աշխատանքի նպատակներից է նաև ԴՆԹ-էթիդիոլմի բրոմիդ փոխազդեցության ուսումնասիրությունը ֆլուորեսցենսային անիզոտրոպիայի մեթոդով: Այնուհետև, աշխատանքը իր մեջ ներառում է Hoechst 33258-ի նոր ածանցյալների և տարբեր ԴՆԹ-ների փոխազդեցության ուսումնասիրությունը և ԴՆԹ-ների նկատմամբ դրանց խնամակցության գնահատումը: Նշված նպատակների իրականացումը հնարավորություն է ընդձեռնում կառավարելու ԴՆԹ-ի գանդ փոխազդեցությունը և թույլ է տալիս նոր մեթոդներ մշակել ԴՆԹ-ի հետ տեղի ունեցող կառուցվածքային փոփոխությունները նվազագույնիս հասցնելու համար:

**Նշված նպատակներին հասնելու համար դրվել են հետևյալ խնդիրները.**

- Ուսումնասիրել ԴՆԹ-ի ջերմային կայունությունը առանց Hoechst 33258-ի (կոնտրոլ) և Hoechst 33258-ի առկայությամբ՝ փոփոխելով լուծույթում ԴՄՍՕ-ի պարունակությունը:
- Տարբեր փորձարարական մեթոդների կիրառմամբ բացահայտել համակարգում գործող միջմոլեկուլային փոխազդեցությունները, որոնք բերում են լուծույթում ԴՆԹ-ի ջերմային կայունության փոփոխությանը:
- Տեսական մեթոդների օգտագործմամբ պարզաբանել Hoechst 33258-ի և ԴՆԹ-ի միջև առկա փոխազդեցությունները, գնահատել Hoechst 33258-ի խնամակցությունը ԴՆԹ-ի նկատմամբ:
- Ուսումնասիրել ԴՆԹ-էթիդիոլմի բրոմիդ փոխազդեցությունը ֆլուորեսցենսային անիզոտրոպիայի միջոցով:
- Ուսումնասիրել Hoechst 33258-ի նոր ածանցյալների փոխազդեցությունը տարբեր ԴՆԹ-ների հետ, որոշել նրանց խնամակցությունը այդ ԴՆԹ-ների նկատմամբ:

**Գիտական նորույթը**

Աշխատանքում առաջին անգամ իրականացվել է ԴՆԹ-ի հետ Hoechst 33258-ի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը ԴՄՍՕ-ի առկայությամբ: Սույն ատենախոսությունը իր մեջ ներառում է

Էթիդիոլմի բրոմիդի և ԴՆԹ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրությանը \$լուորեսցենտային անիզոտրոպիայի մեթոդով: Առաջին անգամ իրականացվել է Hoechst 33258-ի նորածանցյալների փոխազդեցության ուսումնասիրությանը ԴՆԹ-ի հետևորոշվել են նրանց խնամակցությանը ԴՆԹ-ի նկատմամբ:

### **Կիրառական նշանակությունը**

Սույն ատենախոսության տվյալները կարող են կիրառվել այնպիսի կենսաքիմիական հետազոտությանը ներդրում, որտեղ առկա է համակարգը օրգանական հավելանյութերի առկայությանը ուսումնասիրելու անհրաժեշտությունը:

Կատարված հետազոտությունները ի հայտ են բերում ԴՆԹ-ի իզանդ-ԴՄՍՕ համակարգում միջմոլեկուլային փոխազդեցությանը և դիմեթիլսուլֆօքսիդի կենսաքիմիական ազդեցությանը մեխանիզմները: \$լուորեսցենտային անիզոտրոպիայի մեթոդով իրականացված չափումները թույլ են տալիս մշակել նոր մեթոդներ ԴՆԹ-ի իզանդ փոխազդեցությանը ուսումնասիրելու համար: Hoechst 33258-ի նորածանցյալները կարող են կիրառվել ԴՆԹ-ի հետ իրականացվող տարբեր կենսաքիմիական հետազոտություններում:

### **Աղյուցների փորձարկում**

Ատենախոսության մի շարք դրոյթներ ներկայացված են հետևյալ կոնֆերանսներում.

- 4th International Conference of Young Scientists – “CHEMISTRY TODAY - 2014” (August 18-22, 2014, Yerevan).
- Albany 2013, June 11-15, The 18th Conversation, New York, USA.
- ԵՊՀ 90-ամյակին նվիրված գիտաժողովում (Ապրիլ 28-30, 2014, Երևան):

### **Յրատարակումներ**

Ատենախոսության նյութերի հիման վրա հրատարակված են 6 տպագիր աշխատանքներ, այդ թվում 4 հոդված և 2 թեզիս:

### **Ատենախոսության կառուցվածք**

Ատենախոսությունը կազմված է ներածություն, գրականական ակնարկ, փորձարարական մաս, արդյունքները և դրանց քննարկումը,

Եզրակացու թյուրակներ բաժիններից և ներառում է օգտագործված հապավումների և գրականության ցանկը՝ կազմված 85 անուն տպագիր հրատարակումներից:

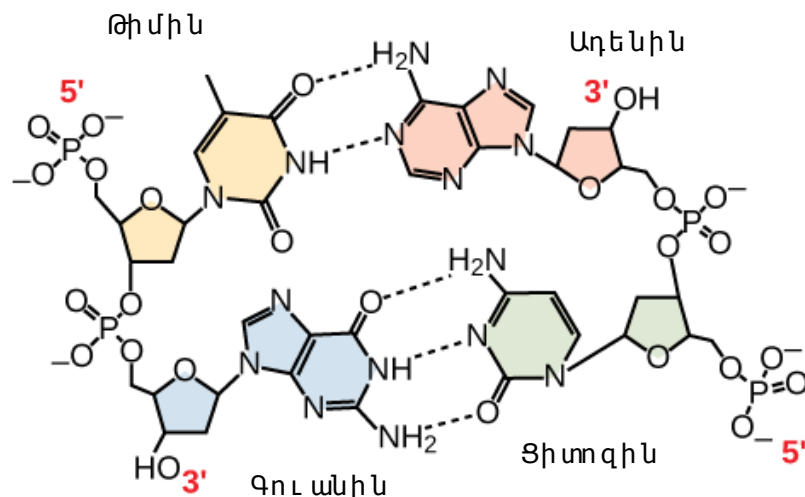
Աշխատանքը շարադրված է 105 էջի սահմաններում, իսկ փորձարարական տվյալները ներկայացված են 63 նկարների և 7 աղյուսակների տեսքով:

## ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

### 1.1. Դեզօքսիռիբոսուկլեինաթթվի կառուցվածքը

Դեզօքսիռիբոսուկլեինաթթուն (ԴՆԹ-ն) յուրահատուկ կառուցվածք ունեցող կենսապոլիմեր է, որը իրականացնում է ինֆորմացիայի պահպանման և փոխանցման դերը կենդանի օրգանիզմներում: Նուկլեինաթթուների կառուցվածքը ընդգրկում է չորս կառուցվածքային մակարդակ՝ առաջնային, երկրորդային, երրորդային, չորրորդային: ԴՆԹ-ի կառուցվածքը բերված է նկ. 1-ում:

ԴՆԹ-ի առաջնային կառուցվածքը ընդգրկում է ֆոսֆոդիէսթերային կապերով իրար միացած նուկլեոտիդների գծային հաջորդականությունը: Նուկլեոտիդները բաղկացած են երեք կառուցվածքային միավորներից՝ ազոտային հիմքերից (ադենին, գուանին, ցիտոզին, թիմին) (նկ. 2), հինգ ածխածնի ատոմ պարունակող դեզօքսիռիբոզ շաքարից և ֆոսֆատային խմբից:

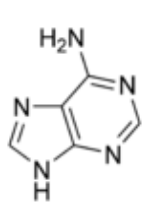


Նկ. 1. ԴՆԹ-ի կառուցվածքը

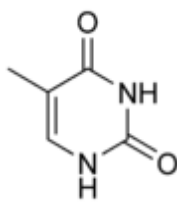
[<https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/biological-macromolecules-3/nucleic-acids-57/the-dna-double-helix-307-11440/>]:



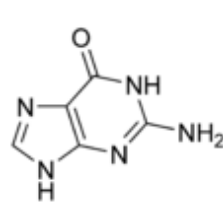
Ադենին և գուանին ազոտային հիմքերը կառուցվածքով պարհինային են և առաջացնում են գլիկոզիդային կապիտենց 9-րդ դիրքի ազոտի ատոմի և դեզօքսիռիբոզի 1'-OH խմբի միջև: Ցիտոզինը և թիմինը պիրիմիդիններ են, ուստի գլիկոզիդային կապն առաջանում է դրանց 1-ին դիրքի ազոտի ատոմի և դեզօքսիռիբոզի 1'-OH խմբի միջև: Թե պարհինային, թե պիրիմիդինային հիմքերի դեպքում ֆոսֆատային խումբը իր մի թթվածնի ատոմով կապվում է դեզօքսիռիբոզ շաքարի 5'-OH խմբի հետեսթերային կապի միջոցով:



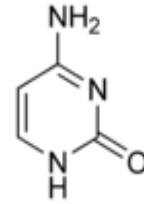
Ադենին



Թիմին



Գուանին



Ցիտոզին

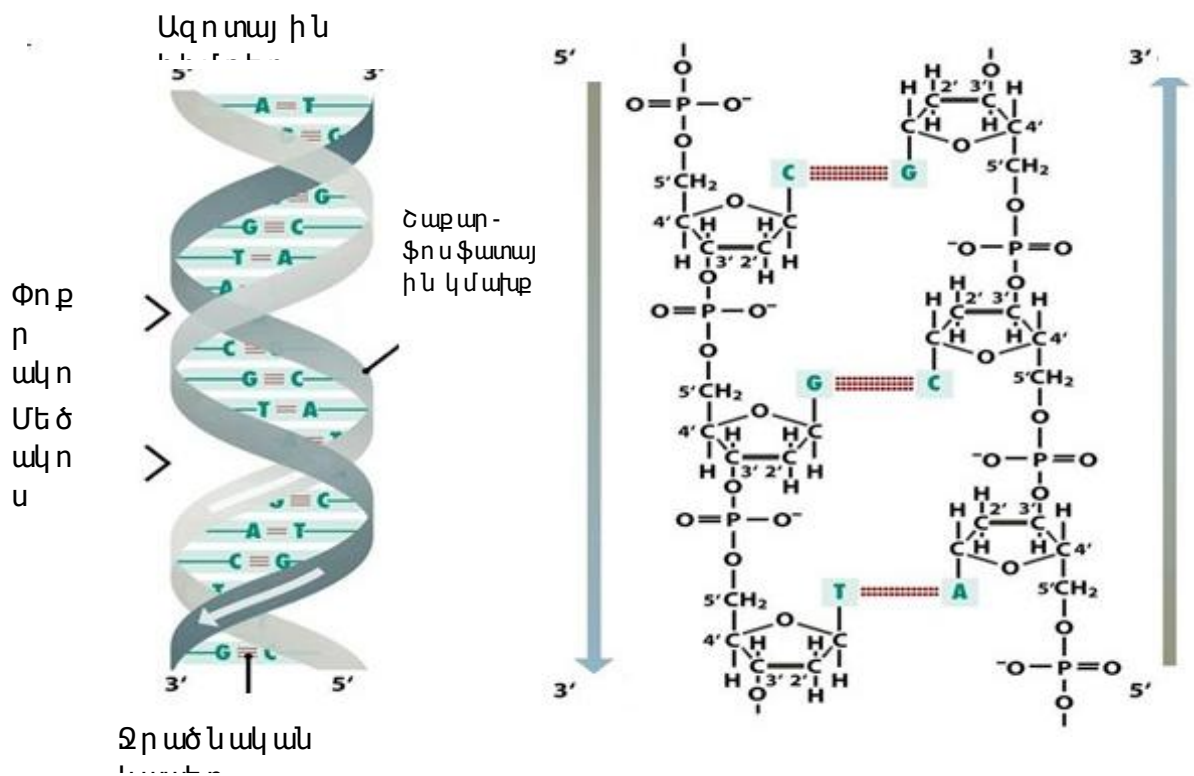
**Նկ. 2.** ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերի կառուցվածքային բանաձևերը:

ԴՆԹ-ի շղթաները փոխադարձ կոմպլեմենտար են՝ ադենինը երկու ջրածնական կապեր է առաջացնում թիմինի հետ, իսկ գուանինը ցիտոզինին է միանում երեք ջրածնական կապերով (Նկ. 3):

Ջրածնական կապերը պայմանավորում են ԴՆԹ-ի երկրորդային կառուցվածքը: ԴՆԹ-ի երկրորդային կառուցվածքը պայմանավորում է այն ձևը, որն ընդունում է նուկլեինաթթուն կենսաբանական միջավայրում: ԴՆԹ-ի երկրորդային կառուցվածքը որոշվում է շղթաները կազմող ազոտային հիմքերի գուապորմամբ: ԴՆԹ-ի երրորդային կառուցվածքը վերաբերում է ատոմների դասավորվածությանը ԴՆԹ-ի տարածական կառուցվածքում: Երրորդային կառուցվածքը ավելի բարձր կարգով կառուցվածք է, քան երկրորդայինը, և դրանում գծային շղթան ծրարվում է տարաբևույթ ձևերով՝ առաջացնելով ԴՆԹ-ի եռաչափ կառուցվածքը: Գոյություն ունեն չորս հատկանիշներ, որոնցով ԴՆԹ-ները կարող են տարբերվել միմյանցից. «ծեռքի պտույտի» կոնֆորմացիա՝ աջ կամ ձախ, պարույրի պտույտի երկարությունը, ամեն մի պտույտում ազոտային հիմքերի թիվը, մեծ և փոքր պոստների չափերի տարբերություններ:

ԴՆԹ-ի երրորդային կառուցվածքից ելնելով՝ տարբերակում են՝ B-, A- և Z-ԴՆԹ-ներ, որոնցից ամենահաճախ հանդիպող և բնության մեջ գերիշխող ձևը B-ԴՆԹ-ն է (որոշ գրական աղբյուրներում Z-ը նշանակվում է նաև C տառով): A-ԴՆԹ-ն ի հայտ է գալիս դեհիդրման պայմաններում: Այն կարճ է և ավելի լայն, քան B ձևը: Z-ԴՆԹ-ն հազվադեպ հանդիպող ձախ ձեռքի պտույտով կրկնակի պարույր է: Այն ունի գերպարուրված, ավելի երկար ձգված կառուցվածք, քան A և B ձևերը:

ԴՆԹ-ի չորրորդային կառուցվածքը բարձր կարգավորվածության ձև է: Այն հատկապես պայմանավորված է այլ մոլեկուլների, մասնավորապես սպիտակուլների հետ փոխազդեցությամբ (օրինակ քրոմատինը, որը կապվում է հիստոն կոչվող փոքր սպիտակուլների հետ):



**Նկ. 3.** ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրը և նրանում առկա մեծ և փոքր ալոսները [http://www.biologyexams4u.com/2013/04/double-helix-dna-model-by-watson-and.html#.V0BdD\_mLTIV]:

ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրում պտտման անկյունը նատիվ վիճակում այնպիսին է, որ հաջորդող հիմնային զույգերը կազմում

են մոտ 36<sup>0</sup> և կրկնակի պարույրի մեկ ամբողջական պտույտը (այսպես կոչված քայլը) պարունակում է 10 հիմնային գույգեր: Այս հեռավորությունը համապատասխանում է 3.4 նմ: Ինչպես երևում է նկ. 3-ից, երկու շղթաները, որոնք ձևավորում են կրկնակի պարույրը, միմյանց լրացնող են (կոմպլեմենտար են) և սադրանցիցյունաբանչյունրին հնարավորություն է տալիս ծառայելու որպես ձևամուշ (շաբլոն) նոր լրացնող շղթայի համար (հայտնի որպես ռեպլիկացիա), որը հաջորդում է բջջի բաժանման ժամանակ երկու բնօրինակ (մայրական) շղթաների առանձնացմանը:

Այժմ հաստատված է, որ յունաբանչյունր գեն կոդավորում է յունահատուկ սպիտակուց, և շատ սպիտակուցներ ունեն ավելի կառուցվածքային, քան ֆերմենտային դեր: Ավելին, գենետիկ ազդանշանը ուղղակիորեն չի օգտագործվում սպիտակուցի կառուցվածքի հրահանգման համար: Փոխարենը այդ ազդանշանը սկզբում փոխանցվում է ազդանշանային ՌՆԹ-ի (ՌՆԹ-ռիբոնուկլեինաթթու) շղթային, և այս փուլը կոչվում է տրանսկրիպցիա: Նշենք, որ ՌՆԹ-ն տարբերվում է ԴՆԹ-ից շաքարային մնացորդով (ՌՆԹ-ում շաքարային մնացորդը ռիբոզն է) և դրանում թիմինը փոխարինված է ուրացիլով: Ուրացիլը կարող է հիմնային գույգեր կազմել ադենինի հետ:

Վերջնական տրանսլյացիայի փուլը ընդգրկում է հիմքերի եռյակներ (հայտնի որպես կոդոններ), որոնք ճանաչվում են սպիտակուցների կողմից (այսպես կոչված ռիբոսոմներ), և այս ճանաչման գործողություններից յունաբանչյունրը ապահովում է լրացուցիչ ամինոթթվի մնացորդի միացման ազդանշան: Վերջինը ամինոթթվի մուեկուլի մնացորդն է, որի ճիշտ տարբերակը ընտրվել է փոխադրող ՌՆԹ-ի շղթայի կողմից և տեղափոխվել է ռիբոսոմի համապատասխան վայրը: Այսպիսի ամեն մի քայլի հետ աճող պրոիպեպտիդային շղթայի երկարությունը մեծանում է մեկ ամինոթթվային մնացորդով:

Կան թվով 20 ամինոթթուներ, որոնցից կարելի է ընտրել, ուստի գենետիկ կոդը, որը կազմված է հիմնային գույգերից, կապահովի ընդամենը 16 տարբեր հնարավորություններ (4<sup>2</sup>), և այսպիսով

կլիներեն նաև ոչ համապատասխան կոդեր: Տրիպլետ կոդը, մյուս կոդմից, կապահովի 64 հնարավորություն (4<sup>3</sup>): Սա ավելին, քան բավական է, և կոդը փաստացի ավելցուկային է, և որոշ ամինոթթուներ կոդավորվում են մեկից ավելի տրիպլետով: Կան նաև երեք տրիպլետներ, որոնք կոդավորում են «դադարը» (stop), որոնք են Ու ԱԱ, Ու ԳԱ և Ու ԱԳ [3]:

Գենետիկ կոդը պատկերող աղյուսակ-դիագրամը բերված է նկ. 4-ում:

Երկրորդ ազոտային հիմքեր

	U	C	A	G
U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG } Stop	UGU } Cys UGC } UGA } Trp UGG } Trp
C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }
A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } Thr ACC } ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Stop AGG } Stop
G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }

Առաջին ազոտային հիմքեր

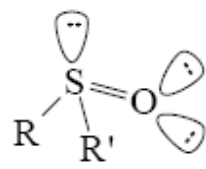
Երրորդ ազոտային հիմքեր

**Նկ. 4.** Ազոտային կոդմբերի եռյակները, որոնք կոդավորում են համապատասխան ամինաթթվային մնացորդները (գենետիկ կոդ)

[<https://sabeerhassan.wordpress.com/2013/01/22/researchers-find-a-hidden-genetic-code/>]:

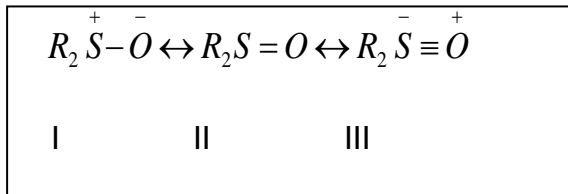
**1.2. Դիմեթիլ սուլֆոբսիդի քիմիական կառուցվածքը, հատկությունները և կենսաբժշկական նշանակությունը**

Սուլֆոբսիդները յուրահատուկ կառուցվածքով և հատկություններով օժտված ծծումբ-օրգանական միացություններ են: Սուլֆոբսիդների ներկայացուցիչները ունեն եռանկյուն բուրգի կառուցվածք: Բուրգի գագաթին գտնվում է ծծմբի ատոմը իր չզույգված էլեկտրոնային զույգով (նկ. 5):



**Նկ. 5.** Սուլֆոբսիդների քառանկյուն կառուցվածքը:

Սուլֆոբսիդները կարող են հանդես գալ երեք կառուցվածքներով (նկ. 6), որտեղ ավելի շատ գերակշռում է II կառուցվածքը.

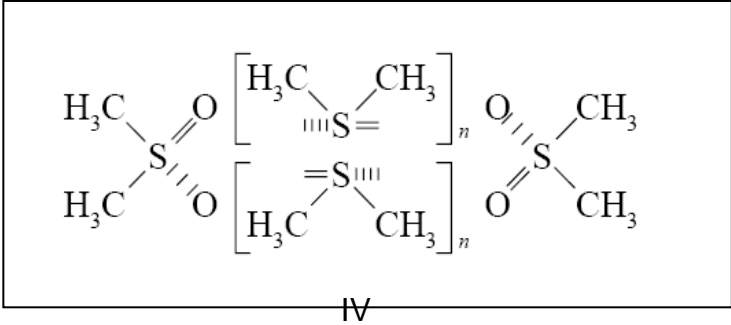


**Նկ. 6.** Սուլի ֆօքսիդների հնարավոր կառուցվածքները

[<https://alexgrinchenko.wordpress.com/2011/02/06/%D0%B4%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BB%D1%81%D1%83%D0%BB%D1%8C%D1%84%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D0%B4/>]

Դրանց կառուցվածքում առկա S=O կրկնակի կապերից մեկը  $\sigma$  կապ է, մյուսը՝  $\pi$  կապ:  $\pi$  կապն առաջանում է շնորհիվ թթվածնի լրացված օրբիտալների և ծծմբի չլրացված օրբիտալների: Դիմեթիլսուլիֆօքսիդի մոլեկուլը խիստ բևեռացված է, և դեպի թթվածնի ատոմն է ուղղված դիպոլի բացասական բևեռը: ԴՄՍՕ-ի ծծմբի ատոմը նուկլեոֆիլ է մեղմ էլեկտրոֆիլների հանդեպ, իսկ թթվածնի ատոմը՝ նուկլեոֆիլ է ուժեղ էլեկտրոֆիլների նկատմամբ:

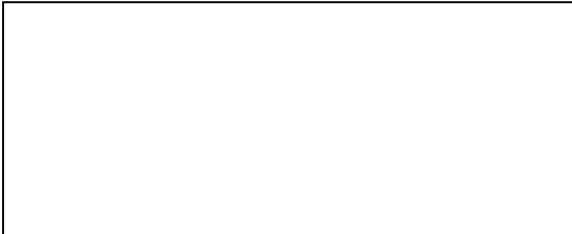
Չետագոտությունները ցույց են տվել, որ ԴՄՍՕ-ում գոյություն ունեն ասոցիատներ, որը պայմանավորված է թթվածնական կապերով (նկ. 7).

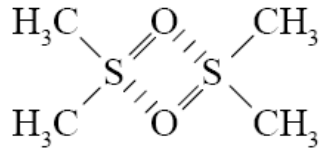


**Նկ. 7.** ԴՄՍՕ-ի ասոցիատների առաջացումը:

[<https://alexgrinchenko.wordpress.com/2011/02/06/%D0%B4%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BB%D1%81%D1%83%D0%BB%D1%8C%D1%84%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D0%B4/>]:

Որոշ իներտ լուծիչներում (օրինակ, տետրաբլորածխածնում), ԴՄՍՕ-ն գտնվում է դիմեր վիճակում թթվածնական կապերի շնորհիվ (նկ. 8):





V

**Նկ. 8.** ԴՄՍՕ-ի մոլեկուլների միջև թթվածնական կապերի առաջացումը:

[<https://alexgrinchenko.wordpress.com/2011/02/06/%D0%B4%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BB%D1%81%D1%83%D0%BB%D1%8C%D1%84%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D0%B4/>]

]:

ԴՄՍՕ-ն պրոտոֆիլային լուծիչ է, այդ պատճառով դրա սոսցիաները կարող են հեշտությամբ քանդվել այնպիսի նյութերի ավելացման ժամանակ, որոնք հանդիսանում են պրոտոնների դոնորներ: Օրինակ, երբ ԴՄՍՕ-ն խառնվում է ջրի հետ, անջատվում է մեծ քանակով ջերմություն, և որոշակի պայմաններում խառնուրդը դառնում է մածուցիկ:

Վերոհիշյալ երևույթները բացատրվում են IV կառուցվածքի քանդմամբ և V կառուցվածքի գոյացմամբ, որտեղ ԴՄՍՕ-ն ջրի մոլեկուլների հետ առաջացնում է ինչպես ջրածնական, այնպես էլ թթվածնական կապեր:

ԴՄՍՕ-ի ցածր թունավոր ազդեցությունը հնարավորություն է տալիս այն օգտագործել որպես լուծիչ կենսաքիմիայում և բջիջների հետ իրականացնող տարբեր հետազոտություններում էքստրակցիայի նպատակով:

ԴՄՍՕ-ն թափանցիկ, անհոտ հեղուկ է, որը մատչելի եղանակով արտադրվում է որպես կողմնակի նյութ թղթի արտադրության ժամանակ: ԴՄՍՕ-ի մեթիլ խմբերը թույլ թթվային են, ուստի դրանում կարելի է որոշել բազմաթիվ թույլ հիմնային օրգանական միացությունների հիմնայնությունը: Այն լավ լուծիչ է: Հայտնի է, որ այն անցնում է կենսաբանական մեմբրանների և արյունատար անոթներով՝ տարածվելով ամբողջ օրգանիզմով:

Կլիսիկական փորձարկումները ցույց են տվել, որ դրա առկայությունը արյունատար անոթներում կարող է օգտակար լինել ամիլոիդոզի բուժման համար, քանի որ այն կարող է դուրս բերել ամիլոիդային մնացորդները հյուսվածքներից տեղափոխելով այն մեզի մեջ: ԴՄՍՕ-ն կիրառվում է մաշկային հիվանդությունների բուժման ժամանակ, քանի որ այն բերում է արագ (բայց ժամանակավոր) ցավազրկման: ԴՄՍՕ-ի հետիրականացված կլիսիկական հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ԴՄՍՕ-ն բարձրացնում է այլ քիմիական միացությունների դիֆուզիան մաշկի միջոցով, և ԴՄՍՕ-ի այս հատկությունը ունի բժշկական մեծ նշանակություն: ԴՄՍՕ-ի հետադարձ բացասական ռեակցիան օրգանիզմի նկատմամբ հիմնականում աննշան է և կապված է բուժման ընթացքում կիրառված ԴՄՍՕ-ի կոնցենտրացիայի հետ: Յետևաբար, ԴՄՍՕ-ի կիրառման դեպքում դիտվող կողմնակի էֆեկտները, հանձինս մաշկի չորացումը, արյունատար անոթների հեմոլիզը, մարսողական համակարգի որոշ խանգարումներ կարող են զգալիորեն կրճատվել՝ կիրառելով ԴՄՍՕ-ի նոսր կոնցենտրացիայով լուծույթներ: Յայտնի է նաև, որ ԴՄՍՕ-ն արդյունավետ միջոց է ռևմատիկ հիվանդությունների բուժման համար [4]:

Այն նաև արդյունավետ սառցապաշտպանիչ է, կանխում է սառցագոյացումը, հետևաբար նաև բջիջների մահանալը սառեցման պրոցեսի ընթացքում, որը թույլ է տալիս այն օգտագործել արյան և տարբեր հյուսվածքների պահպանման համար: Դրանում կարող են պահպանվել փոխադաստման համար պահվող տարբեր օրգաններ: Յատկանշական է, որ ԴՄՍՕ-ն, որպես սառցապաշտպանիչ, կարող է պահպանել արյունը 20-22 օրվա ընթացքում  $-85$ -ից  $-95$  °C ջերմաստիճաններում: ԴՄՍՕ-ի այս հատկությունները ապահովում են դրամեծ դեղագործական և բժշկական կիրառությունը [5]:

### **1.3 Hoechst 33258-ի կառուցվածքը և կիրառման ոլորտները**

Որքան ավելի նոր միացություններ են սինթեզվում և հայտնաբերվում, այնքան ավելի լայնածավալ է դառնում նրանց բազմակողմանի ուսումնասիրման պահանջը: Այն

հետազոտության ունենե՞րը, որոնք ընդգրկում են հատուկ կառուցվածք ունեցող ցածրամոլեկուլային միացությունների և ԴՆԹ-ի միջև փոխազդեցության ուսումնասիրությունը, շարունակում են մնալ բազմաթիվ հետազոտական խմբերի ու շաղրության կենտրոնում:

Նմանատիպ հետազոտությունները մեծ կարևորություն են ներկայացնում գենային էքսպրեսիայի, գենային կարգավորման, մուտացիաների բացահայտման և այլնի համար: Նշված ցածրամոլեկուլային միացություններից առանձնանում են ԴՆԹ-ի փոքր ակոսին կապվող միացությունները, որոնցից են նետրոսպինը [6-12], դիստամիցինը [7, 13-18], Hoechst 33258-ը [19-28] պենտամիդինը [29-32], ԴԱԴԻ-ն (4',6-դիամինո-2-ֆենիլիմիդոլ) [33-37] և այլն:

Hoechst 33258-ը հանդիսանում է ԴՆԹ-ի փոքր ակոսին կապվող հայտնի լիգանդ և \$L ու որոշ ցենտային նշանակիր, որը լայնորեն կիրառվում է կենսաքիմիական, կենսաբանական և բժշկական նպատակներով ԴՆԹ-ն \$L ու որոշ ցենտային եղանակով «տեսանելի» դարձնելու համար: Այն ունի հատուկ կիրառություն \$L ու որոշ ցենտային միկրոսկոպիայում և իմունոքիմիայում, հաճախ կիրառվելով այլ \$L ու որոշ ֆորմերի հետ համատեղ:

Hoechst 33258-ը և նրա հոմոլոգները (Hoechst 33342-ը) ավելի քիչ թունավոր են, քան ԴԱԴԻ-ն, որը ապահովում է Hoechst նշանակրով կապված բջիջների կենսահամատեղելիությունը:

Hoechst 33258-ը կիրառվում է հոսքային ցիտոմետրիայում բջիջները հաշվելու կամ առանձնացնելու համար: Որպես օրինակ հանդիսանում է Hoechst 33258-ի օգտագործումը՝ քանակապես որոշելու համար թե պոպուլյացիայի որքան բջիջներն են առկա տվյալ բջջային ցիկլում [21]: Այն կիրառվում է ԴՆԹ-ն ՌՆԹ-ի առկայության դեպքում տարբերակելու համար՝ կիրառելով ազարոզային գել-էլեկտրաֆորեզի եղանակը, քրոմոսոմային տարբերակման մեջ [25], և ԴՆԹ-ի ավտոմատացված որոշման ժամանակ [28].

Հիմնվելով էլեկտրոնային կլանման և \$L ու որոշ ցենտային սպեկտրոսկոպիայի արդյունքների վրա, Ջոբսի կախվածությունները (կլանման և առաքման կախվածությունը



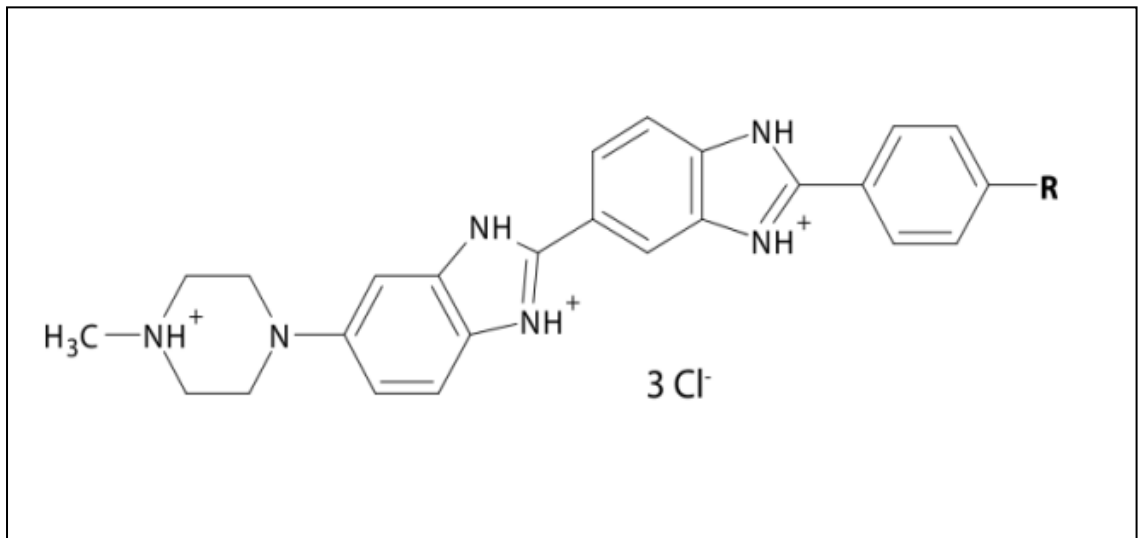
լիզանդի մոլային բաժնից) բացահայտում են փոխազդեցության չորս տիպեր, որոնք են. ազոտային հիմքերի հաջորդականությամբ պայմանավորված կապում (յուրահատուկ փոխազդեցություններ), լիցքերով պայմանավորված կապում (ոչ յուրահատուկ փոխազդեցություններ), լիզանդների փոխազդեցությամբ պայմանավորված կապում, և ԴՆԹ-ի կառուցվածքով պայմանավորված կապում [38]:

Hoechst 33258 նշանակիրը (2'-(4-հիդրօքսիֆենիլ)-5-(4-մեթիլ-1-փափերազիլ)-2, 5'-բի-1H-բենզիմիդազոլ) (նկ. 9), առաջին անգամ սինթեզվել է Hoechst դեղագործական ընկերության կողմից կենսաբանական կիրառությունների նպատակով: Այն վառ ֆլուորոքրոմոֆոր է, երբ կապվում է կրկնակի պարուրված ԴՆԹ-ի ադենին և թիմին հիմքերով հարուստ մասերի հետ:

Hoechst-ի ֆլուորոքրոմոֆորային առաքման հատկությունները կիրառվում են՝ որոշելու համար ադենին-թիմին ազոտային հիմքերի պարունակությունը ԴՆԹ-ում [39], և այս հաջորդականությունների հետկապումը ընդունված է անվանել որպես յուրահատուկ կապում:

Hoechst 33258-ի կլանման և շրջանային դիֆրոհմի սպեկտրները ադենին-թիմին հիմքերով հարուստ ԴՆԹ-ների հետ տարբերվում են նշված հիմքերով աղքատ ԴՆԹ-ի հետ կապման սպեկտրներից [23, 40, 41]: Պայմանավորված այս տարբերությամբ՝ նշված կապումը անվանվում է ոչ յուրահատուկ:

Hoechst-ի և դրա ածանցյալների քիմիական կառուցվածքը բերված է նկ. 9-ում:



**Նկ. 9.** Hoechst 33258-ի (R=OH) և դրա ածանցյալների կառուցվածքը:

Hoechst 33258-ի ոչ յուրահատուկ կապումը բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում կապված է յուրահատուկ եղանակով կապված մոլեկուլների ֆլուորեսցենցիայի մարման հետ [2, 23, 24, 40]: Յետազոտությունները ցույց են տվել, որ իոնական ուժի մեծացումը հանգեցնում է «ոչ յուրահատուկ» կերպով կապված մոլեկուլների դիսոցմանը, մինչդեռ այն ազդում է «յուրահատուկ» կերպով կապված մոլեկուլների կապման վրա [23, 24]: Յետաքրքիր է նշել, որ էթանոլի փոքր քանակությունը վերացնում է ոչ յուրահատուկ կապումը [2]: Ցույց է տրվել, որ B-ԴՆԹ-ում չորս ազոտային հիմքերի խմբում առնվազն երեք ադենին-թիմին խմբերի առկայությունն է նպաստում յուրահատուկ կապմանը ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում [42]: Տարածական գործոնների տեսանկյունից 2-ամինոխմբի առկայությունը խոչընդոտում է Hoechst-ի մոլեկուլի կապմանը [43]: Ռենտգենյան ճառագայթման հետազոտությունները, որոնք ընդգրկում են Hoechst 33258-ի և ինքնակոմպլեմենտար 12 ազոտային հիմք պարունակող 5'-d(CGCGAATTCGCG)-3' նուկլեինաթթուն, բացահայտել են, որ Hoechst 33258-ը բավականին ամուր կապվում է B-ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում:

Hoechst 33258-ի և ԴՆԹ-ի միջև փոխազդեցության մանրակրկիտ ուսումնասիրությունն իրականացվել է Լուստիենսի և այլոց կողմից [38]. Այդ աշխատանքը ընդգրկում է Hoechst 33258-ի և ԴՆԹ-ի կապման ուսումնասիրությունը լուծույթներում առանց էթանոլի

և 25 % էթանոլի առկայությամբ՝ փոփոխելով կոնցենտրացիոն տիրույթը, Hoechst 33258/ԴՆԹ հարաբերակցությունը, իոնական ուժը և իրականացնելով չափումները տարբեր ջերմաստիճաններում բացահայտելու համար կապման թերմոդինամիկական պարամետրերը: Նրանց կողմից իրականացված աշխատանքում օգտագործվել է հորթի թիմուսի ԴՆԹ, հավի էրիթրոցիտների ԴՆԹ, և պլի[d(A-T)<sub>2</sub>]: Նրանց աշխատանքը ընդգրկում է նաև որոշ հետազոտություններ, որոնք իրականացվել են օգտագործելով պլի[d(G-C)<sub>2</sub>], d(CCGGAATTCGG) և d(CGCGAATTCGCG):

Նշված աշխատանքում հեղինակները կիրառել են երկու մեթոդ՝ որոշելու համար քանդման (դիսոցման) հաստատունները.

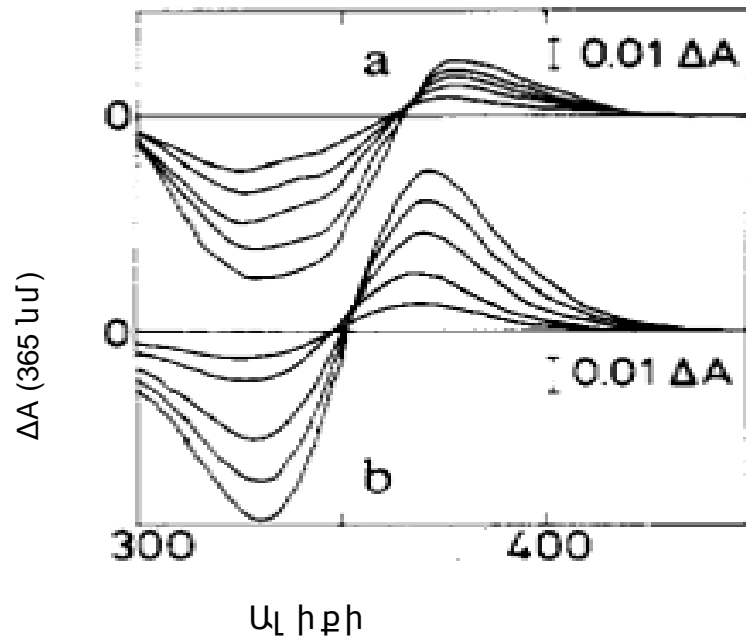
1) տիրույթում տարբեր, բայց հաստատուն Hoechst-ի կոնցենտրացիայով լուծույթներում, որոնք հնարավորություն են տալիս որոշելու դիսոցման հաստատունները ( $K_{diss}$ ) և ըստ կապման տեղի ազոտային հիմքերի թիվը,

2) Hoechst/ԴՆԹ հարաբերության շարունակական փոփոխում բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում որոշելու համար կապման ստոխոմետրիան, ինչպես նկարագրված է [44, 45] աշխատանքներում:

Այդ աշխատանքի կարևոր արդյունքներից է այն, որ հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ում կան կապման կենտրոններ, որոնք բնութագրվում են դիսոցման հաստատունի ( $K_{diss}$ ) արժեքներով, որոնք ունեն 1 նՄ-ին մոտ արժեք: Նրանք հաստատել են այդ արժեքը երկու 12 ազոտային հիմք պարունակող ԴՆԹ-ների համար (դոդեկամերներ), որոնք պարունակում են AATT հաջորդականությունը, ինչպես նաև պլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի համար:

Նշված աշխատանքի արդյունքները ցույց են տալիս չեզոք լուծույթներում Hoechst-ի ազատ մոլեկուլների ագրեգացիան: Արդյունքները ցույց են տալիս, որ Hoechst-ի կլանման մոլային հաստատունը pH-ի 7 և 7.5 արժեքների դեպքում նվազում է լիզանդի կոնցենտրացիայի մեծացման հետ (կլանման մաքսիմումը 338 նմ ալիքի երկարության տակ) մինչև 30 մկՄ կոնցենտրացիայի տիրույթում, մինչդեռ  $\epsilon$ -ի արժեքը մեծանում է 370-400 նմ տիրույթում: Յետաբերքի է, որ լիզանդի կոնցենտրացիայից կախված

Նշված երևույթը վերանում է երբ լուծույթին ավելացվում է 25 % էթանոլ (pH=7) կամ լիգանդը լուծվում է 5 մՄ աղաթթվում:



**Նկ. 10.** a) Լիգանդի կլանման սպեկտրների փոփոխությունը կոնցենտրացիայով պայմանավորված (pH=7) հետևյալ կոնցենտրացիաների դեպքում. 6, 10.2, 14.3, 19.4 և 24.2 մկՄ: b) կլանման սպեկտրների տարբերությունը, երբ 25 մկՄ ԴՆԹ պարունակող լուծույթում աստիճանաբար ավելացվում է Hoechst 33258-ի կոնցենտրացիան ապահովելով լիգանդ/ԴՆԹ հարաբերության հետևյալ արժեքները. 0.019, 0.038, 0.075, 0.113 և 0.151 [38].

Նկ. 10-ի a և b սպեկտրներում մինիմումի, մաքսիմումի և իզոսբետիկ կետի կարմիր շեղումները կոնցենտրացիայի մեծացման հետ մատնանշում են բարդ հավասարակշռությունը, որը առկա է a) լուծույթում ազատ լիգանդի և b) ԴՆԹ-ին կապված լիգանդի միջև:

Ինչպես երևում է նկ. 10 a-ից, կոնցենտրացիայով պայմանավորված կլանման սպեկտրները տեղաշարժվում են դեպի երկարալիքային տիրույթ, երբ լիգանդի կոնցենտրացիան մեծանում է (6-24 մկՄ), և մաքսիմումը դիտվում է 376-380 նմ տիրույթում, մինիմումը 330 նմ-ի տակ, և իզոսբետիկ կետը, որը տեղաշարժվում է 362-366 նմ: Կլանման ադանչանի կախվածությունը կոնցենտրացիայից բավականին բարդ է և հավանաբար

պայմանավորված է ազդեցատներով, որոնք կարգով բարձր են, քան դիմերները: Նշվում է նաև, որ այս ազատ լիգանդի կլանման ալիքային տեղաշարժները նման են այն տեղաշարժերին, որոնք դիտվում են, երբ լիգանդը կապվում է ԴՆԹ-ի հետ:

*ԴՆԹ-ի հետ կապման ժամանակ Hoechst 33258-ի կլանման սպեկտրների փոփոխությունը և ինտեկալյատորների հետ նրա մրցակցային կապումը*

Վերոհիշյալ աշխատանքի հեղինակները նշում են, որ երբ լիգանդի և ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի հարաբերությունը փոքր է 0.15-ից, էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի չափումները ի հայտ են բերում շեղումներ պարզ կապումից (նկ. 10b):

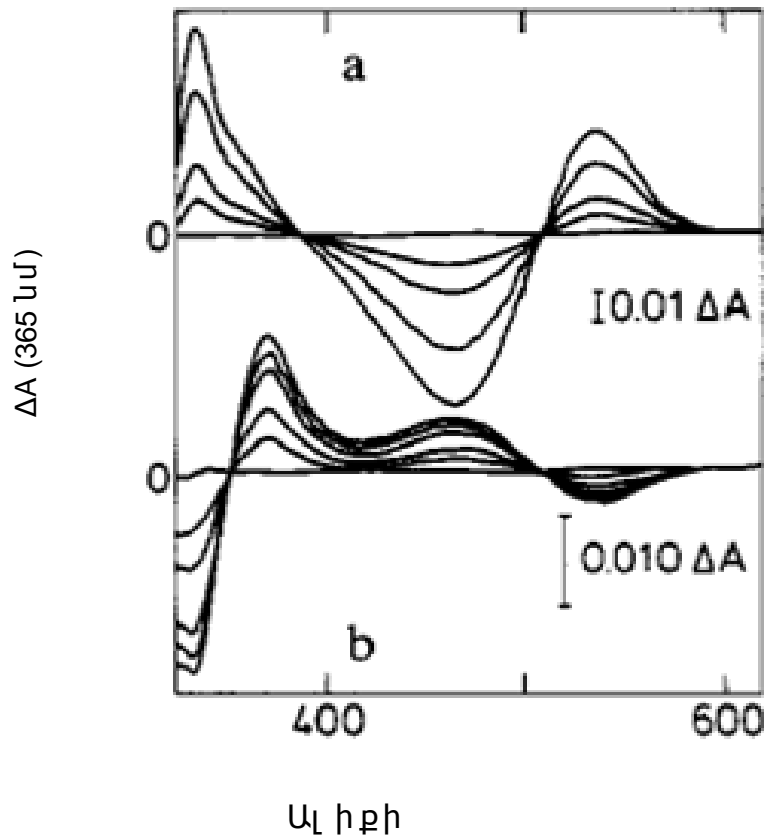
Հիմնվելով այս հատկությունների վրա՝ հնարավոր է ուսումնասիրել Hoechst 33258-ի կապումը ԴՆԹ-ին այլ մոլեկուլների առկայությամբ (մոլեկուլներ, որոնք կապվում են ԴՆԹ-ի հետ ինչպես էլեկտրոնատառիկ փոխազդեցություններով, ինչպես նաև ինտերկալյացիոն մեխանիզմով):

Անհրաժեշտ է նշել, որ Hoechst-ը ունի մի շարք առավելությունների համեմատ մեթիլ կանաչի [46] և էթիդիումի բրոմիդի հետ [47]: Այդ առավելությունները պայմանավորված են փոքր սպեկտրալ վերածածկումների հետ և կապման մեծ ինամակցությամբ:

Երբ էթիդիումի բրոմիդը ամբողջությամբ կապված է ԴՆԹ-ին և զբաղեցնում է ԴՆԹ-ում գրեթե բոլոր կապման տեղերը, այն կարող է տեղակալվել Hoechst-ով, և Hoechst-ի կապումը ԴՆԹ-ին, երբ լիգանդ/ԴՆԹ կոնցենտրացիոն հարաբերությունը փոքր է 0.08-ից, կարելի է հետևել՝ հիմնվելով էթիդիումի բրոմիդի իզոսբետիկ կետին 390 նմ ալիքի երկարության տակ (նկ. 11 b).

Տեղակալված էթիդիումի բրոմիդի մոլեկուլների թիվը գրեթե նույնն է, ինչ կապված Hoechst-ի մոլեկուլներինը, ինչը ապացուցում է, որ Hoechst-ը ավելի ամուր է կապվում ԴՆԹ-ին, քան էթիդիումի բրոմիդը:

Յեղիսակները նշում են, որ նշված փոխազդեցությունները ուղեկցվում են  $\Delta A$  լուորեցցենսային ռեզոնանսային էներգիայի անցմամբ Hoechst-ի մոլեկուլներից դեպի էթիդիոլմի բրոմիդի մոլեկուլները [38, 48]:

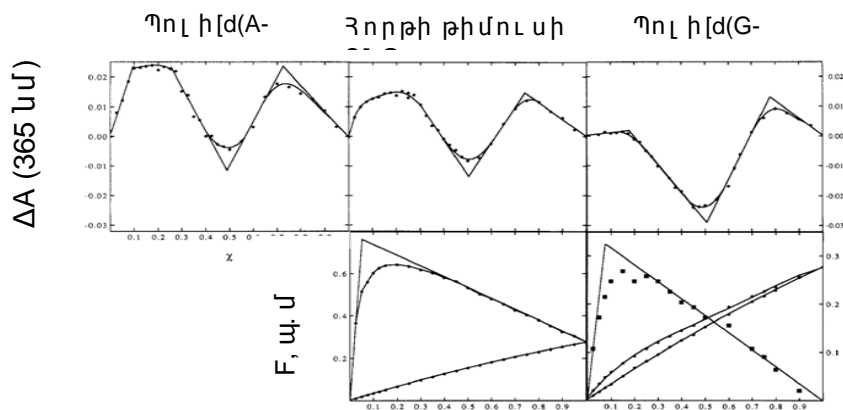


**Նկ. 11.** Էթիդիոլմի բրոմիդի տեղակալ ումը հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ից Hoechst-ով: a) Էթիդիոլմի բրոմիդի կապումը ԴՆԹ-ին երբ 81.2 մկՄ Էթիդիոլմի բրոմիդի լուծույթը տիտրվել է հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ով: Վերջիս կոնցենտրացիան փոփոխվել է հետևյալ արժեքներով. 6.25, 12.5, 24.8 և 37.2 մկՄ: b) Էթիդիոլմի բրոմիդի տեղակալ ումը Hoechst-ի մոլեկուլներով. a կորերում ԴՆԹ-ի վերջնական ավելացումից հետո լուծույթը տիտրվել է Hoechst-ի կոնցենտրիկ լուծույթով և նրա կոնցենտրացիան ստացված լուծույթում եղել է 0.47, 0.94, 1.86, 2.31 և 2.76 մկՄ [38]:

*Hoechst-ի և ԴՆԹ-ի միջև կապման ձևերի անվանակարգումը համաձայն Ջոբսի շարունական վարիացիաների մեթոդի*

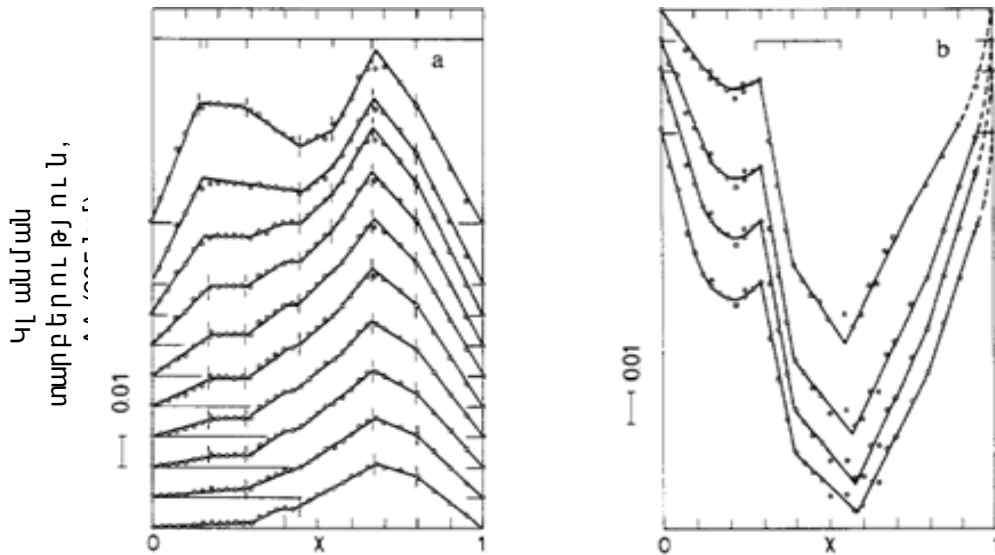
Գրականության մեջ, մինչ ԴՆԹ-ի և Hoechst-ի միջև փոխազդեցության մանրակրկիտ ուսումնասիրությունը, որը կատարվել է Լուստիենսի և այլոց կողմից [38], Hoechst-ի և ԴՆԹ-ի միջև փոխազդեցությունը դասակարգվել է երկու կարգի. ուժեղ և «յուրահատուկ» կապում ԴՆԹ-ի Ա-Թ հիմքերին, որը ուղեկցվում է ֆլուորեսցենսային ինտենսիվության մեծ աճով:

Փոխազդեցության մյուս ձևը, որը թույլ է և «ոչ յուրահատուկ», դիտվում է Լիգանդ/ԴՆԹ բարձր հարաբերությունների դեպքում և ուղեկցվում է Լիգանդի ֆլուորեսցենսային ինտենսիվության նվազմամբ: Մինչդեռ Լուստիենսի և այլոց կողմից [38] պարզաբանվել է, որ Hoechst-ի և ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրի միջև փոխազդեցությունը ուղեկցվում է մի քանի կոմպլեքսների առաջացմամբ (նկ. 12, 13), ուստի հեղինակները առաջարկել են երևան եկող չորս փոխազդեցությունների հետևյալ դասակարգումը. 1) փոխազդեցություն՝ պայմանավորված ազոտային հիմքերի հաջորդականությամբ, 2) էլեկտրոստատիկ փոխազդեցություններ, 3) Լիգանդների միջև փոխազդեցությամբ պայմանավորված, և 4) ԴՆԹ-ի կառուցվածքով պայմանավորված: Նշված փոխազդեցությունների պարզաբանումը հիմնված է Ջոբսի տիտրման կորերի վրա, որոնք բերված են նկ. 12 և 13-ում:



**Նկ. 12.** Hoechst-ի կապումը պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ին, հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ին և պոլի[d(G-C)<sub>2</sub>]-ին նկարագրված Ջոբսի կախվածությունների միջոցով [38]:

Նկ. 12-ում ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիան արտահայտված է ըստ ֆոսֆատային խմբերի,  $t=23^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=7.5$  (50 մՄ Tris, 100մՄ NaCl): Վերին երեք կորերում, կլանման տարբերությունը որոշվել է 365 նմ ալիքի երկարության տակ պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի, հորթի թիմուկի ԴՆԹ-ի, և պոլի[d(G-C)<sub>2</sub>]-ի համար: ԴՆԹ-ի և Hoechst-ի գումարային կոնցենտրացիան եղել է 22.6 մկՄ,  $\chi$ -ն ներկայացնում է լիգանդի մոլային բաժինը: Ստորին երկու կորերում ֆլուորեսցենցիան որոշվել է միայն լիգանդի համար (ստորին կորերը) և լիգանդ-ԴՆԹ կոմպլեքսի համար (հորթի թիմուկի ԴՆԹ և պոլի[d(G-C)<sub>2</sub>]): ԴՆԹ-ի և Hoechst-ի գումարային կոնցենտրացիան եղել է 1.1 մկՄ: Ֆլուորեսցենցիայի կորը ներկայացված է 10 անգամ մեծացված մասշտաբով:



**Նկ. 13.** Hoechst-ի կապումը պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ին:

Նկ. 13-ում կլանման տարբերությունը որոշված է 5-ական նմ ինտերվալներով.

$t=23^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=7.5$  (50 մՄ Tris, 100մՄ NaCl): (a) 375 (վերին կոր)-420 նմ (ստորին կոր) տիրույթում, (b) 330 (ստորին կոր)-345 նմ (վերին կոր) տիրույթում, ԴՆԹ-ի և Hoechst-ի գումարային կոնցենտրացիան եղել է 30.2 մկՄ: Նկաներում ներկայացված մասշտաբային գծերը համապատասխանում են լիգանդի հետևյալ մոլային բաժիններին. (a)  $\chi=0.143, 0.167, 0.285, 0.444, 0.545, 0.667, 0.8$ , (b)  $\chi_t = 0.285, 0.375, 0.54$  [38]:



*Hoechst-ի և ԴՆԹ-ի կապման տեսակները*

*Հաջորդականությունը պայմանավորված կապումը (յուրահատուկ կապում)*

Այս կապումը համապատասխանում է կոմպլեքսին, որը դրսևորվում է ռենտգենյան ճառագայթների [38, 43] և էլեկտրաֆորեզի մեթոդներով ստացված արդյունքներով [27, 49-51]: Hoechst-ի կապման կենտրոնը գտնվում է ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում և պահանջում է որոշակի հաջորդականություն (հաճախ 4 Ա-Թ հիմքեր) և բնութագրվում է բարձր ֆլուորեսցենտային ինտենսիվությամբ: Այն ամենայնուրևա հատուկ փոխազդեցության տեսակն է ԴՆԹ-ի հետ: Հեղինակները գտել են հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ում տարբեր կենտրոններ, որոնց նկատմամբ Hoechst-ը ցուցաբերում է տարբեր խնամակցություն:

Էլեկտրոստատիկ փոխազդեցություններով պայմանավորված կապումը (ոչ յուրահատուկ կապում) դրական լիցքավորված Hoechst-ի մոլեկուլների և բացասական լիցքավորված ԴՆԹ-ի հիմնականաբար միջև փոխազդեցության հիմնական ձևերից մեկն է: Նշված հեղինակների կողմից կատարված աշխատանքները ցույց են տալիս, որ մոնոկատիոնային Hoechst-ը և ԴՆԹ-ի հիմնականաբար առաջացնում են կոմպլեքս, որում լիզանդ/ֆոսֆատային խմբեր հարաբերությունը 1:1 է:

Էլեկտրոստատիկ փոխազդեցությունները կարևոր դեր են խաղում կապման բոլոր ձևերում, որոնք ընդգրկում են իոններ, հատկապես ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում կապման դեպքում:

Լիզանդով պայմանավորված կապումը (սուլֆոնատային ոչ յուրահատուկ) տեղի է ունենում, երբ լիզանդի ազատ մոլեկուլը կապվում է մեկ այլ լիզանդի մոլեկուլի հետ, կամ մոլեկուլների խմբի հետ, որոնք արդեն կապված են ԴՆԹ-ին: Լիզանդով պայմանավորված կապումը կարող է ընդգրկել ինչպես «պոչ-պոչ» կապման ձևերը, այնպես էլ ստեկինգ փոխազդեցություններ լիզանդի մոլեկուլների միջև, որը բնութագրական է բոլոր ԴՆԹ-ներին:

Կառուցվածքով պայմանավորված կապումը (յուրահատուկ կամ ոչ յուրահատուկ) համապատասխանում է լիզանդի կապմանը ԴՆԹ-ի կառուցվածքային կենտրոնի հետ (փոքր ակոսում, ԴՆԹ-ի ներքին հիդրոֆոբ տիրույթում, և այլն) հատուկ տարածական ֆակտորների ապահովման դեպքում: Յեղիևակները նշում են, որ այս կապումը կարող է պատասխանատու լինել Hoechst-ի մոլեկուլի կապմանը պուլի[d(G-C)<sub>2</sub>]-ի 5 գուանին և ցիտոզին ազոտային հիմքերի գույգերին: Բոլոր դեպքերում, նշված չորս փոխազդեցության տեսակները մեկուսի չեն և կապման մեկից ավելի տեսակներն են, որ նպաստում են Hoechst-ի մեծ խնամակցությանը ԴՆԹ-ի նկատմամբ:

*Տարբեր ԴՆԹ-ների հետ Hoechst-ի կապման նկարագրումը*

Ինչպես նկարագրված է աշխատանք [38]-ում, Hoechst/ԴՆԹ ազոտային հիմքերի 2-ից փոքր հարաբերության դեպքում պարզաբանվել է պուլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ հինգ կոմպլեքսների առաջացման հնարավորությունը, և երկու կոմպլեքսներ պուլի[d(G-C)<sub>2</sub>]-ի հետ, որոնք ի հայտ են գալիս ավելի փոքր հարաբերությունների դեպքում:

Բարձր ստեխիոմետրիկ կոմպլեքսների դեպքում կապումը հավանաբար պայմանավորված է փոքր ակոսի կառուցվածքով և լիզանդի մոլեկուլների ագրեգացիայի ու մոլեկուլների հետ, որոնք արդեն կապված են ԴՆԹ-ին: Սա բնութագրական է լիզանդի ագրեգացիային չեզոք լուծույթներում, երբ լիզանդի կոնցենտրացիան 5-20 մկՄ է:

ԴՆԹ-ին լիզանդի կապման դեպքում երբ լիզանդ/ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքեր հարաբերությունը փոքր է 0.15-ից, կլանման սպեկտրների տարբերությունը նման է այն սպեկտրներին, որոնք ունի լիզանդը ազատ վիճակում, ինչը խոսում է այն մասին, որ ԴՆԹ-ին «յուրահատուկ» կերպով կապված լիզանդը կարող է հանգեցնել այլ մոլեկուլների ագրեգացիային ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում:

Երբ լիզանդ/ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքեր հարաբերությունը մեծ է 2-ից, Hoechst-ի կապումը հիմնականում պայմանավորված է ֆոսֆատային լիցքերով, և լիզանդը այս դեպքում նույնպես

ագրեգացվում է ստոխոմետրիկ հարաբերությամբ  $\$n\ \$ատայ$  ին խմբերին կաթած այլ լիգանդների հետ:

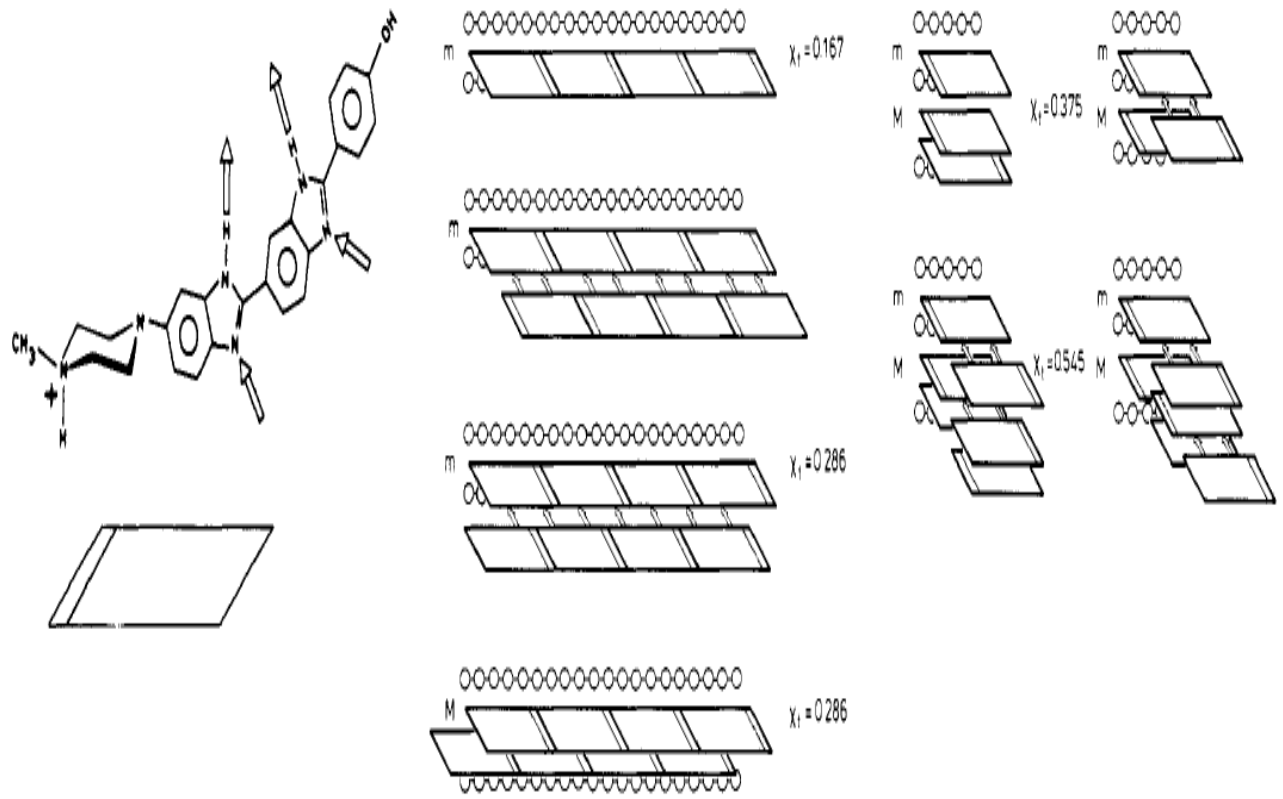
Տվյալները, որոնք ստացվել են պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի և Hoechst-ի փոխազդեցության ուսումնասիրման ժամանակ 30 մկՄ կոնցենտրացիայի դեպքում ցույց են տալիս առնվազն յոթ կոմպլեքսների հնարավորությունը նույն ժամանակում:

Հաջորդականությամբ պայմանավորված կապման համար հիմնական ստոխոմետրիան պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ 1 լիգանդի մոլեկուլն է յուրաքանչյուր 5-6 ադենին և թիմին ազոտային հիմքերի համար, որը համապատասխանում է իրար մոտ տեղակայված շրջման կետերին  $\chi=0.14$ -ից  $\chi=0.17$  (նկ. 13a):

Գտնված համամասնությունները համապատասխանում են էլեկտրաֆորեզի արդյունքներին [27, 49, 50] և կրիստալոգրաֆիկ տվյալներին [43], երբ լիգանդը կապվում է AATT կենտրոնի հետ d(CCGGAATTCCGG) հաջորդականության մեջ և ունի կոնտակտներ կողմնային Գ-Ց ազոտային հիմքերի հետ: Հնարավոր է, որ այնպիսի լայնալ տերնատիվ շղթայի դեպքում, ինչպիսին է պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ն, լիգանդի մոլեկուլները իրար կողքի չեն դասավորված, այլ բաժանված են մեկ Ա-Թ ազոտային հիմքով, ուստի հարաբերակցությունը կազմում է 1/6 և ոչ թե 1/5:

Ավելին, բացի 1 լիգանդից ամեն 5 կամ 6 ազոտային հիմքերի զույգերի դեպքում, ևս չորս այլ կոմպլեքսներ են բացահայտվել, որոնք բաղկացած են 2, 3, 4 և 6 լիգանդներից ամեն 5 Ա-Թ ազոտային հիմքերի զույգերի դեպքում: Այսպիսի կապումը տեղի է ունենում կամ ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրին կապման դեպքում կամ լիգանդների միջոցով, որոնք արդեն կապված են ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրին հաջորդականությամբ պայմանավորված կամ կառուցվածքով պայմանավորված եղանակով: Hoechst-ի մոլեկուլը, որը կապված է ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում, լիգանդի այլ մոլեկուլների հետ կարող է փոխազդել միայն իր արտաքին «պոչի» միջոցով: Բենզիմիդազոլային օղակի ազոտի ատոմները, որոնք մոտ են ԴՆԹ-ին (նկ. 14), ջրածնական կապի դոնորներ են թիմինի O2 ատոմի համար և ադենինի N3 ատոմի համար [43, 52]. Արտաքին ազոտի ատոմը կարող է հանդիսանալ որպես

ջրածնական կապի ակցեպտոր և իգանդի երկրորդ մոլեկուլի համար, կապված «գլուխարջ» դասավորությամբ՝ նվազեցնելու համար պիպերազինների միջև դիմերների դեպքում և իցքերի վանումը: Ավելին, հեղինակները նշում են, որ ագրեգացիան կարող է ընդգրկել այսպես կոչված Շնայբ-ագրեգատներ [53]. Նման ագրեգատների առաջացումը բնութագրական է բենզիմիդազոլինինին [38]: Ավելին, կան նաև առնվազն երկու հաջորդականությամբ ունից անկախ կոմպլեքսներ՝ յուրաքանչյուր ֆոսֆատի համար 1 իգանդ (և իցքով պայմանավորված կապում) և երկու իգանդ (և իգանդով պայմանավորված կապում):



**Նկ. 14.** Hoechst-ի կառուցվածքը չեզոք pH-ի դեպքում և ԴՆԹ-ի հետդրա կապման սխեմատիկ պատկերները [38]:

Նկ. 14-ում վերևի երկու սլաքները մատնանշում են ջրածնական կապերը դեպի թիմինի O2 ատոմի համար և ադենինի N3 ատոմի համար ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում, և երկու ստորին սլաքները մատնանշում են հնարավոր ջրածնական կապերը իգանդի երկրորդ մոլեկուլի հետ,

որը առաջացնում է «գլ ու խարչ» կողմնորոշմամբ դիմեր: Կենտրոնի և աջ մասի հատվածներում լիզանդի մոլեկուլները պատկերված են որպես ուղղանկյուններ: pH-ը 7.0-7.5 արժեքների դեպքում միայն պիպերազինի ազոտի ատոմը, որը միացած է մեթիլ խմբին, ունի դրական լիցք: Կենտրոնում պատկերված են հաջորդականությամբ և կառուցվածքով պայմանավորված կապումները պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ և պոլի[d(G-C)<sub>2</sub>]-ի հետ, երբ  $\chi=0.167$  և  $0.286$ : Նկում պատկերված շղթաները արտապատկերում են ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերը՝ ընդունելով, որ 5 ազոտային հիմքերը համապատասխանում են ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրի երկու պտույտին (m-փոքր ակոս, M-մեծ ակոս): Հաջորդականությամբ պայմանավորված կապման դեպքում լիզանդը առաջացնում է շղթա փոքր ակոսում երբ լիզանդի մոլային բաժինը հավասար է  $\chi=0.167$ , որը \$L ու որեցցենտային կոմպլեքս է: Լիզանդով պայմանավորված կոմպլեքսի դեպքում առաջանում է դիմեր,  $\chi=0.286$  մոլային բաժնով պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի շղթայի վրա հավանաբար ջրածնական կապերի միջոցով: Երկու միջին սխեմաները ներկայացնում են երկու հնարավոր դասավորվածությունները: Կառուցվածքով պայմանավորված կապումը ներկայացված է ներքևում, որտեղ լիզանդները շերտերով դասավորված են մեծ ակոսում երբ  $\chi=0.286$ . Նման դասավորվածությունը կարող է տեղի ունենալ պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ և, հավանաբար, պոլի[d(G-C)<sub>2</sub>]-ի հետ նույնպես: Աջ կողմում պատկերված են Hoechst-ի \$L ու որեցցենտային մարման մեջ ընդգրկված կոմպլեքսների հնարավոր դասավորությունները լիզանդի և ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերի բարձր հարաբերության դեպքում ( $\chi=0.375$  և  $0.545$ ): Կոմպլեքսը, որը պարունակում է լիզանդի 3 մոլեկուլ յուրաքանչյուր 5 Ա և Թ ազոտային հիմքերի գույգերի դեպքում հանգեցնում է \$L ու որեցցենտային չնչին նվազման: Երկու հնարավոր դասավորվածություններ ներկայացված են որպես տեղային «համախումբ»: Դասավորվածությունները ընդգրկում են կամ եզակի մոլեկուլներ փոքր ակոսում և շերտավորված (stacked) դիմեր մեծ ակոսում (ծախ) կամ ջրածնական կապերով կապված «գլ ու խարչ» դիմեր փոքր ակոսում և մեկ լիզանդ յուրաքանչյուր 5 ազոտային հիմքերի գույգերի դեպքում (աջ): Նման

դասավորվածություները կարող են առաջացնել կոմպլեքս որևէ ընդգրկում է 6 լիգանդի մոլեկուլ յուրաքանչյուր 5 Ա-Թ ազոտային հիմքերի գույգերի դեպքում ( $\chi=0.545$ ), որը հանգեցնում է ֆլուորեսցենցիայի գրեթե ամբողջական մարման: Երկու հնարավոր դասավորվածություները ընդգրկում են երեք «գլուխ-պոչ» դիմերներ. 1) մեկ դիմեր փոքր ակոսում և երկու դիմեր շերտավորված մեծ ակոսում (ձախ), 2) մեկը փոքր ակոսում, մեկը մեծ ակոսում և երրորդ դիմերը մասնակիորեն տեղավորված նրանց միջև (աջ):

Hoechst-ը կարող է փոխազդել Գ-Ց ազոտային հիմքերով հարուստ հաջորդականություների հետ այլ ձևերով, բացի ֆոսֆատային փոխազդեցություները (նկ. 12): Պոլի[d(G-C)<sub>2</sub>]-ի հետ փոխազդեցության դեպքում ֆլուորեսցենցիայի աճը ավելի քիչ ինտենսիվ է, քան Ա-Թ հիմնային գույգեր պարունակող հաջորդականություների հետ: Պոլի[d(G-C)<sub>2</sub>]-ի համար, որը պատրաստված է մաքուր պրայմերի հաջորդականություներից, կոմպլեքսը համապատասխանում է 1-2 լիգանդի յուրաքանչյուր 5 Գ-Ց ազոտային հիմքերի գույգերի դեպքում: Յեղիսակները առաջարկում են, որ պոլի[d(G-C)<sub>2</sub>]-ի հետ կապումը, որը չէր պարզաբանվել նախկինում, կառուցվածքով պայմանավորված է և ընդգրկում է շերտավորված դիմերներ մեծ ակոսում (նկ. 14): Այնուամենայնիվ, հարաբերականորեն նույն ինամակցությամբ կապումները մեծ և փոքր ակոսներում նույնպես հնարավոր է, քանի որ Ջորգենսոնի և այլոց կողմից իրականացվել է Hoechst-ի մրցակցային կապման ուսումնասիրություները պոլի[d(G-C)<sub>2</sub>]-ի և պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ [51]:

Պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ հինգ կոմպլեքսները համապատասխանում են չ-ի այն արժեքներին, որոնք փոքր են ֆոսֆատային կմախքի հետ կապման համար անհրաժեշտ արժեքներից, և հավանաբար հանդիպում են որպես ագրեգատներ առանց այն լիգանդների մասնակցության, որոնք ուղղակիորեն կապված են ֆոսֆատներին (նկ. 14): Կոմպլեքսը, որը պարունակում է մեկ լիգանդ ԴԼԹ-ի փոքր ակոսում յուրաքանչյուր 5 Ա-Թ ազոտային հիմքերի դեպքում, հաջորդականությամբ կամ կառուցվածքով պայմանավորված կապում

Է: Յուրաքանչյուր 5 Ա-Թ ազոտային հիմքերի դեպքում կրկնվող միավորները, որոնք կազմված են երկու լիզանդից, պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի պարագայում հետևյալն են. 1) ջրածնական կապերով կապված «գլուխ-արջ» դիմերներ, որոնք առաջանում են, երբ լիզանդը կապվում է ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում արդեն կապված լիզանդի մոլեկուլին, 2) կառուցվածք, որը ձևավորվում է, երբ մեկ կամ երկու լիզանդի մոլեկուլ կապվում են փոքր ակոսում և մի մոլեկուլ, որը կապվում է մեծ ակոսում, 3) կառուցվածք, որը նման է երբ լիզանդը կապվում է պոլի[d(G-C)<sub>2</sub>]-ի հետ, երբ լիզանդի երկու մոլեկուլներ շերտավորված են որպես դիմեր մեծ ակոսում:

Բոլոր այս կառուցվածքները, որոնք ընդգրկում են 2 լիզանդ յուրաքանչյուր 5 Ա/Թ ազոտային զույգերի համար, հետագայում միջուկ են հանդիսանում լիզանդով պայմանավորված կապման համար 3, 4 և 6 լիզանդների կապմանը յուրաքանչյուր 5 Ա/Թ ազոտային հիմքերի դեպքում: Կոմպլեքսը, որը պարունակում է 6 լիզանդ յուրաքանչյուր 5 Ա/Թ ազոտային հիմքերի զույգերի համար, համապատասխանում է գրեթե ամբողջական ֆլուորեսցենտային մարմանը և կարող է ձևավորվել մի քանի ձևերով. 1) «գլուխ-արջ» դիմերներ փոքր ակոսում, որոնք որը կարող է լինել միջուկ կապվելու համար 4 այլ լիզանդի մոլեկուլների հետ, «գլուխ-արջ» կապման մեխանիզմով և ստեկինգ փոխազդեցություններում համադրված, 2) «գլուխ-արջ» դիմերը կարող է ձևավորվել և փոքր և մեծ ակոսներում, և երրորդ դիմերը տեղավորված նրանց միջև, 3) մեկ «գլուխ-արջ» դիմերը ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում և երկուսը ԴՆԹ-ի մեծ ակոսներում նույնպես կարող են ձևավորվել: 2 և 3 հնարավորությունները ներկայացված են նկ. 14-ում: Ստեփհոմետրիաները, որոնք համապատասխանում են 3, 4 և 6 լիզանդների յուրաքանչյուր 5 Ա-Թ հիմնային զույգերի դեպքում չեն դիտվել պոլի[d(G-C)<sub>2</sub>]-ի պարագայում, որը հավանաբար պայմանավորված է նրա փոքր ակոսում կապված լիզանդների փոքր թվով, որոնք կհանդիսանային միջուկ լիզանդով պայմանավորված կապման համար:

ԴՆԹ-ին կապված Hoechst-ի մոլեկուլների ֆլուորեսցենցիան մարում է լիզանդի բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում՝ առաջացնելով 6 լիզանդներից կազմված ագրեգատներ յուրաքանչյուր 5 Ա-Թ ազոտային հիմքերի դեպքում: Լիզանդ/ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքեր կոնցենտրացիոն հարաբերության դեպքում, որը նույնիսկ մեծ է 6/5-ից, Hoechst-ը կապվում է ֆոսֆատային խմբերի հետ և ձևավորում ստեխիոմետրիկ ագրեգատներ, որոնք համապատասխանում են 1, 2 և նույնիսկ ավելի լիզանդների յուրաքանչյուր մեկ ֆոսֆատի համար: Այսպիսի ագրեգատներ առաջացնելու լիզանդի հատկությունը, որը ընդգրկում է ԴՆԹ-ի արտաքին տիրույթը նույնպես կարող է հանդիսանալ շարժիչ ուժ՝ քանդելու համար գերապարուրված պլազմիդի կառուցվածքը: DNase I և միկրոկոկալ ֆերմենտի ազդեցությունները միայն չեն չափվել փոփոխվում լիզանդի ագրեգացիայի դեպքում լիզանդ/ԴՆԹ-ի բարձր և ցածր արժեքների դեպքում, ինչպես ցույց են տալիս էլեկտրաֆորեզի հետազոտությունները [27, 51]: Լիզանդի ցածր կոնցենտրացիաների դեպքում տիտրման արդյունքները ի հայտ են բերում յուրահատուկ կամ հաջորդականությամբ պայմանավորված կապում բնական ԴՆԹ-ի նկատմամբ:

Յետազոտությունները, որոնք տարվել են տարբեր իոնական ուժերի պայմաններում, բացահայտել են, որ իոնական ուժի մեծացումը հանգեցնում է յուրահատուկ կապման թուլացմանը: Յետաքրքիր է, որ իոնական ուժի փոփոխությունը չի ազդում կապման հաստատունի վրա լուծույթում 25 % էթանոլի առկայության դեպքում:

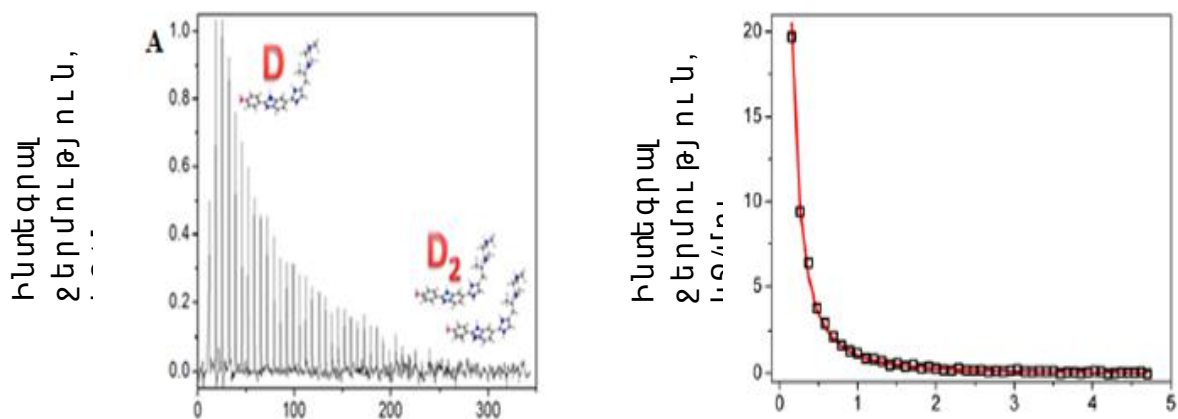
Թերմոդինամիկական հետազոտությունները պարզաբանում են Hoechst-ի և ԴՆԹ-ի կապման էնթալպիայի, էնտրոպիայի և Գիբսի էներգիայի արժեքները [38]: Hoechst-ի և պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի կապման համար  $\Delta H = -30.66$  կՋ·մոլ<sup>-1</sup> է, d(CCGAATTCCGG) հաջորդականության դեպքում այն հավասար է  $-26.04$  կՋ·մոլ<sup>-1</sup>։ Ինչպես երևում է այս արժեքներից, նրանք բավականին մոտ են միմյանց, ինչը խոսում է այն մասին, որ ջրածնական կապերը կամ վան դեր վաալյան փոխազդեցություններով



պայ մանավորված կապուլմները էներգետիկորեն մոտ են տարբեր ԴԼԹ-ների կառուցվածքների համար:

Hoechst-ի լուծույթների ուսումնասիրության ժամանակ կարևոր է հաշվի առնել դիմերների կամ ավելի բարձր կարգ ունեցող ասոցիատների առաջացման հնարավորությունը: Բուստոի և այլոց կողմից իրականացված աշխատանքում մանրակրկիտ կերպով ուսումնասիրվել է Hoechst-ի ագրեգատների առաջացումը [54]: Hoechst-ի դիմերիզացման արոցեսի ուսումնասիրությունը իրականացվել է իզոթերմալ տիտրման կալորիոմետրիայի (Նկ. 15), էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի, ֆլուորեսցենցիայի և դիֆերենցիալ կալորիմետրի միջոցով և T-թռիչքի կինետիկ չափումների միջոցով:

Արդյունքները ցույց են տվել, որ դիմեր/մոնոմեր հարաբերությունը կախված է լիգանդի կոնցենտրացիայից և իոնական ուժից: Ֆիզիոլոգիական պայմանների դեպքում ( $pH=7.0$ ,  $I=0.10$  Մ), դիմերիզացման հաստատունը գնահատվել է  $K_d=3 \times 10^4$  Մ<sup>-1</sup>։ Ստացված արդյունքներից բխում է, որ լիգանդի միայն միկրոմոլյար քանակություներն են, որ կարող են ապահովել մոնոմերների բավականին մեծ քանակություներ: Օրինակ, նշվում է, որ լիգանդի 10 մկM կոնցենտրացիայի դեպքում դիմերները գերակշռում են քանակապես  $I > 0.08$  Մ իոնական ուժի դեպքում, մինչդեռ մոնոմերային ձևը դիտվում է ցածր իոնական ուժերի դեպքում: Կարևոր հանգամանք է, որ դիմերային ձևերի ֆլուորեսցենսային հատկությունները առավել ուժգին են, քան մոնոմերային ձևինը, և ֆլուորեսցենսային ինտենսիվությունը կախված է իոնական ուժից և լիգանդի կոնցենտրացիայից:



Ժամանակ, րոպե

c(Hoechst) $\times 10^5$  մոլ /լ

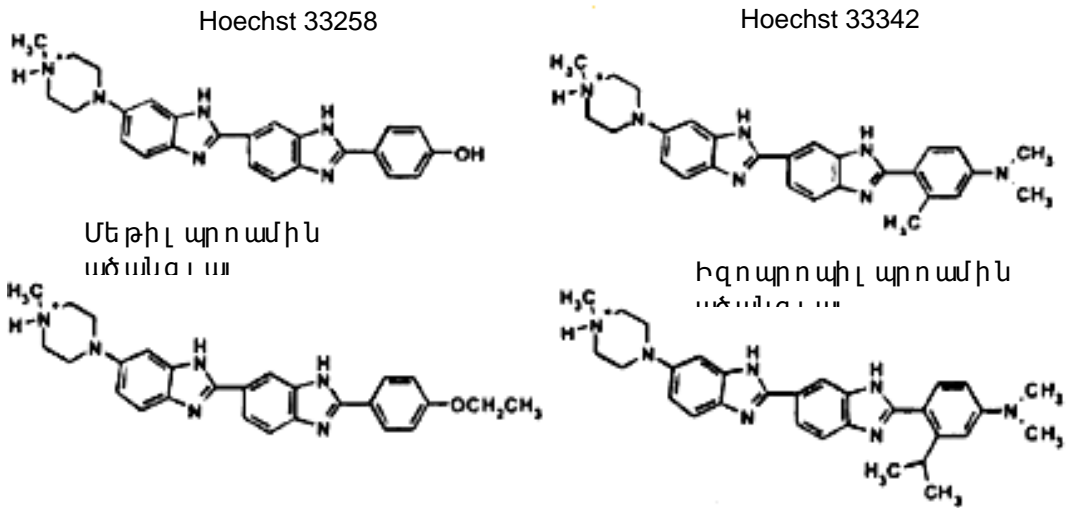
**Նկ. 15.** Hoechst-ի իզոթեմալ տիտրման կալորիամետրիայի պրոֆիլները, pH=7.0, I=0.10 M (NaCl), և t=25 °C: A) Տիտրման պրոֆիլը, որը ստացվել է բուժերային լուծույթում լիզանդի հաջորդական ներարկման արդյունքում, B) Ինտեգրված ջերմային տվյալները որպես ֆունկցիա Hoechst-ի կոնցենտրացիայից (արտատված է [54]-ից):

**1.4. Hoechst 33258-ի ածանցյալների կիրառումը տարբեր կենսաքիմիական հետազոտություններում**

Վերոհիշյալ գրականական ամփոփումը ապացուցում է Hoechst-ի եզակի կառուցվածքը և նրա հատկությունների կարևորությունը կենսաքիմիական տարբեր հետազոտություններում: Հիմնվելով այս հատկությունների վրա, շատ հետազոտողներ առաջարկել և սինթեզել են Hoechst-ի տարբեր ածանցյալներ, որոնք նույնպես կարող են ունենալ բազմակողմանի կիրառություններ: Ստորև բերվում է Hoechst-ի որոշ ածանցյալների համառոտ նկարագրությունը, որոնք ուսումնասիրվել են մինչ այժմ:

Hoechst-ի ածանցյալները կիրառվում են ԴՆԹ-ի հետիոթականացվող հետազոտություններում ինչպես ԴՆԹ-ին կովալենտ կապով կապված, այնպես էլ ոչ կովալենտ կապված վիճակում:

Բազուլի նայի և այլոց կողմից իրականացված աշխատանքում [55], կատարվել են չափումներ էլեկտրոնային կլանման, ֆլուորեսցենցային սպեկտրոսկոպիայի, շրջանային դիֆրոմի ուսումնասիրելու համար Hoechst 33258-ի, Hoechst 33342-ի, և նրանց ածանցյալների փոխազդեցությունը պրիմեր [d(A-T)<sub>2</sub>]-ի, պրիմեր [d(A)]պրիմեր [d(T)]-ի և ԴՆԹ դոդեկամեր 5'-d(CGTATATACG)-3'-ի հետ: Նրանց կողմից ուսումնասիրված Hoechst 33258-ի ածանցյալների կառուցվածքները բերված են նկ. 16-ում:

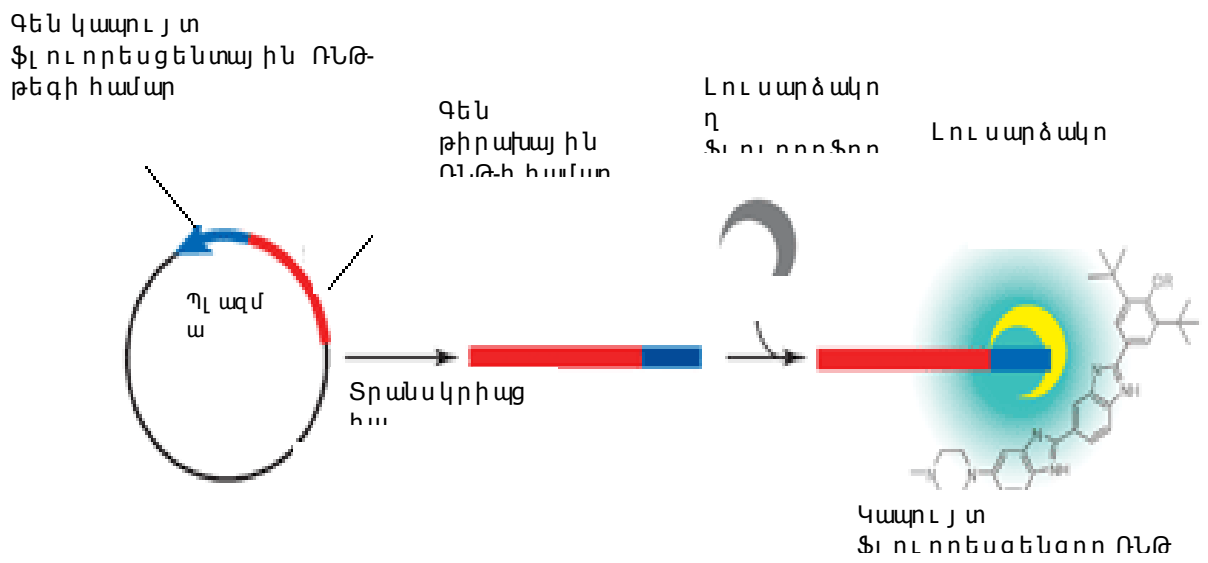


**Նկ. 16.** Hoechst 33258-ի և նրա ածանցյալների կառուցվածքը, որոնք ուսումնասիրվել են [69] աշխատանքում:

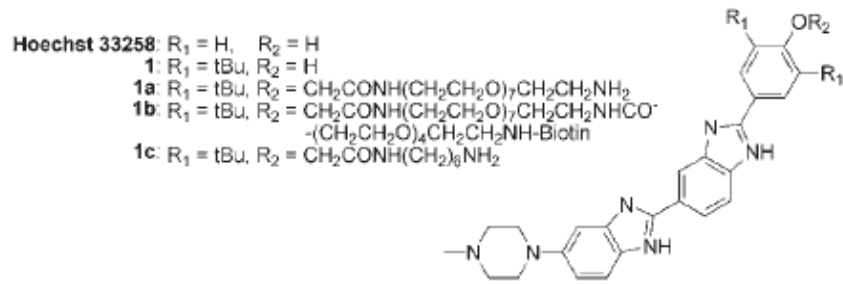
Նրանց կողմից իրականացված աշխատանքում Hoechst 33258-ի, Hoechst 33342-ի և մեթիլ պրոպիլն ածանցյալի և ԴՆԹ-ի միջև ի հայտ եկած բերվել երեք տիպի կոմպլեքսներ, որոնք համապատասխանում են լիգանդի մոնոմեր, դիմեր և տետրամեր ձևերին: Դիմեր կոմպլեքսում, լիգանդի երկու մոլեկուլներ սանդվիչ կառուցվածքով կապված են ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում: Նրանց կողմից ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ Hoechst 33258-ը, Hoechst 33342-ը և մեթիլ պրոպիլն ածանցյալը առաջացնում են երրորդ տիպի կոմպլեքսներ ԴՆԹ-ի հետ, որը հավանաբար պայմանավորված է բարձր կարգի ասոցիատներով, հավանաբար տետրամերների առաջացմամբ: Ֆենիլ խմբի օրթո-դիրքում ջրածնի ատոմի տեղակալումը մեթիլ խմբով փոքր էֆեկտ ունի ԴՆԹ-ի հետ մոնոմեր ձևի կապման վրա: Մինչդեռ, այն նվազեցնում է տետրամերի կապման հաստատունի արժեքը: Հակառակ այս արդյունքին, Hoechst-ի օրթո-իզոպրոպիլն ածանցյալը, ցուցաբերում է փոքր խնամակցությունն պուլի [d(A-T)<sub>2</sub>]-ի, պուլի [d(A)]պուլի [d(T)]-ի նկատմամբ և կապվում է ԴՆԹ-ի հետ միայն մոնոմեր ձևով: Սակարող է բացատրվել տարածական խոչընդոտներով, որը արգելակում է լիգանդների երկու մոլեկուլների «գլուխ-պոչ» կապումը: Հեղինակների կողմից ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ Hoechst-ի ածանցյալների կապման ձևը և խնամակցությունը կախված է ֆենիլ խմբի օրթո-դիրքում տեղակալիչի բնույթից:

Բացի Hoechst-ի կիրառումը որպես ԴՆԹ-ի նշանակիր, այն կարող է կիրառվել նաև որպես նշանակիր ՌՆԹ-ի համար: Աշխատանքը, որը իրականացվել է Սանդոյի և այլոց կողմից [56], իր մեջ ներառում է Hoechst-ի ածանցյալների կիրառումը ՌՆԹ-ի ապտամերների հետ որպես ֆլուորեսցենտային նշանակիր՝ հետևելու համար տրանսկրիպցիայի պրոցեսին:

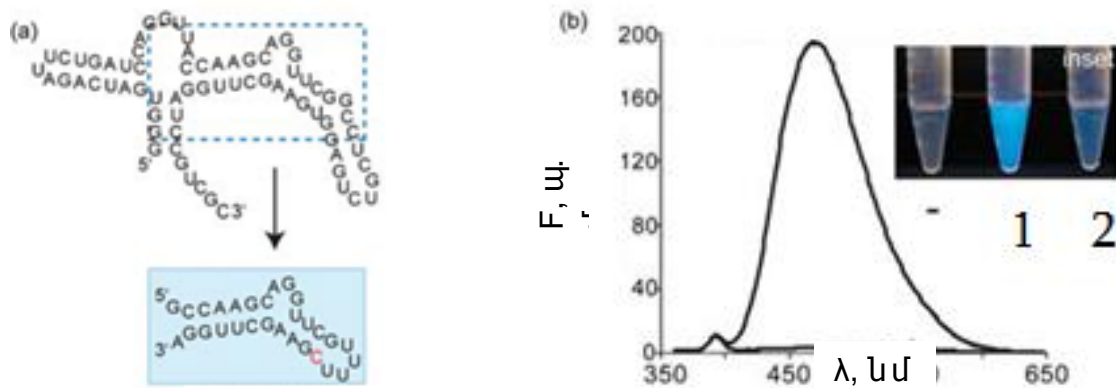
Նշված երևույթի սխեմատիկ պատկերումը բերված է նկ. 17-ում: Մյուս կողմից, նկ. 18-ում բերված են այդ աշխատանքում օգտագործված Hoechst-ի ածանցյալների քիմիական կառուցվածքները: Ինչպես երևում է նկ. 18-ից, կիրառված Hoechst 33258-ի ածանցյալները ունեն բազմաբևույթ կառուցվածք, դրանցում առկա տեղակալիչները տարբերվում են ինչպես քիմիական կազմով, այնպես էլ երկարությամբ:



**Նկ. 17.** ՌՆԹ-ի ապտամեր-Hoechst գույն գը, որը կարող է կիրառվել որպես ֆլուորեսցենտային նշանակիր՝ տրանսկրիպցիայի հետևելու համար [56]:



**Նկ. 18.** Hoechst-ի ածանցյալների կառուցվածքը, որոնք ուսումնասիրվել են ՌՆԹ-ի ուսումնասիրման ժամանակ [56]:



**Նկ. 19.** a) ՌՆԹ-ապտամերի կառուցվածքը որը կանխատեսվել է RNA structure համակարգչային ծրագրի կիրառմամբ, b) Hoechst 1c ածանցյալի (200նՄ) ֆլուորեսցենտային սպեկտրը առանց ՌՆԹ ապտամերի (-), ապտամերի առկայությամբ (1-ապտամեր, 2-պատահական ՌՆԹ-ի հաջորդականություներով): Ներդրված նկարը ցույց է տալիս համակարգի ֆլուորեսցենտային պատկերները, երբ համակարգը գրգռվում է 366 նմ ալիքի երկարության տրանսիլյումինատորով [56]:

Կենսաբանական պրոցեսներին հետևելու համար ներկայումս իրականացվում են բազմաթիվ հետազոտություններ: Մասնավորապես, կարևոր թիրախ է հանդիսանում ՌՆԹ-ն, որը կարևոր դեր է խաղում սպիտակուցների կենսասինթեզի և կարգավորման համար: Նկ. 19-ում բերված է այդ աշխատանքում կիրառված ապտամերի կառուցվածքը և նրա կապման ուսումնասիրությունը Hoechst-ի ածանցյալի հետ ֆլուորեսցենտային եղանակով:

Յեղիկների կողմից ուսումնասիրվել է նաև լյուցիֆերազ ֆերմենտի ազդեցությունը ՌՆԹ-ապտամերի վրա: Որպես

եզրակացություն, հեղինակները նշում են, որ օպտիմալացված ապտամերը կարող է պաշտպանվել լյուցիֆերազ ֆերմենտով և այդ պաշտպանված ՌՆԹ-ն, որպես համապատասխան ԴՆԹ-ի նմուշից պատրաստի տրանսկրիպցիայի ենթարկված ՌՆԹ, կարող է հանգեցնել Hoechst-ի ածանցյալի ֆլուորեսցենցիայի աճին պայմանավորված ապտամեր-լիզանդյունրահատուկ փոխազդեցություններով: Յետևաբար, գենի տրանսկրիպցիային կարելի է հետևել *in vitro* լիզանդ-ապտամերյունրահատուկ փոխազդեցություններով պայմանավորված:

Վերոնշված գրական ակնարկը հաստատում է Hoechst-ի և դրա ածանցյալների կարևորությունը տարբեր կենսաքիմիական հետազոտություններում: Յիմնվելով այս հատկանիշների վրա՝ մեր կողմից առաջարկվել և սինթեզվել են Hoechst-ի նոր ածանցյալներ և գնահատվել են նրանց խնամակցությունները տարբեր ԴՆԹ-ների նկատմամբ: Որոշելու համար նշված լիզանդների խնամակցությունը տարբեր ԴՆԹ-ների նկատմամբ, կիրառվել են տարբեր սպեկտրոսկոպիական մեթոդներ, մասնավորապես էլեկտրոնային կլանման, ֆլուորեսցենտային, շրջանային դիֆրոիզմի սպեկտրոսկոպիական մեթոդները: Կիրառվել են նաև տեսական մեթոդներ, հանձնես մոլեկուլային դոֆինգի մեթոդը, պարզելու համար լիզանդների և ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերի միջև առկա հնարավոր փոխազդեցությունները և որոշելու համար ջրածնական կապերի երկարությունները:

## ԳԼՈՒԽ2. ՓՈՐՁԱՐԱՐԱԿԱՆ ՄԱՍ

### 2.1 Օգտագործված նյութերը

Կատարված փորձնական հետազոտություններում օգտագործվել են.

- Յորթի թիմուկի ԴՆԹ (Sigma, G-C (42%), A260/A280>1.8, A260/A230>2.3), որն օգտագործվել է առանց հետազամաբրման:
- Պոլի[դեզօքսիադենսիլ դեզօքսիթիմինիլ] նուկլեինաթթու, (Sigma), որն օգտագործվել է առանց հետազամաբրման:
- ԴՆԹ-ի 28 հիմք պարունակող օլիգոնուկլեինաթթուներ, (Eurogentec,), որոնք օգտագործվել են առանց հետազամաբրման:
- Դիմեթիլ սուլֆօքսիդ (ԴՄՍՕ) (Sigma, > 99.5%), որն օգտագործվել է առանց հետազամաբրման:
- Էթիդիոլմի բրոմիդը (ԷԲ) (Sigma, > 99%), որն օգտագործվել է առանց հետազամաբրման:
- Hoechst 33258, (Sigma, > 99%), որն օգտագործվել է առանց հետազամաբրման:
- Hoechst 33258-ի 11 ածանցյալներ, որոնք սինթեզվել են Փարիզի օրգանական քիմիայի և աբորատորիայում (ESPCI), օգտագործվել են առանց հետազամաբրման:

ԴՆԹ-ի բուրլորլուծույթները պատրաստվել են կամ ցիտրատային բուլֆերում (0.015 Մ NaCl և 0.0015 Մ նատրիումի ցիտրատ՝  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.5), կամ կակոդիլատ բուլֆերում (10 մՄ նատրիումի կակոդիլատ  $((\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{ONa})$ , 100 մՄ նատրիումի քլորիդ, pH 7.5):

ՅԹ-ԴՆԹ-ի և ԷԲ-ի կլանման մոլային գործակիցները համապատասխանաբար հավասար են  $\epsilon_{260}=6600$  և  $\epsilon_{478}=5680 \text{ Մ}^{-1}\cdot\text{սմ}^{-1}$ , Hoechst-ի համար՝  $\epsilon_{340}=42000 \text{ Մ}^{-1}\cdot\text{սմ}^{-1}$ : Բուրլորլուծույթների պատրաստման համար օգտագործվել է կրկնակի թորած ջուր:

### 2.2 Օգտագործված մեթոդները եվ փորձարարական սեխնիկան

### 2.2.1. Էլ Եկտրոնայ Ին Կլ անման սափեկտրոսկոպիա

Էլ Եկտրոնայ Ին Կլ անման սափեկտրոսկոպիայի չափումները, որոնք ընդգրկում են նաև ԴՆԹ-ի հալման չափումները, իրականացվել են SPECORD 50 և Varian Cary 300 Bio սափեկտրոսֆոտոմետրների միջոցով, որին կցված է Peltier ջերմաստիճանային կարգավորման համակարգը: Hoechst-ի և նրա ածանցյալների տիտրման ժամանակ 4 մկՄ կոնցենտրացիայով լիգանդի լուծույթը տիտրվել է ավելացնելով ԶԹ-ԴՆԹ-ի (կամ պուլիմերի) 1 մկՄ լուծույթի 5 մկլ քանակությամբ: ԴՆԹ-ի և Hoechst-ի ածանցյալների փոխազդեցության ուսումնասիրությանը նախնառաջ իրականացվել է Էլ Եկտրոնայ Ին Կլ անման սափեկտրոսկոպիայի միջոցով: Որպես համեմատական նմուշ, իրականացվել է նաև ոչ մոդիֆիկացված Hoechst-ի և ԴՆԹ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրությանը: Էլ Եկտրոնայ Ին Կլ անման սափեկտրոսկոպիայի չափումներում օգտագործվել է ինչպես հորթի թիմուսի ԴՆԹ, այնպես էլ պուլիմերի [d(A-T)<sub>2</sub>]: Hoechst-ի ածանցյալների կլանման սափեկտրոնները գրանցվել են ԴՆԹ-ի աստիճանական ավելացման հետ, որը հնարավորություն է տալիս քանակապես նկարագրելու նրանց փոխազդեցությանը: Նշված ածանցյալների կապման հաստատունները որոշվել են ելնելով (1) հավասարումից (վոն Զիպելի հավասարում)։

$$r/C_f = K_a(1-nr)[(1-nr)/[1/(n-1)r]^{n-1}] \quad (1)$$

(1) հավասարման մեջ  $C_f$ -ը ազատ լիգանդի կոնցենտրացիան է,  $n$ -ը կապման տեղի երկարությունը,  $r$ -ը կապված լիգանդի և ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիաների հարաբերությունն է: Կլանման տիտրման կորերի անալիզի հիման վրա որոշվել են  $C_f$ -ի արժեքները, համաձայն (2) բանաձևի։

$$C_f = (A_{obs} - \epsilon_b C_t) / (\epsilon_f - \epsilon_b) \quad (2)$$

որտեղ  $A_{obs}$ -ը իրենից ներկայացնում է կլանման մաքսիմումի արժեքը ընթացիկ տիտրման ժամանակ,  $\epsilon_b$  և  $\epsilon_f$  ամբողջովին կապված լիգանդի և ազատ վիճակում գտնվող լիգանդի կլանման մոլային գործակցի արժեքներն են,  $C_f$ -ը լիգանդի ընդհանուր կոնցենտրացիան է:



Յիստրոբոմիզմի տոկոսային արժեքները որոշվել են հետևյալ առնչությամբ.  $(1-\varepsilon_b/\varepsilon_f)\cdot 100\%$ : Բոլոր տվյալները վերլուծվել են OriginPro8 համակարգչային ծրագրի օգնությամբ:

### **2.2.2. Ֆլուորեսցենսային սպեկտրոսկոպիա**

Ֆլուորեսցենցիան եռափուլ պրոցեսների ամբողջություն է, որը տեղի է ունենում որոշակի կառուցվածք ունեցող մոլեկուլների մոտ (հիմնականում պոլիարոմատիկ ածխաջրածիններ կամ հետերոցիկլեր), որոնք կոչվում են ֆլուորոֆորներ: Ֆլուորեսցենսային նմուշը ֆլուորոֆոր է, որը ունի հատուկ մոլեկուլային կառուցվածք՝ որոշակի ադանշաններին արձագանքելու կամ կենսաբանական նմուշի որոշակի հատվածում տեղայնացվելու համար: Ֆլուորոֆոր նմուշի կողմից լույսի առաքման երևույթը պատկերվում է էլեկտրոնային անցումների դիագրամով (Յաբլոնսկու դիագրամ), որը բերված է նկ. 20-ում:

**1-ին փուլ. գրգռում:**  $h\nu_{գրգ}$  էներգիայով ֆոտոնը, որը մոլեկուլին է հասնում արտաքին գրգռման աղբյուրից, մասնավորապես առաքման լամպից, կլանվում է ֆլուորոֆորի կողմից՝ մոլեկուլին բերելով գրգռված էլեկտրոնային վիճակի ( $S_2$ ,  $S_3$  և այլն): Այս պրոցեսը տարբերակում է ֆլուորեսցենցիան քեմիլյումինեսցենցիայից, քանի որ վերջինիս ժամանակ գրգռումը տեղի է ունենում քիմիական ռեակցիայի շնորհիվ:

**2-րդ փուլ. գրգռված վիճակում կյանքի տևողություն:** Ֆլուորոֆորը գրգռված վիճակում գտնվում է սահմանափակ ժամանակամիջոցում (հիմնականում 1-10 նանովայրկյան): Այս ժամանակամիջոցի ընթացքում ֆլուորոֆորը ենթարկվում է կոնֆորմացիոն փոփոխությունների և փոխազդում է շրջապատող այլ մոլեկուլների հետ:

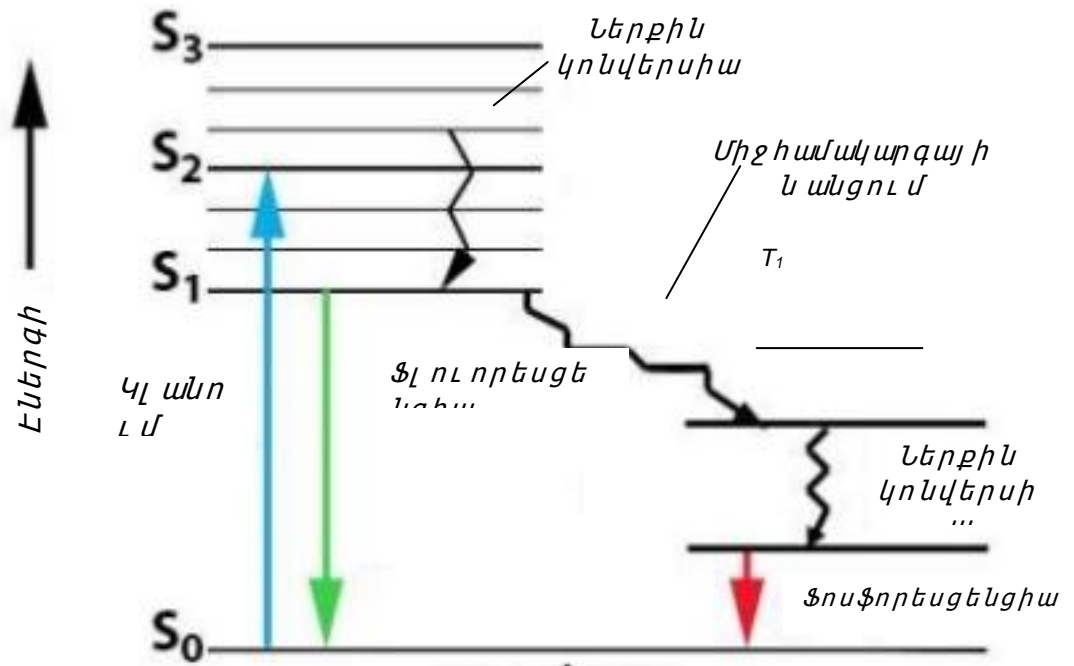
Այս երևույթները ունեն կարևոր հետևանքներ: Առաջինը, որ  $S_2$  կամ  $S_3$  վիճակների էներգիան ցրվում է (ներքին կոնվերսիա), որը բերում է ռելաքսացված  $S_1$  վիճակին, որից էլ տեղի է ունենում ֆլուորեսցենսային առաքումը: Երկրորդը, ոչ բոլոր մոլեկուլներն են, որոնք գրգռվելով վերադառնում են  $S_0$  հիմնական

վիճակը լույսի առաքմամբ: Կարող են տեղի ունենալ նաև բախումներով պայմանավորված մարում, \$L ու որեցենտային ռեզոնանսային էներգիայի անցում և միջհամակարգային անցումներ: \$L ու որեցենտային քվանտային ելքը, որը առաքած և կլանած ֆոտոնների թվի հարաբերությունն է, անմիջականորեն կապված է այս պրոցեսների հետ:

**3-րդ վոլյ. \$L ու որեցենտային առաքում:** \$L ու որոֆորը առաքում է  $h\nu_{\text{em}}$  էներգիայով ֆոտոն՝ վերադարձնելով \$L ու որոֆորը հիմնական  $S_0$  վիճակին: Գրգռված վիճակում էներգիայի ցրման հետևանքով ֆոտոնի առաքած  $h\nu_{\text{em}}$  էներգիան ավելի փոքր է, քան գրգռման  $h\nu_{\text{grq}}$  էներգիան, հետևաբար առաքումը տեղի ունի ավելի երկար ալիքային տիրույթում: էներգիաների կամ ալիքային երկարությունների այս տարբերությունը կոչվում է Ստոքսյան շեղում: \$L ու որեցենտային սպեկտրոսկոպիայի մեծ զգայունությունը հիմնականում պայմանավորված է Ստոքսյան շեղմամբ, քանի որ այն թույլ է տալիս որոշելու առաքված ֆոտոնները նույնիսկ չնչին ֆոնային \$L ու որեցենտային դեպքում: Մինչդեռ կլանման սպեկտրոֆոտոմետրիայի դեպքում անհրաժեշտ է, որ արձակված լույսի ինտենսիվությունը բավականին մոտ լինի ընկնող լույսի ինտենսիվությանը:

**\$L ու որեցենտային սպեկտրը:** \$L ու որեցենտային պրոցեսը ցիկլիկ է: Բացի այն դեպքից, երբ \$L ու որոֆորը անդարձելիորեն քայքայվում է գրգռված վիճակում (\$\text{ֆոտոքայքայում}\$), միևնույն \$L ու որոֆորը կարող է կրկնողաբար գրգռվել և առաքել լույսը: Այն փաստը, որ մեկ \$L ու որոֆորը կարող է առաքել հազարավոր ֆոտոններ, պայմանավորում է \$L ու որեցենտային մեթոդի բարձր զգայունությունը: Յաբլոնսկու դիագրամում պատկերված էլեկտրոնային անցումները լուծույթում բազմատոմ մոլեկուլների համար փոխարինվում են լայն սպեկտրներով, որոնք կոչվում են \$L ու որեցենտային գրգռման և առաքման սպեկտրներ: Այս սպեկտրների լայնությունները հատկապես կարևոր են կիրառական տեսանկյունից, քանի որ դրանց միջոցով հնարավոր է որոշել միաժամանակ երկու կամ ավելի \$L ու որոֆորներ [57]:

Սովորաբար, ֆլուորոֆորի նոսր լուծույթներում դրա գրգռման սպեկտրը նույնական է կլանման սպեկտրի հետ: Մյուս կողմից, միևնույն պայմանների դեպքում ֆլուորեսցենսային առաքման սպեկտրն անկախ է գրգռման ալիքի երկարությունից՝ պայմանավորված գրգռված վիճակում էներգետիկ կորուստներով, ինչպես ցույց է տրված նկ. 20-ում:



**Նկ. 20.** Յաբլոնսկու դիագրամը, որը պատկերում է լույսի կլանման և առաքման պրոցեսները [https://www.usabo-trc.org/src-content-information]:

**Ֆլուորեսցենսային սարքավորումներ:** ֆլուորեսցենցիայի չափումներում օգտագործվող սարքավորումները հիմնականում կազմված են հետևյալ մասերից. գրգռման աղբյուր, չափվող նմուշի համար նախատեսված խցիկ, լուսային ֆիլտրեր՝ առանձնացնելու համար առաքվող ֆոտոնները կլանվողներից և դետեկտոր, որը գրանցում է առաքող ֆոտոնները և ստեղծում գրանցելի ազդանշան (հիմնականում՝ էլեկտրական ազդանշան):

**Կիրառությունները:** Կան ֆլուորոֆորների խմբեր, որոնք նախատեսված են չափելու համար ներբջջային միջավայրում տեղի

ուևնեցող փոփոխությունները և այդ \$լուորոֆորների խումբը կոչվում է քանակաչափական \$լուորոֆորների խումբ: \$լուորոեցենտային ռեզոնանսային էներգիայի անցումը (\$ՌԷԱ) դիտվում է, երբ գրգռված վիճակում գտնվող մի \$լուորոֆորից (դոնոր) էներգիան ոչ ճառագայթային եղանակով անցնում է այլ \$լուորոֆոր մոլեկուլին (ակցեպտոր): \$ՌԷԱ-ի երևույթը և այնորեն կիրառվում է կենսաբանական համակարգերի՝ նուկլեինաթթուների, սպիտակուցների, որոշ մեմբրանների ուսումնասիրման նպատակով:

Սպիտակուցների ուսումնասիրությունը \$լուորոեցենտային եղանակով իրականացվում է անմիջականորեն, քանի որ դրանց բաղադրության մեջ մտնող ամինոթթվային մնացորդները՝ տրիպտոֆանը, թիրոզինը, ֆենիլալանինը, օժտված են \$լուորոեցենտելու հատկությամբ:

Մինչդեռ ԴՆԹ-ի ուսումնասիրությունը \$լուորոեցենտիայի միջոցով պահանջում է արտաքին նշանակրի կիրառում, քանի որ ԴՆԹ-ի սեփական \$լուորոեցենտիան շատ թույլ է արտահայտված: Այս նպատակով կիրառվում են մի շարք նշանակիրներ, որոնցից են էթիդիոլմի բրոմիդը, բեզիմիդազոլային ընտանիքի ներկայացուցիչները, ակրիդինների ներկայացուցիչները և այլ միացություններ, որոնք հիմնականում կառնոնային են:

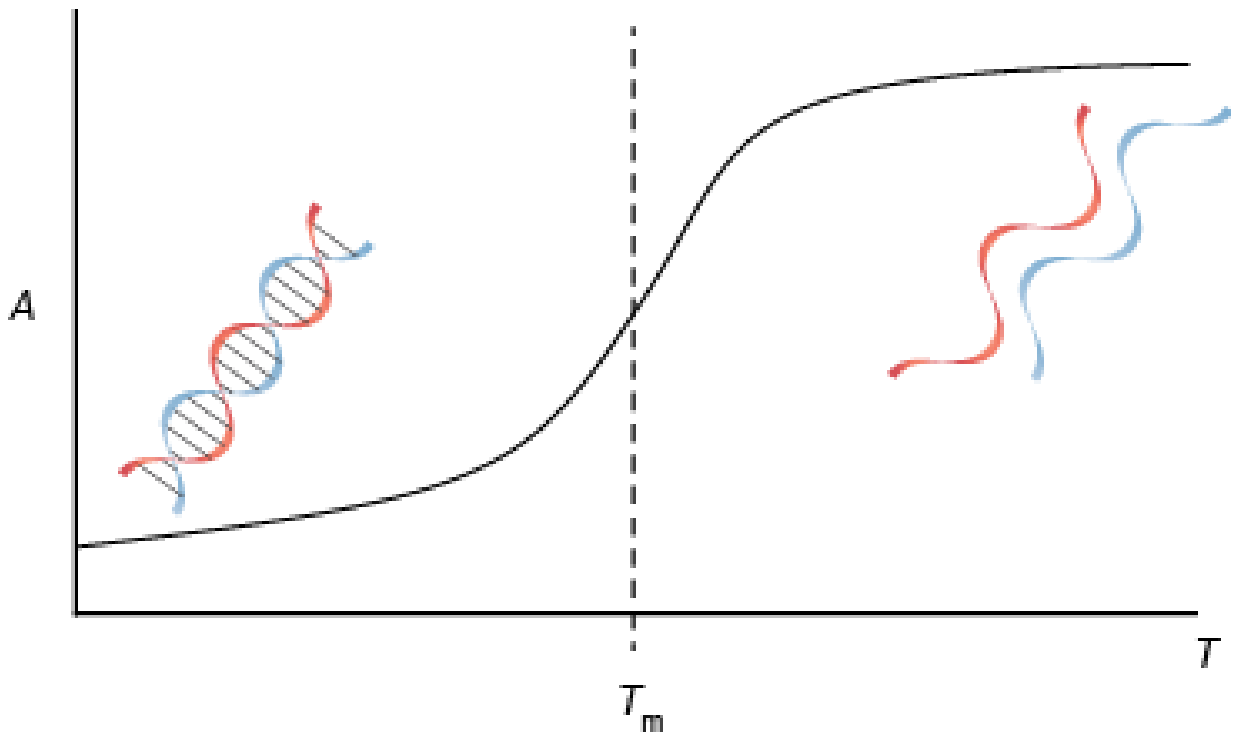
Սույն ատենախոսության փորձնական աշխատանքներում \$լուորոեցենտային չափումները իրականացվել են Varian Cary Eclipse սպեկտրոֆոտոմետրի միջոցով:

### **2.2.3. Էլեկտրոնային կլանման և \$լուորոեցենտային սպեկտրոսկոպիաների կիրառությունը ԴՆԹի ջերմային հալման ուսումնասիրություններում**

ԴՆԹ-ի ջերմային հալման ուսումնասիրման ամենատարածված մեթոդներից է Էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիան: ԴՆԹ-ի կլանման հատկությունները պայմանավորված են դրա պուրինային և պիրիմիդինային ազոտային հիմքերով: Նշված խմբերը տալիս են ընդհանուր կլանում 260 նմ ալիքի երկարության տակ: Ուստի

հետևելով 260 նմ ալիքի երկարության տակ ԴՆԹ-ի կլանմանը՝ հնարավոր է քանակապես նկարագրել դրա հետ կատարվող փոփոխությունները:

ԴՆԹ-ի հալմանը ժամանակ տեղի է ունենում կլանման մեծացում (սկ. 21): Այս հիպերբոլիկ երևույթը բացատրվում է հալման ընթացքում ԴՆԹ-ի հիմքերի միջև ջրածնական կապերի վերացմամբ [58]: Նույն երևույթների հիման վրամշակվել են մեթոդներ, որոնք կիրառվում են ԴՆԹ-ի հալումը ֆլուորեսցենսային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով ուսումնասիրելու համար: Նշենք, որ Hoechst 33258-ի և դրա ածանցյալների դեպքում ջերմաստիճանի բարձրացման հետ ԴՆԹ-ի գանդ կոմպլեքսի ֆլուորեսցենսային ինտենսիվությունը նվազում է:



**Նկ. 21.** ԴՆԹ-ի հալման կորի պարզագույն օրինակ  
 [http://www.atdbio.com/content/53/DNA-duplex-stability]

#### 2.2.4 Շրջանային դիքրոիզմի սպեկտրոսկոպիա

Շրջանային դիքրոիզմի սպեկտրոսկոպիան չափազանց զգայուն է կենսաաբլիմերների՝ ԴՆԹ-ի, սպիտակուլների հետ տեղի ունեցող կոնֆորմացիոն փոփոխությունները ուսումնասիրելու համար: Շրջանային դիքրոիզմի մեթոդը (ՇԴ) լույսի կլանման

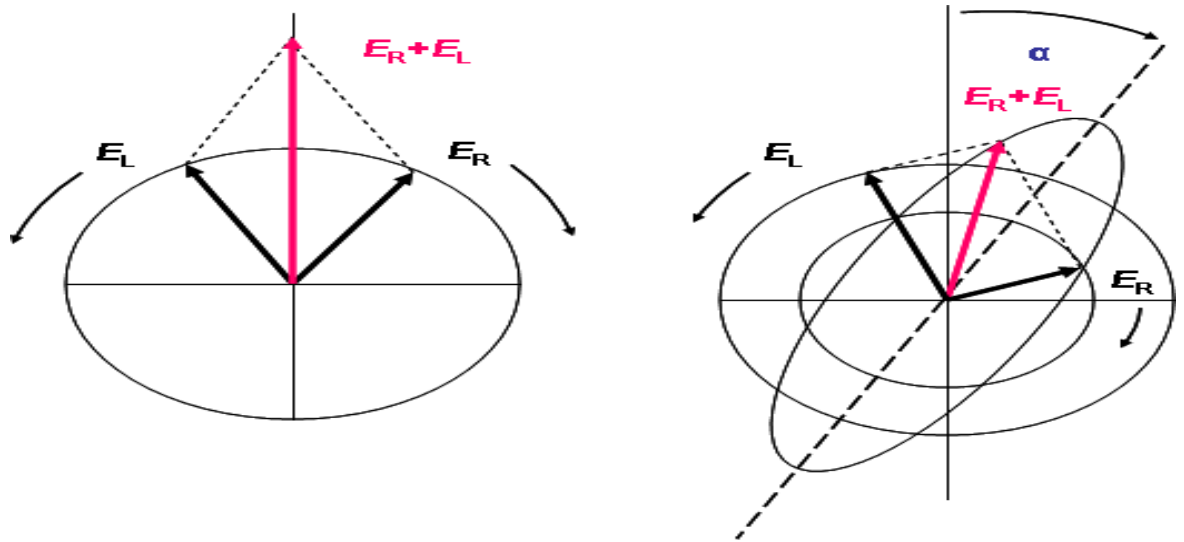
ձևերից մեկն է, որը չափում է մոլեկուլի կողմից աջ և ձախ բևեռացված լույսերի կլանման տարբերությունը (ի տարբերություն սովորաբար կիրառվող իզոտրոպ լույսի կլանման): Ասիմետրիկ քրոմոֆորները կամ ասիմետրիկ միջավայրում գտնվող սիմետրիկ քրոմոֆորները տարբեր ձևով են փոխազդում աջ և ձախ շրջանային բևեռացված լույսի հետ: Շրջանային բևեռացված ճառագայթները օպտիկապես ակտիվ միջավայրում շարժվում են տարբեր արագությամբ, որը պայմանավորված է նրանց տարբեր բեկման ցուցիչների արժեքներով, որը ընդունված է անվանել օպտիկական պտույտկամ շրջանային երկբեկում (նկ. 22):

Օպտիկական պտույտի կախվածությունը ընկնող լույսի ալիքի երկարությունից կոչվում է օպտիկական պտույտի դիսպերսիա: Աջ և ձախ շրջանային բևեռացված լույսը ևս կկլանվի տարբեր չափով տվյալ ալիքի երկարության դեպքում, որը կոչվում է շրջանային դիքրոիզմ: Օպտիկական պտույտի դիսպերսիայի շնորհիվ քիրալ մոլեկուլները կարող են պտտել բևեռացված լույսի հարթությունը: Օպտիկական պտույտի դիսպերսիայի սպեկտրները դիսպերս են (ամեն մի կլանման շերտի համար գործում է Կոտտնի էֆեկտը), մինչդեռ ՇԴ սպեկտրները արսորպտիվ են: Այս երկու երևույթները կապված են այսպես կոչված Կյոնին-Կրամերի ձևափոխմամբ:

Շրջանային դիքրոիզմը սահմանվում է որպես ձախ և աջ բևեռացված լույսերի կլանումների տարբերություն.

$$\Delta A = \Delta \epsilon c l \quad (3)$$

Որտեղ  $\Delta \epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r$  իրենից ներկայացնում է ձախ և աջ շրջանային բևեռացված լույսերի կլանման մոլային գործակիցների տարբերությունը,  $c$ -ն նմուշի կոնցենտրացիան է,  $l$ -ը օպտիկական ճանապարհը:



**Նկ. 22.** Գծային բևեռացված լույսի ներկայացումը որպես հակուղղված շրջանային բևեռացված լույսերի վերադրում, B. Աջ և ձախ բևեռացված լուսային ալիքների կլանման տարբերությունը, որը բերում է էլիպտականությանը և շրջանային դիֆրոիզմին [http://www.ruppweb.org/cd/cdtutorial.htm]:

Մուլային էլիպտականությանը որոշվում է հետևյալ արտահայտությամբ.

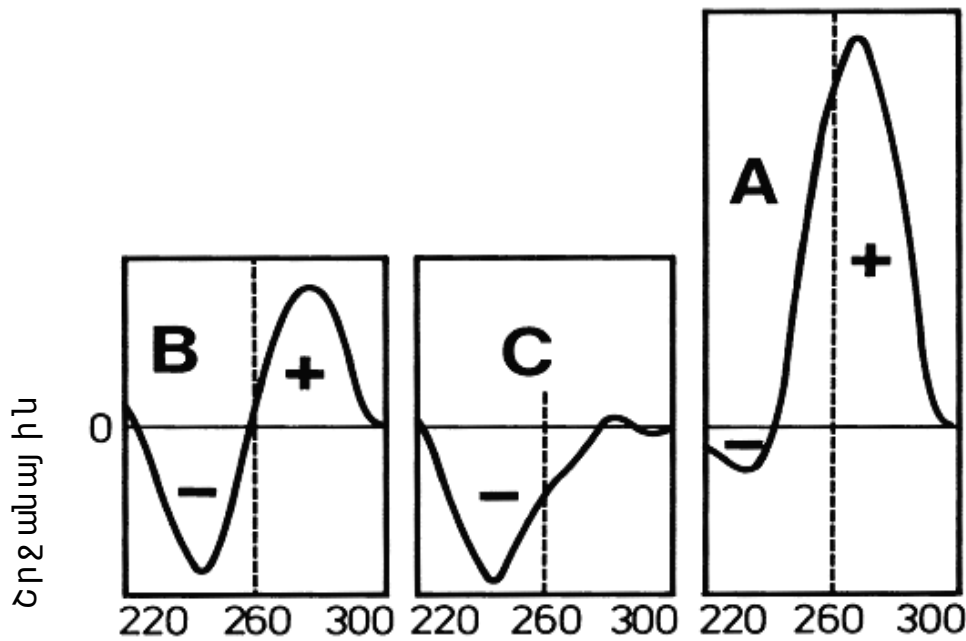
$$[\psi]=100 \psi / \text{cl} \quad (4)$$

Մուլային էլիպտականության և շրջանային դիֆրոիզմի միջև կապը տրվում է հետևյալ առնչությամբ.

$$[\psi]=3298 \Delta \varepsilon \quad (5)$$

ԴՆԹ-ն, որպես քիրալ կենտրոնների կրող մակրոմոլեկուլ բնութագրվում է շրջանային դիֆրոիզմի ազդանշաններով, որոնց փոփոխությունների հիման վրա կարելի է պատկերացում կազմել ԴՆԹ-ի հետ տեղի ունեցող կոնֆորմացիոն փոփոխությունների մասին:

Նկ. 23-ում բերված են ԴՆԹ-ի շրջանային դիֆրոիզմի սպեկտրները՝ կախված ԴՆԹ-ի կոնֆորմացիոն ձևերից:



Ալիքի  
երկարություն,  
նմ

**Նկ. 23.** ԴՆԹ-ի շրջանային կոնֆորմացիոն ձևերից (A, B, C) րները՝ կախված ԴՆԹ-ի

[<http://homepage.univie.ac.at/johannes.winkler/bin/research/topics/circular%20dichroism.php>]:

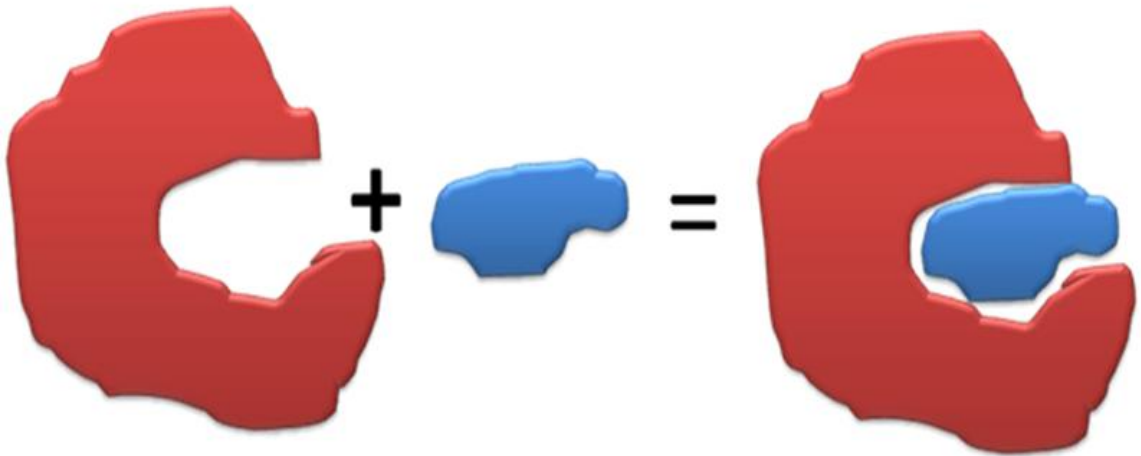
Փոքր մոլեկուլների կապումը ԴՆԹ-ին ուղեկցվում է ինդուկցված (մակածված) շրջանային դիքրոիզմի ազդանշանով, որը հայտ է գալիս, երբ ոչ քիրալ մոլեկուլը հայտվում է քիրալ ԴՆԹ-ի միջավայրում: Ինտերկալյատորների կապումը նկարագրվում է շրջանային դիքրոիզմի ազդանշանի նվազմամբ: Մինչդեռ ԴՆԹ-ի փոքր ակոսին կապվող լիգանդների կապումը ինդուկցում է ուժեղ և միշտ դրական շրջանային դիքրոիզմ, որը փաստում է, որ դիտվող անցման դիպոլ մոմենտը բևեռացված էն ակոսի ուղղությամբ [59, 60]: Այս աշխատանքում իրականացված չափումների ժամանակ շրջանային դիքրոիզմի սպեկտրները գրանցվել են Jasco 815 սպեկտրոֆոտոմետրի միջոցով:

### 2.2.5. Մոլեկուլային դոքինգի մեթոդը

Համակարգչային դոքինգը կիրառվում է երկու կամ ավելի մոլեկուլների կապման հնարավոր ձևերը կանխատեսելու համար: Վերջին տարիների հետազոտությունները թույլ են տվել զարգացնել բազմաթիվ մեթոդներ որոնք հնարավորություն են



տալ իս դոքինգի ենթարկել լիգանդները և դեղագործական նշանակություն միացությունները թիրախային մակրոմոլեկուլների վրա [61-68]: Մոլեկուլային դոքինգի սխեմատիկ պատկերումը բերված է նկ. 24-ում:



**Նկ. 24.** Դոքինգի սխեմատիկ պատկերումը, որը նման է «կողպեք-բանալի» սկզբունքին [http://www.intechopen.com/books/an-integrated-view-of-the-molecular-recognition-and-toxinology-from-analytical-procedures-to-biomedical-applications/computer-based-methods-of-inhibitor-prediction]

Համակարգչային դոքինգը հիմնված է երկու մեթոդների վրա. առաջինը՝ ուժային դաշտը՝ գնահատելու համար կոմպլեքսի գոյացման ազատ էներգիան, որը հիմնականում գնահատվում է՝ որպես սկզբնակետ վերցնելով որևէ կապված կոնֆորմացիան, և երկրորդը, փնտրել որևէ մեթոդ, որը թույլ է տալիս գտնել տարածությունն թիրախային մոլեկուլի և լիգանդի համար:

Հաճախ շատ մոտարկումներ պիտի կիրառվեն մեթոդի մշակման համար, ինչպես ուժային դաշտի, այնպես էլ կոնֆորմացիայի փնտրման համար, մինև ույն ժամանակ հաշվի առնելով համակարգչային հնարավորությունները: Այսպիսի մոտարկումներում կիրառվում են պարզեցված ուժային դաշտեր, սահմանափակ փնտրման տիրույթներ կամ սահմանափակվում են լիգանդի և/կամ թիրախի կոնֆորմացիոն շարժունակությունը [69]:

AutoDock շարքի ծրագրերը մշակվել են «Molecular graphic lab» լաբորատորիայի կողմից «Scripps Research Institute»-ում: Այդ ծրագրերը

հիմնված են մի շարք մոտարկումների վրա՝ կանխատեսելու համար կապման ազատ էներգիան և կոնֆորմացիոն հնարավորությունները դոքինգի ժամանակ: Այս մոտարկումները ընդունում են, որ լիգանդը շարժունակ է, բայց ի տարբերություն դասական մոլեկուլային մեխանիկայի մեթոդների, միայն պտտական ազատության աստիճաններն են հաշվի առնվում, պահպանելով կապի անկյունները և երկարությունները հաստատուն: Սա թույլ է տալիս կոորդինատների շատ արագ փոխարկում փնտրման ընթացքում, բայց կարող է խնդիր առաջացնել եթե կոմպլեքսը կապման ընթացքում պահանջում է լիգանդի կոնֆորմացիայի զգալի ձևափոխություններ:

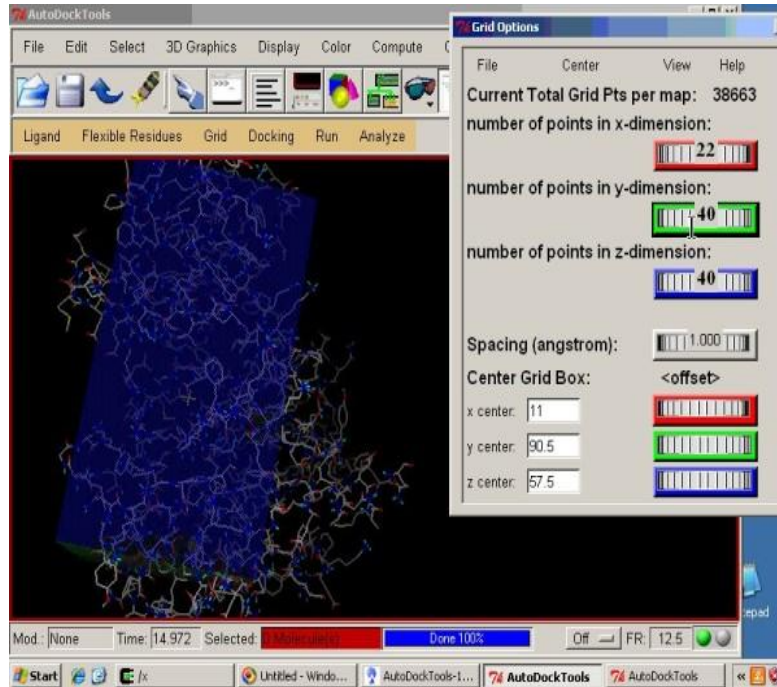
Էմպիրիկ ուժային դաշտի ազատ էներգիան հիմնված է մոլեկուլային մեխանիկայի ուժային դաշտի վրա, որը ընդգրկում է տիպիկ փոխազդեցությունները՝ ձգողական և վանման էներգիա, ջրածնական կապերի առաջացում, էլեկտրոստատիկ փոխազդեցություններ, դեսուլվատացիա և այլն: Հաշվման ֆունկցիայի կոնֆորմացիոն բաղադրիչը ներկայացվում է հետևյալ արտահայտությամբ.

$$\Sigma_{i,j} = f_{t_i t_j}(r_{ij}) \quad (6)$$

որտեղ գումարումը կատարվում է ըստ բոլոր ատոմային զույգերի, որոնք կարող են շարժվել մեկը մյուսի նկատմամբ: Այն բացառում է 1-4 փոխազդեցությունն, այսինքն այն ատոմների միջև առկա փոխազդեցությունները, որոնք բաժանված են երեք հաջորդական կապերով: Այս հավասարման մեջ ամեն մի  $i$  ատոմի համապատասխանում է  $t_i$  տիպը, և փոխազդեցության ֆունկցիաների  $f_{t_i t_j}$  սիմետրիկ շարքը  $r_{ij}$  փոխազդեցության հեռավորության դեպքում:

Լիգանդների և թիրախային մակրոմոլեկուլների ընտրության համար համացանցում առկա է տվյալների մեծ բազա (NCBI, eMolecules, ZINC և այլն): Auto Dock ծրագրի աշխատանքային պատուհանի պատկերը բերված է նկ. 25-ում: Դոքինգի արդյունում ստացված տվյալները թույլ են տալիս որոշել և վիզուալ ներկայացնել լիգանդի կոնֆորմացիան դոքինգի ենթարկված վիճակում, գնահատել լիգանդի խնամակցությունը թիրախային մակրոմոլեկուլների նկատմամբ, ինչպես նաև որոշել դոքինգի կոնֆորմացիոն

միջմոլեկուլային հեռավորությունները: Այս աշխատանքում մոլեկուլային հետազոտությունները կատարվել են AutoDock Vina համակարգչային ծրագրի միջոցով:



**Նկ. 25.** Auto Dock ծրագրի աշխատանքային պատուհանը  
[<http://vina.scripps.edu/>]

### 2.2.6. Ֆլուորեսցենսային անիզոտրոպիայի հիմունքները

Ֆլուորեսցենսային անիզոտրոպիան լայն կիրառություն ունի կենսաքիմիական և բժշկական հետազոտությունների բնագավառում [57, 70]: Մեթոդի հիմքում ընկած է այն հանգամանքը, որ բազմաթիվ ֆլուորոֆորներ, բևեռացված լույսով գրգռվելիս, ցուցաբերում են բևեռացված առաքումը: Անիզոտրոպիան ( $r$ ) բնութագրում է առաքման բևեռացման աստիճանը: Առաքման ապաբևեռացման պատճառ կարող են լինել միջարթ գործոններ, որը հիմնականում պայմանավորված է հետազոտվող նմուշի հատկություններով:

Բուրքոմոնոֆորները նկարագրվում են անցման մոմենտով, որը մոլեկուլի առանցքի նկատմամբ ունի որոշակի ուղղություն:

Անցման մոմենտի ուղղությունը փոխվում է պտտական դիֆուզիայի հետևանքով և հենց դա է ապաբևեռացնում առաքվող լույսը: Անիզոտրոպիայի չափումները թույլ են տալիս որոշել ու մոլեկուլի միջին անկյունային տեղաշարժը ֆոտոնի կլանման և դրան հաջորդող առաքման ընթացքում: Գրգռված վիճակում պտտական դիֆուզիայի չափը և արագությունը անմիջականորեն ազդում են անկյունային տեղաշարժի արժեքի վրա:

Տլուրենսցենտային անիզոտրոպիայի չափումների ընթացքում հետազոտվող նմուշը գրգռվում է ուղղահայաց ընկնող լույսով: Յետևաբար ընկնող լույսի էլեկտրական վեկտորը և z ուղղահայաց առանցքը գուգահեռ են: Դետեկտորը չափում է ճառագայթման ինտենսիվությունը, երբ այն անցնում է բևեռացուցիչի միջով: Երբ բևեռացուցիչը և գրգռող լույսի էլեկտրական վեկտորը գուգահեռ են, ապա ինտենսիվությունը նշանակվում է  $I_{VV}$ , իսկ երբ դրանք դասավորված են ուղղահայաց, ինտենսիվությունը նշանակվում է  $I_{VH}$  (Vertical և Horizontal բառերից): Ինտենսիվության այս արժեքների միջոցով չափվում է անիզոտրոպիայի արժեքը:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (7)$$

որտեղ G-ֆակտորը արտահայտվում է հետևյալ բանաձևով՝

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (8)$$

Անիզոտրոպիան չափման միավոր չունի և անկախ է նմուշի գումարային ինտենսիվությունից: Դա բացատրվում է նրանով, որ ինտենսիվությունների ( $I_{VV}-GI_{VH}$ ) տարբերությունը նորմավորվում է գումարային ինտենսիվությամբ, որը որոշվում է հետևյալ արտահայտությամբ.  $I_T = I_{VV} + 2GI_{VH}$ :

Ավելի հին գրականություններում, բժշկական աղբյուրներում ավելի հաճախ կիրառվում է բևեռացումը (P): Անիզոտրոպիայի և բևեռացման միջև կապը արտահայտվում է հետևյալ առնչությամբ՝

$$P = \frac{3r}{r+2} \quad (9)$$

Միջին անկյունային տեղաշարժը, որը առկա է կլանման և առաքման անցման մոմենտների միջև, որոշվում է հետևյալ արտահայտությամբ.

$$r = \frac{3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1}{2} \quad (10)$$

Անիզոտրոպիայի չափումներից ստացված տվյալները թույլ են տալիս քանակապես նկարագրել ինչպես մակրոմոլեկուլ-լիգանդ, այնպես էլ մակրոմոլեկուլ-մակրոմոլեկուլ փոխազդեցությունները: Ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի չափումները հավելյալ ինֆորմացիա են տրամադրում՝ իլրումն սովորական ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի: Անիզոտրոպիայի չափումները թույլ են տալիս քանակապես նկարագրել մոլեկուլի կողմնորոշումը մակրոմոլեկուլի նկատմամբ մոլեկուլի շարժունակությունը, սիմետրիան և այլն: Այս երևույթը պայմանավորված է այն հանգամանքով, որ մակրոմոլեկուլին կապվելիս փոփոխվում են ֆլուորոֆորի պտտական շարժման հատկությունները, որը անմիջականորեն դրսևորվում է նրա քանակապես ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրներում: Ուստի հետևելով ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի փոփոխություններին՝ կարելի է քանակապես ուսումնասիրել լիգանդ-մակրոմոլեկուլ փոխազդեցությունը:

Անիզոտրոպիայի չափումները թույլ են տալիս որոշել ու Դևի-ի և սպիտակուլցների կապման հաստատունները, որը դժվար է իրականացնել սովորական ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի չափումների միջոցով: Ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի առավելություններից են մեթոդի պարզությունը, անկախ լինելը ներքին ֆիլտրի էֆեկտից, իսկ սահմանափակումներից են կախվածությունը ֆլուորոֆորի տեղային պտտական շարժումներից,

մուլտիմեդիա չափսերի և զանգվածի փոփոխությունից:  
Անիզոտրոպիայի չափումները Լայնորեն կիրառվում են  
կենսաքիմիական, կենսաբժշկական և դիագնոստիկ նպատակներով:

### ԳԼՈՒԽ 3. ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ

#### 3.1 Hoechst 33258-ԴՆԹ կոմպլեքսի կայունությունը ուսումնասիրությունը

Որպես հետազոտությունների մեկնարկային կետ ուսումնասիրվել է Hoechst-ի ջրային լուծույթները ԴՄՍՕ-ի առկայությամբ: Hoechst-ի լուծույթների կենսաֆիզիկական ուսումնասիրությունները նախկինում կատարվել են [1, 2, 58, 71-74] աշխատանքներում: Hoechst-ԴՆԹ կոմպլեքսի գոյացումը հաստատվել է 350 նմ ալիքի երկարության տակ կլանման մեծ ազդանշանի առաջացմամբ [73]:

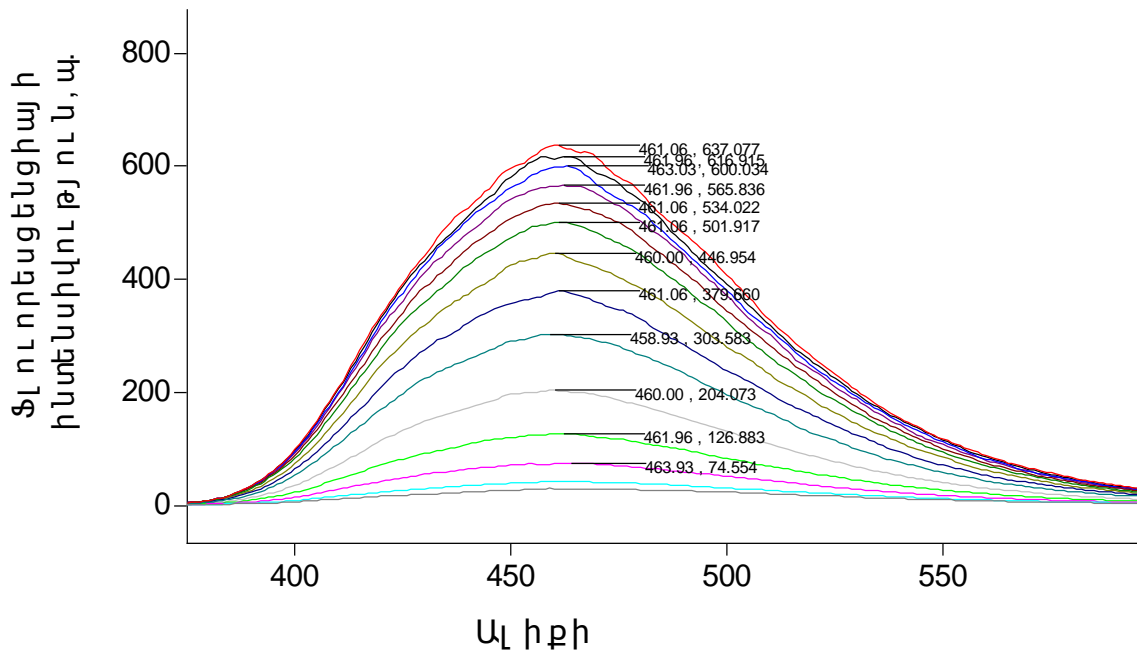
ԴՄՍՕ-ի հետ իրականացված հետազոտությունների ժամանակ իոնական ուժի արժեքը պահվել է հաստատուն և որոշվել է ԴՄՍՕ-ի ազդեցությունը ԴՆԹ-Hoechst կոմպլեքսի ջերմային կայունության վրա: Նախկինում կատարված աշխատանքները ցույց են տվել, որ ԴՄՍՕ-ն և նրա մերձավոր հոմոլոգները (ԴԵՍՕ և այլն) իջեցնում են ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանը [75, 76]:

ԴՄՍՕ-ի հետ իրականացված մեր հետազոտություններում կիրառվել են ինչպես էլեկտրոնային կլանման, այնպես էլ ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդները: Առաջին դեպքում ԴՆԹ-ի ջերմային հալմանը կորերը ստանալու համար հետևել ենք լուծույթի կլանման փոփոխությանը 260 նմ ալիքի երկարության տակ ջերմաստիճանի աստիճանական բարձրացման հետ ( $0.25^{\circ}\text{C}/\text{ր}$ ), իսկ ֆլուորեսցենտային չափումների իրականացման ժամանակ հետևել ենք լուծույթի առաքմանը 461 նմ ալիքի երկարության տակ (նկ. 26):

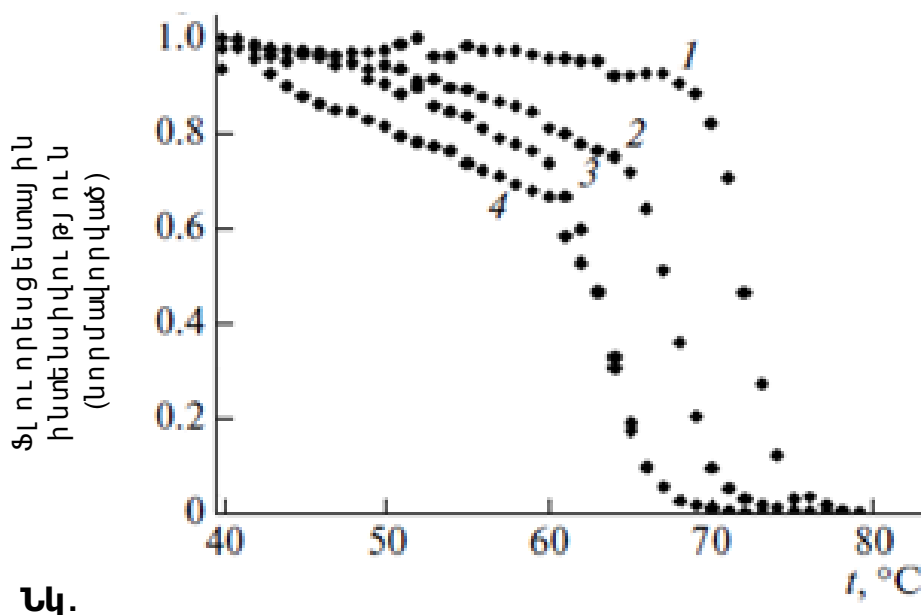
Նկ. 26-ում բերված են կոմպլեքսի ֆլուորեսցենտային սպեկտրները ջերմաստիճանի փոփոխման հետ (էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի չափումների ժամանակ գրանցվել են կոմպլեքսի կլանման արժեքները 260 նմ ալիքի երկարության տակ):

Նշված երկու մեթոդներով ստացված Hoechst-ԴՆԹ կոմպլեքսի հալման կորերը ստացվել են՝ կառուցելով ինտենսիվության

կախված ությունը ջերմաստիճանից: Ֆլուորեսցենսային մեթոդով ստացված հալման կորերը բերված են նկ. 27-ում:



**Նկ. 26.** ԴՆԹ-Hoechst 33258 կոմպլեքսի ֆլուորեսցենսային սպեկտրները 50-90 °C ջերմաստիճանային տիրույթում (ջերմաստիճանի բարձրացման հետ նվազում է ֆլուորեսցենսային ինտենսիվությունը): Չափումները իրականացվել են ցիտրատ բուֆերում (0.015 M NaCl, 0.0015 M նատրիումի ցիտրատ՝ Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · 5,5H<sub>2</sub>O, pH 7.5):



**Նկ.**

**27.** Hoechst-ԴՆԹ



կոմպլեքսի հալման կորերը՝ ստացված \$L\$ ու որոշեցնողային սպեկտրոսկոպիայի միջոցով. 1. 5% ԴՄՍՕ, 2. 10% ԴՄՍՕ, 3. 15% ԴՄՍՕ, 4. 20% ԴՄՍՕ:

Ստացված կորերի վերլուծության համար որոշվել են Hoechst-ԴՆԹ կոմպլեքսի հալման ջերմաստիճանները, որոնք ամփոփված են աղյուսակ 1-ում:

**Աղ. 1.**

Hoechst-ԴՆԹ կոմպլեքսի հալման ջերմաստիճանները որոշված էլեկտրոնային կլանման և \$L\$ ու որոշեցնողային սպեկտրոսկոպիաների միջոցով:

ԴՄՍՕ-ի ծավալային բաժինը, %	Hoechst-ԴՆԹ կոմպլեքսի հալման ջերմաստիճանները որոշված տարբեր մեթոդներով, Tm	
	Էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիա	\$L\$ ու որոշեցնողային սպեկտրոսկոպիա
0	71.2	73.3
5	69.5	71.8
10	68.2	67.6
15	66.3	63.1
20	64.6	62.4

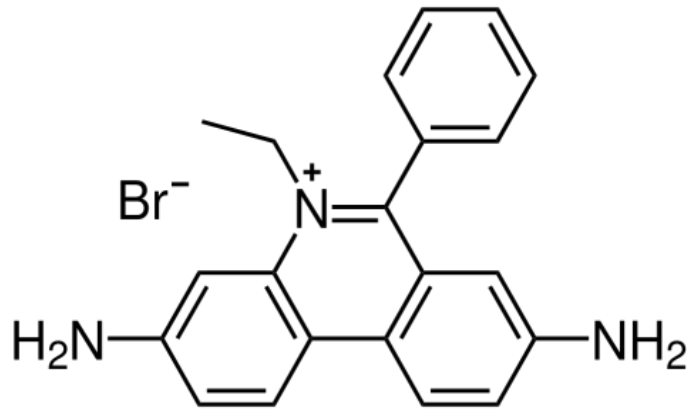
Նշված հետազոտության արդյունքում Hoechst/ԴՆԹ կոնցենտրացիոն հարաբերությունը պահպանվել է հաստատուն (0.1) և ԴՄՍՕ-ի ծավալային բաժինը փոփոխվել է 0-20 %: Ինչպես երևում է հալման կորերից և աղյուսակ 1-ի տվյալներից, ԴՄՍՕ-ի ավելացումը հանգեցնում է կոմպլեքսի հալման ջերմաստիճանի նվազման [77, 78]: Ստացված տվյալները խոսում են այն մասին, որ ԴՄՍՕ-ն նվազեցնում է կոմպլեքսի ջերմային կայունությունը: Այս երևույթը

պայմանավորված է ԴՄՍՕ-ի փոխազդեցությամբ ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերի հետ, որոնք հանգեցնում են ազոտային հիմքերի միջև ջրածնական կապերի քանդմանը [75, 76]: Ստացված արդյունքները կարող են հանդիսանալ ԴՆԹ-ի իգանդ փոխազդեցության համար «մոդելային» համակարգ, որը ներառում է օրգանական լուծիչի չնչին քանակություն: ԴՄՍՕ-ն կարող է կիրառվել որպես համալուծիչ՝ ջրային միջավայրում ԴՆԹ-ի լուծույթների ուսումնասիրման համար:

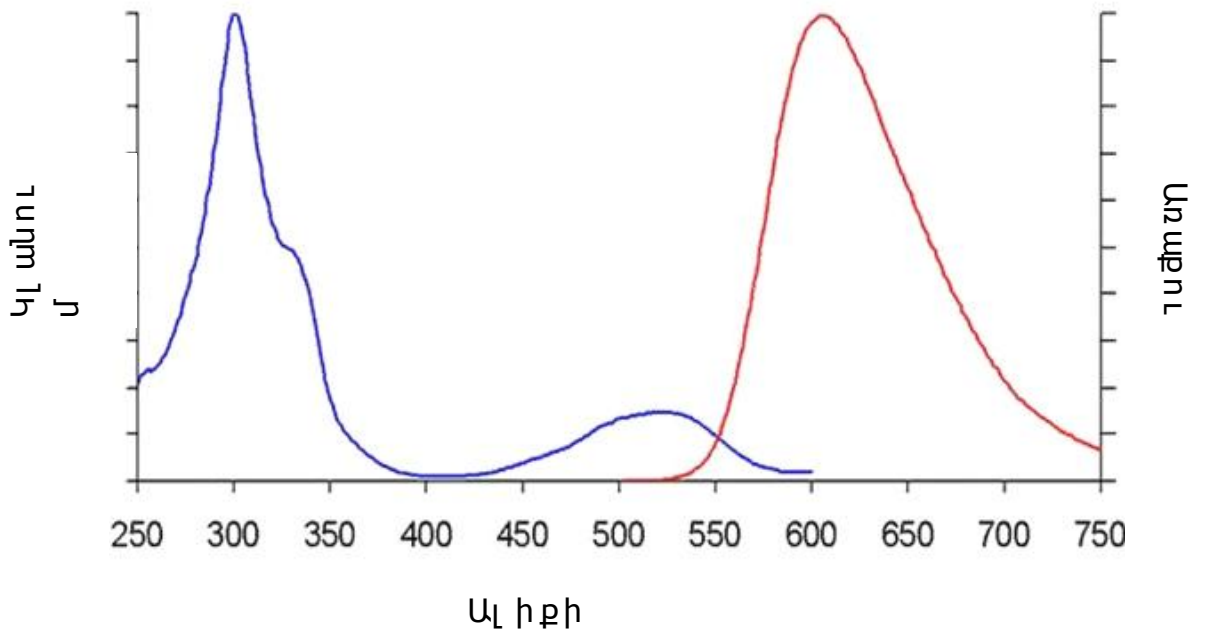
### **3.2. ԴՆԹ-էթիդումի բրոմիդի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը \$L\$ ուղորեցենտային անիզոտրոպիայի միջոցով**

Իրականացված փորձնական աշխատանքների հաջորդ մասը ներառում է հորթի թիմուսի ԴՆԹ-էթիդումի բրոմիդի (ԷԲ) փոխազդեցության ուսումնասիրությունը \$L\$ ուղորեցենտային բևեռացման (անիզոտրոպիայի) միջոցով:

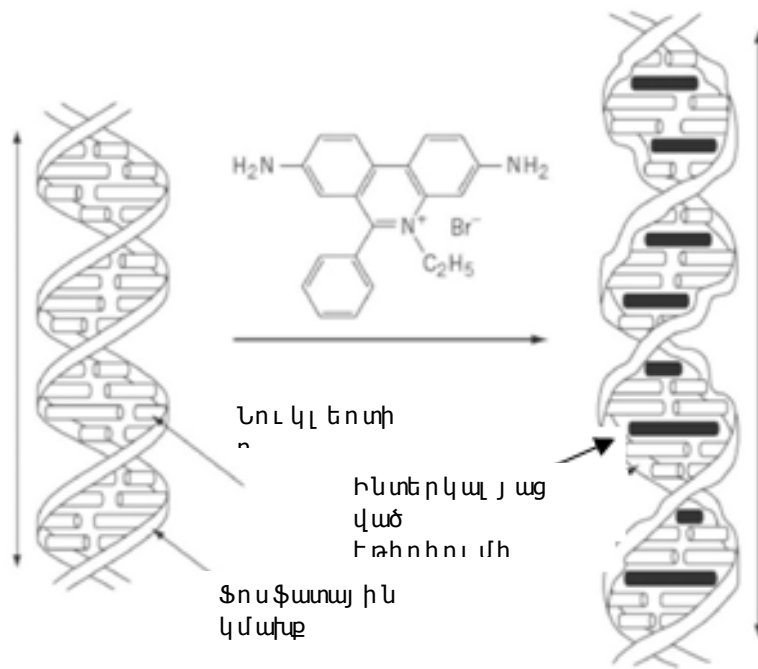
Հայտնի է, որ ԷԲ-ն կենսաբանական լաբորատորիաներում սովորաբար օգտագործվում է նուկլեինաթթուների ուսումնասիրման համար: Նրա կառուցվածքը բերված է նկ. 28-ում: Այն օգտագործվում է գիտահետազոտական լաբորատորիաներում՝ սպեկտրոսկոպիական մեթոդներով հետազոտությունների ժամանակ ԴՆԹ-ի մոլեկուլը ուսումնասիրելու համար, քանի որ ԴՆԹ-ն չի \$L\$ ուղորեցենցում: ԷԲ-ի մոլեկուլը ուղտրամանուշակագույն լույսով ճառագայթվելիս առաքում է տեսանելի մարզում (նկ. 29): ԷԲ-ի կառուցվածքը հիդրոֆոբ է և անցնելով ԴՆԹ-ի պարույրի ներքին տիրույթ (որը հիդրոֆոբ է)՝ ամուրվան դերվալսյան կապերով կապվում է նուկլեինաթթվի ազոտային հիմքերի հետ: Այսպիսի կապումը իրենից ներկայացնում է ինտերկալացիան, իսկ մոլեկուլները՝ ինտերկալատորներ (նկ. 30):



**Նկ. 28.** Էթիդիոլ մի բրոմիդի կառուցվածքը  
 [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ethidium\_bromide.svg]:



**Նկ. 29.** Էթիդիոլ մի բրոմիդի կլանման և առաքման սպեկտրները  
 [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15585011]:



**Նկ. 30.** Էթիդիումի բրոմիդի կապումը ԴՆԹ-ին ինտերկալյացիոն մեխանիզմով [http://what-when-how.com/molecular-biology/ethidium-bromide-molecular-biology/]:

*Ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի չափումներում օգտագործված նյութերը և հետազոտման եղանակը*

Իրականացված չափումներում օգտագործվել են Էթիդիումի բրոմիդ, հորթի թիմուկի ԴՆԹ, որոնք գնվել են “Sigma” ընկերությունից: Բոլոր լուծույթները պատրաստվել են ցիտրատային բուֆերում (0.015 M NaCl և 0.0015 M նատրիումի ցիտրատ (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · 5.5H<sub>2</sub>O), pH 7.5):

Չափումների ընթացքում նախ պատրաստվել է Էթիդիումի բրոմիդի համապատասխան կոնցենտրացիայով լուծույթ: Այնուհետև ավելացվել է համապատասխան կոնցենտրացիայով ԴՆԹ-ի լուծույթը: ԴՆԹ-ի և ԷԲ-ի կոնցենտրացիաները լուծույթում եղել են  $7.9 \cdot 10^{-5}$  M և  $5.8 \cdot 10^{-5}$  M, համապատասխանաբար:

Ֆլուորեսցենտային չափումները իրականացվել են Varian Cary Eclipse սպեկտրոֆոտոմետրի միջոցով: Օգտագործվել են 1 սմ օպտիկական ճանապարհով քվարցե կյուվետներ: Գրգռման ալիքի երկարությունը եղել է 520 նմ, իսկ առաքմանը հետևել ենք 605 նմ ալիքի երկարության տակ: Սպեկտրոֆոտոմետրի գրգռման և առաքման

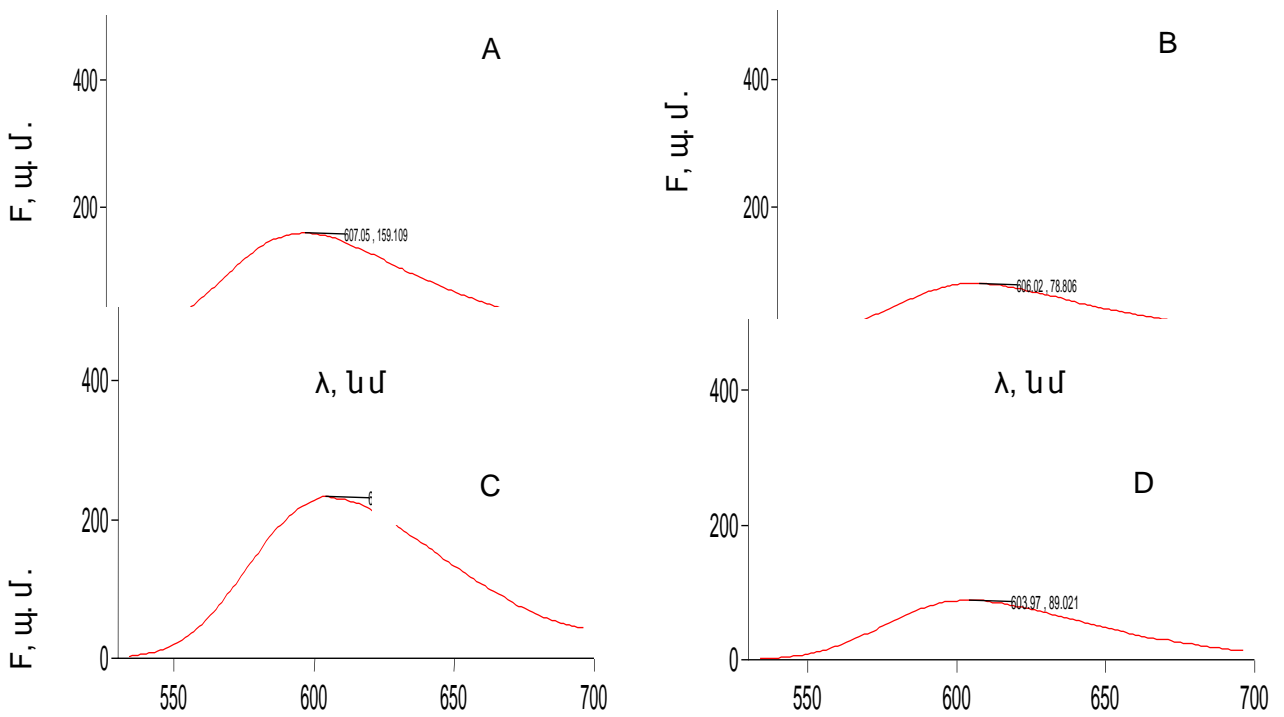
ճեղքերի համար լայնությունները ընտրվել են համապատասխանաբար 5 և 10 նմ: Չափումները իրականացվել են 22 °C ջերմաստիճանում: Ջերմաստիճանը հաստատուն է պահվել LAUDA A100 թերմոստատի օգնությամբ: Լուծույթի ջերմաստիճանը գրանցվել է ջերմաստիճանային ինդիկատորի օգնությամբ, որը հպման մեջ է եղել կյուվետի հետ:

ԴՆԹ-Էթիդիումի բրոմիդ կոմպլեքսի կայունությունը պայմանավորված է ԷԲ-ի դրական իոնների և հարևան ԴՆԹ-ի բացասականորեն լիցքավորված ֆոսֆատային խմբերի միջև առկա էլեկտրոստատիկ փոխազդեցություններով: Յետազոտությունները ցույց են տալիս, որ Էթիդիումի բրոմիդի կապումը ԴՆԹ-ին կախված է ԴՆԹ-ի հիմնային գույգեր/լիզանդ հարաբերությունից: Այս հանգամանքի որակական և քանակական բացատրությունը տալու համար անհրաժեշտ է հաշվի առնել մի քանի երևույթներ, որոնք կարող են բերել անիզոտրոպիայի փոփոխությանը՝ ապաբենջամանը: Այն մոդելները, որոնք կիրառվում են բացատրելու համար ստացված փորձնական արդյունքները, նկարագրում են ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսի պոտական դինամիկան և լիզանդի դասավորությունը ԴՆԹ-ի նկատմամբ:

Ապաբենջաման հիմնական պատճառները ԴՆԹ-ի շարժումն է և էներգիայի անցումը, որը տեղի է ունենում ԷԲ-ի մոլեկուլներից դեպի այլ մոլեկուլները՝ ԴՆԹ-ի մեծ պարունակության դեպքում: Բոլոր դեպքերում, փորձնականորեն կարելի է չափել միայն ընդհանուր ապաբենջամանը: Յետևյալ գործոնները կարող են հարուցել միևնույն անիզոտրոպիան. մեծ պոտական շարժում՝ ուղեկցվող փոքր ֆանկյունով, որը կազմվում է ԷԲ անցման դիպուկ մոմենտի և ԴՆԹ-ի առանցքին ուղղահայաց հարթության միջև, կամ փոքր պոտական շարժմամբ և միևնույն ժամանակ հարաբերականորեն մեծ ֆանկյամբ: Այս անորոշություններից ազատվելու համար անհրաժեշտ է ընդունել, որ պոտական շարժումը բնութագրող մեծությունները կամ ֆանկյունը հաստատուն են մնում: Էթիդիումի բրոմիդը նկարագրվում է մեծ գրգռված վիճակում կյանքի տևողությամբ՝ 25 նվ և մեծ ֆանկյամբ՝ 70°: ԴՆԹ-ի փոքր

պարունակությունների դեպքում ԴՆԹ-Էթիդիումի բրոմիդ կոմպլեքսի ֆանկյան արժեքը կարելի է ընդունել հաստատուն: Այս ընդունելությունը պայմանավորված է այն հանգամանքով, որ ԴՆԹ-մեծ պարունակությունների դեպքում Էթիդիումի բրոմիդը կապվում է ինտերկալացիոն մեխանիզմով, որի հետևանքով ԴՆԹ-կրկնակի պարույրը մասամբ քանդվում է: Մեր կողմից իրականացված չափումներում որոշվել է ԴՆԹ-ԷԲ համակարգի անիզոտրոպիան և անցման դիպոլ մոմենտի անկյունային տեղաշարժը, որը տեղի է ունենում գրգռման և առաքման ընթացքում: Այս մոտեցումը հնարավոր է կիրառել՝ հետազոտելու համար մի շարք գործոնների ազդեցությունը ԴՆԹ-Էթիդիումի բրոմիդ համակարգի վրա:

Էթիդիումի բրոմիդի մոլեկուլները, փոխազդելով ԴՆԹ-ի հետ, դառնում են քիչ շարժուն, քան ազատվիճակում, ինչը հանգեցնում է \$F\$ ու որոշեցնտային անիզոտրոպիայի մեծացմանը: Այսինքն, հետևելով անիզոտրոպիայի փոփոխությանը, հնարավոր է քանակապես նկարագրել ԴՆԹ-ի հետ տեղի ունեցող կառուցվածքային փոփոխությունները, որոնք պայմանավորված են տարբեր գործոնների ազդեցությամբ, ինչպիսիք են pH-ը, ջերմաստիճանը, լուծույթում աղերի քանակությունը և խառը լուծիչների (ջուր / օրգանական լուծիչ) կիրառումը [57]: Սույն աշխատանքում որոշվել է ԴՆԹ-ին կապված Էթիդիումի բրոմիդի անիզոտրոպիան: Նկ. 31-ում բերված են այդ համակարգի \$F\$ ու որոշեցնտային սպեկտրները բևեռացուցիչների տարբեր կողմնորոշումների դեպքում:



λ, նմ

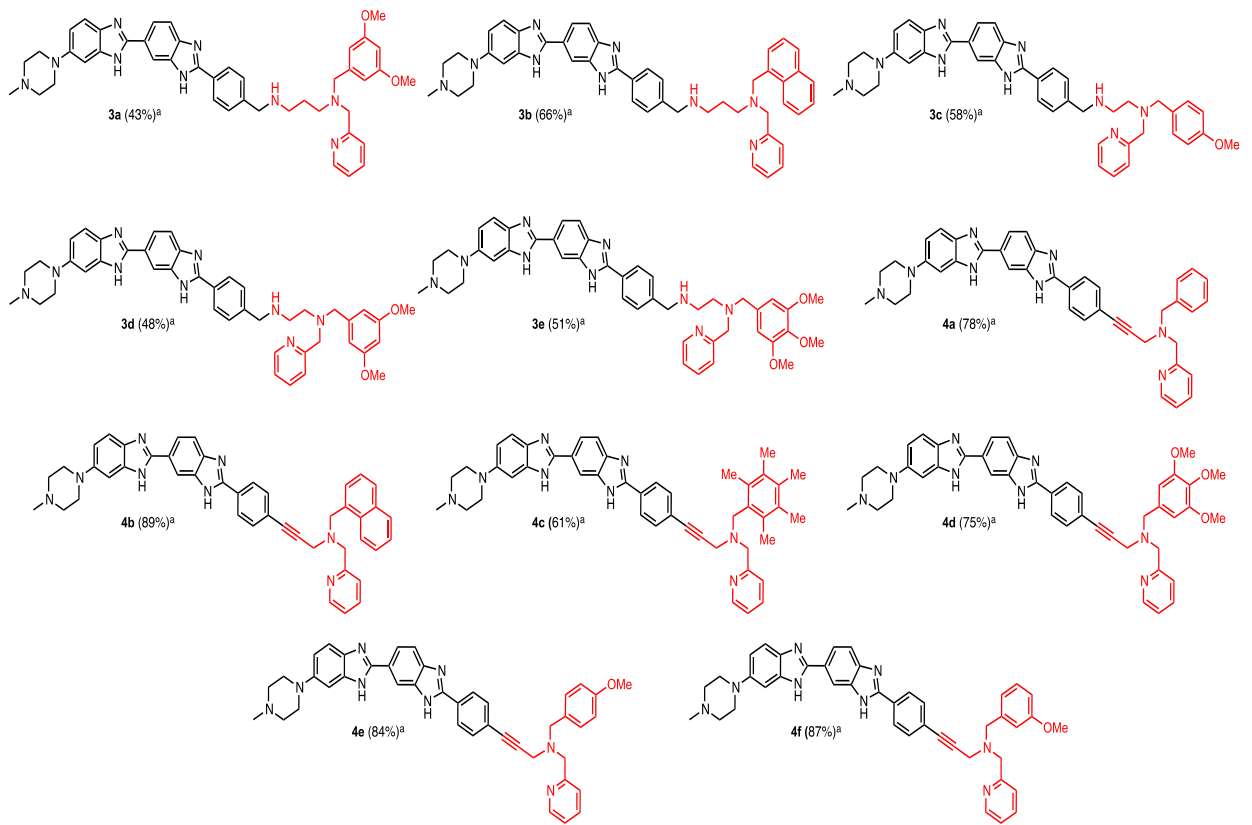
λ, նմ

**Նկ. 31.** ԴՆԹ-էթիդիուլմի բրոմիդ կոմպլեքսի \$L\$ ու որոշ ցենտային սպեկտրները բևեռացուցիչների տարբեր դիրքերի դեպքում. A. HV, B. HH, C. VV, D. VH:

\$L\$ ու որոշ ցենտային ինտենսիվությունների արժեքների հիման վրա, ըստ (7) բանաձևի, որոշվել է ԴՆԹ-ին կապված էթիդիուլմի բրոմիդի անիզոտրոպիայի արժեքը, որը հավասար է եղել 0.09: Ելնելով անիզոտրոպիայի այդ արժեքից, (10) բանաձևի միջոցով որոշվել է թանկյան միջին արժեքը, որը կազմել է 51<sup>0</sup>: Այս հաշվարկը իրականացվել է՝ ընդունելով, որ էթիդիուլմի բրոմիդի մոլեկուլը սիմետրիկ է շուղղահայաց առանցքի նկատմամբ [57]:

**3.3. Hoechst-ի նոր ածանցյալների կառուցվածքը և տարբեր ԴՆԹ-ների հետ դրանց փոխազդեցության ուսումնասիրման համար կիրառված մեթոդները**

Կատարված հետազոտությունների հաջորդ մասը ընդգրկում է Hoechst-ի նոր ածանցյալների և տարբեր ԴՆԹ-ների փոխազդեցության ուսումնասիրությունը: Նշված ածանցյալների ընդհանուր կառուցվածքը բերված է նկ. 32-ում: Այդ ածանցյալները կարելի է բաժանել երկու խմբի՝ «ամին» և «ալկին» տիպի ածանցյալներ: Առաջին դեպքում Hoechst-ի մոլեկուլի մնացորդը պարզ կապով կապված է դիամինային շղթա պարունակող խմբին, իսկ «ալկին» տիպի ածանցյալներում այն եռակի կապով կապված է երրորդային ամինին:



**Նկ. 32.** Hoechst-ի նոր ածանցյալների կառուցվածքը:

Hoechst-ի նոր ածանցյալների խնամակցումը ունը տարբեր ԴՆԹ-ների նկատմամբ գնահատվել է բազմակողմանիորեն, և, մասնավորապես, խնդիր է դրված եղել պարզել ու, թե ինչպես է ազդում մոլեկուլի կառուցվածքի փոփոխությունը ԴՆԹ-ի նկատմամբ խնամակցումն վրա: Այդ հետազոտությունները իրականացվել են էլեկտրոնային կլանման և ֆլուորեսցենսային սպեկտրոսկոպիաների, շրջանային դիֆրոիզմի, ԴՆԹ-ի ջերմային հալման և մոլեկուլային դոկինգի (docking) մեթոդներով: Ստորև ներկայացված են այդ հետազոտությունների արդյունքները, որոնք հրատարակվել են [79] աշխատանքում:

**3.4. ԴՆԹ-ի նկատմամբ Hoechst-ի նոր ածանցյալների խնամակցումն ուսումնասիրությունը** **էլեկտրոնային** **կլանման սպեկտրոսկոպիայի միջոցով**

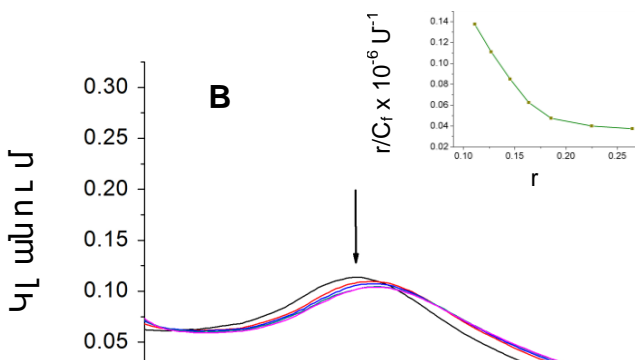
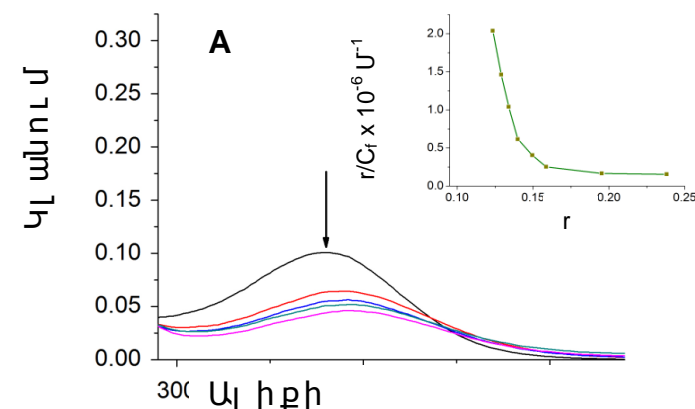
ԴՆԹ-ի և Hoechst-ի ածանցյալների փոխազդեցության ուսումնասիրությունը նախնառաջ իրականացվել է էլեկտրոնային



կլանման սպեկտրոսկոպիայի միջոցով: Որպես համեմատական նմուշ իրականացվել է նաև ոչ մոդիֆիկացված Hoechst-ի և ԴՆԹ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը: Էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի չափումներում օգտագործվել է ինչպես հորթի թիմուսի ԴՆԹ, այնպես էլ պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]: Hoechst-ի ածանցյալների կլանման սպեկտրերը գրանցվել են ԴՆԹ-ի աստիճանական ավելացման հետ, որը հնարավորություն է տալիս քանակապես նկարագրելու նրանց փոխազդեցությունը: Նշված ածանցյալների կապման հաստատունները որոշվել են ելնելով (1) հավասարումից: Նշված միացություններից 3a-ի և 4b-ի կլանման սպեկտրերը հորթի թիմուսի լուծույթով տիտրման ընթացքում բերված են նկ. 33-ում:

Hoechst-ի ածանցյալների լուծույթների տիտրման տվյալները ցույց են տալիս, որ «ամին» տիպի ածանցյալները հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ով տիտրման ժամանակ նկարագրվում են ավելի խորը հիպոքրոմիկ էֆեկտով (300-400 նմ տիրույթում մինչև 65%), քան նրանց «ալկին» անալոգները: Սահառկապես ընգծված արտահայտվել է 3a-ի համար, որը ցուցաբերում է խորը հիպոքրոմիկ էֆեկտ, ինչպես նաև «կարմիր շեղում» տիտրման ընթացքում:

Մինչդեռ «ալկին» անալոգները նկարագրվում են ավելի փոքր հիպոքրոմիկ էֆեկտով, ինչպես ցույց է տրված նկ. 33 B-ում 4b ածանցյալի օրինակով (8%):



## Ալիքի

**Նկ. 33.** 3a-ի (A) և 4b-ի (B) կլանման սպեկտրները հորթի թիմուսի լուծույթով տիտրման ընթացքում: Սլաքները ցույց են տալիս կլանման նվազումը 341 և 355 նմ ալիքի երկարությունների տակ (3a-ի և 4b-ի համար, համապատասխանաբար):

Նկ. 33-ում փորձնական պայմանները հետևյալն են. 4 մկՄ սկզբնական կոնցենտրացիայով լիգանդի լուծույթը տիտրվել է հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ի լուծույթով, [ԴՆԹ]=0-32 մկՄ, կակոդիլատ բուժերում՝ 100 մՄ NaCl, 10մՄ նատրիումի կակոդիլատ, pH=7.4, 25 °C: Ներդրված նկարները ներկայացնում են Սկետչարդի կորերը, որոնց հիման վրա որոշվել են կապման հաստատունները:

Հիմնվելով էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի չափումներից ստացված տիտրման կորերից՝ որոշվել են Hoechst-ի ածանցյալների և հորթի թիմուսի կապման հաստատունների արժեքները: Ստացված բոլոր սպեկտրոսկոպիական արդյունքները բերված են աղյուսակ 2-ում:  $\Delta E$  մեծությունը իրենից ներկայացնում է տիտրման արդյունքում ալիքային շեղումը՝ արտահայտված ալիքային թվերով:

## Աղ. 2.

Hoechst-ի ածանցյալների և հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրման արդյունքները, որոնք ստացվել են էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով:

Միացություն	$\lambda_{max}$ ազատ լիգանդ	$\lambda_{max}$ կապված լիգանդ (նմ)	$\Delta E$ ( $nm^{-1}$ )	% հիպոթրոմ իզմ (ալիքի երկարությ.	$\epsilon_{ազատ}$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	$\epsilon_{կապված}$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	$K_a \times 10^{-6}, M^{-1}$

	(μf)			jnL u, μf)			
<b>3a</b>	341	352	916	65 (341)	25,500	8,920	3.24(±0.3)
<b>3b</b>	344	352	661	62 (344)	24,500	9,310	2.40(±0.2)
<b>3c</b>	340	349	758	45 (340)	19,500	10,730	1.00(±0.1)
<b>3d</b>	338	346	684	55 (338)	21,250	9,560	1.20(±0.1)
<b>3e</b>	343	348	419	60 (343)	25,000	10,000	1.60(±0.1)
<b>4a</b>	355	358	236	8 (355)	28,750	26,450	0.15(±0.02)
<b>4b</b>	352	358	476	17 (352)	25,750	21,370	0.75(±0.1)
<b>4c</b>	350	354	323	14 (350)	22,450	19,310	0.65(±0.05)
<b>4d</b>	355	360	391	12 (355)	18,500	16,280	0.54(±0.03)
<b>4e</b>	347	354	570	10 (347)	22,570	20,540	0.35(±0.03)
<b>4f</b>	349	357	640	9(349)	20,600	18,950	0.28(±0.01)

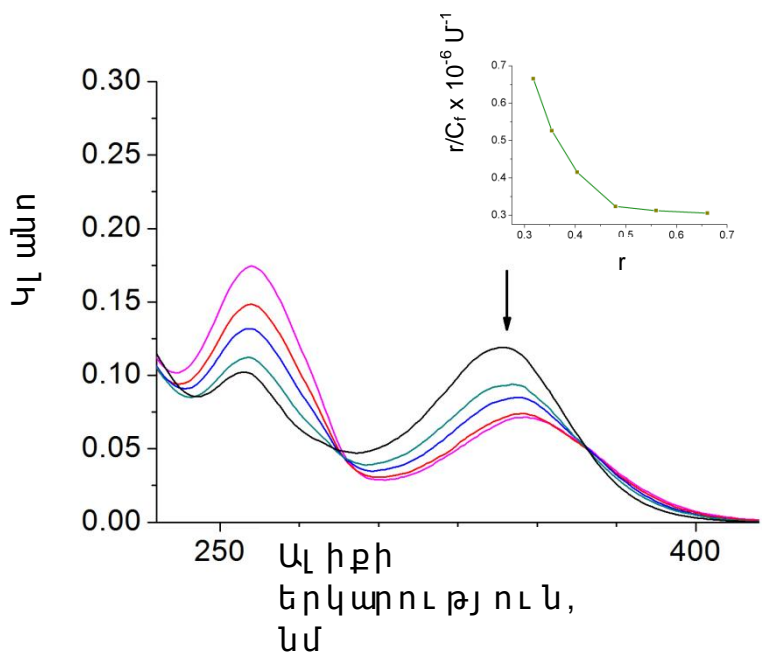
Ինչպես երևում է աղյուսակ 2-ից, ՅԹ-ԴՆԹ-ի նկատմամբ ամենամեծ խնամակցությունը ցուցաբերում է 3a միացությունը: Դա հիմնականում պայմանավորված է դիամինոպրոպիլ շղթայի առկայությամբ, որը ապահովում է մոլեկուլի ֆունկցիոնալ խմբերի շարժունակությունը, և դրանց հասանելի լինելը ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերի և ֆոսֆատային խմբերի համար: Այս արդյունքը ապահովվում է նաև մնացած «ամին» ածանցյալների համար, որոնք նույնպես ցուցաբերում են մեծ խնամակցություն ԴՆԹ-ի նկատմամբ (3c, 3d, 3e միացությունները): Միևնույն ժամանակ, կարևոր է նշել նաև լիցքավորված ազոտի ատոմի բացակայությունը թուլացնում է նույնպես ցուցաբերում է ԴՆԹ-ի նկատմամբ խնամակցությունը: Ի դեմս «ամին» ածանցյալների, «ալկին» ածանցյալները նկարագրվում են ԴՆԹ-ի նկատմամբ փոքր խնամակցությամբ: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ «ալկին» ածանցյալների և ԴՆԹ-ի միջև առկա վան դեր վալսյան փոխազդեցությունները թուլյլ են և մոլեկուլի տարբեր խմբերի քիչ շարժունակ լինելը, ինչպես նաև մեկ լիցքավորված ազոտի ատոմի բացակայությունը թուլացնում են ԴՆԹ-ի հետ ջրածնական կապերով և էլեկտրոստատիկ ուժերով պայմանավորված փոխազդեցություններ: Միևնույն ժամանակ, «ալկին» ածանցյալների պարագայում նույնպես, նաև լիցքավորված ազոտի առկայությունը մեծացնում է ԴՆԹ-ի նկատմամբ խնամակցությունը (4b միացության օրինակով): 3a միացության համար ու պարամետրի արժեքը կազմում է 6.8 (ալկին ածանցյալների համար ու-ի արժեքը ընկած է 4.5-5 տիրույթում):

Մյուս կարևոր արդյունքը, որը ստացվել է ԴՆԹ-ի հետ փոխազդեցության ուսումնասիրման արդյունքում, այն է, որ մետոքսի տեղակալումը նպաստում է ԴՆԹ-ի նկատմամբ խնամակցության մեծացմանը: Ինչպես երևում է աղյուսակ 2-ից, 3e միացության պարագայում, որը պարունակում է երեք մետոքսի խմբեր, որոնք կապված են արոմատիկ օղակին, ցուցաբերում է ավելի մեծ խնամակցություն ԴՆԹ-ի նկատմամբ, քան 3c և 3d-ն, որոնք պարունակում են համապատասխանաբար մեկ և երկու մետոքսի խմբեր: Այս արդյունքը հավանաբար պայմանավորված է մետոքսի

տեղակալ իջների էլեկտրոն-դոնոր հատկությամբ, ինչպես նաև տարածական (ստերիկ) ֆակտորներով, որոնք նպաստում են կապմանը: Նման երևույթ դիտվում է նաև 4c միացության պարագայում, որտեղ որպես տեղակալ իջն հանդես են գալիս էլեկտրոդոնոր մեթիլ խմբերը: Ի հավելում, ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ պարամետոքսի տեղակալված ածանցյալը ցուցաբերում է ավելի բարձր խնամակցություն ԴՆԹ-ի նկատմամբ, քան մետատեղակալվածը (4e և 4 f միացությունների օրինակով):

### 3.5. Պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետկապման ուսումնասիրությունները

Էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի մեթոդը կիրառվել է նաև ուսումնասիրելու համար նշված լիգանդների խնամակցությունը պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ: Պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ն (պոլիդեօքսիադենիլ թիմինիլ նուկլեինաթթվի նատրիումական աղը) հանդիսանում է կրկնակի շղթայով սինթետիկ ԴՆԹ: Այն կիրառվում է կենսաքիմիական հետազոտություններում ադենին և թիմին ազոտային հիմքերի հետ լիգանդների փոխազդեցության ուսումնասիրության ժամանակ: Պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ով 3a միացության տիտրման կորերը ներկայացված են նկ. 34-ում:



**Նկ. 34.** 3a միա լորերը պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ով ստացված էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով:

Նկ. 34-ում փորձնական պայմանները հետևյալն են. 4 մկՄ սկզբնական կոնցենտրացիայով լիգանդի լուծույթը տիտրվել է

հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ի լուծույթով, [ՐԹ-ԴՆԹ]=0-32 մկՄ, կակոդիլատ բուժերում՝ 100 մՄ NaCl, 10մՄ նատրիումի կակոդիլատ, pH=7.4, 25 °C: Ներդրված նկարները ներկայացնում են Սկետչարդի կորերը, որոնց հիման վրա որոշվել են կապման հաստատունները:

Աղ. 3.

Պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ Hoechst-ի ածանցյալների կապման հաստատունների և հիպոթրոմիկ էֆեկտի արժեքները:

<i>Միացույթը</i>	<i>% հիպոթրոմիկ էֆեկտ (ալիքի երկ., նմ)</i>	<i>K<sub>a</sub> × 10<sup>-5</sup>, Մ<sup>-1</sup></i>
<b>3a</b>	35 (341)	8.5(±0.3)
<b>3b</b>	23 (344)	5.2(±0.2)
<b>3c</b>	25 (340)	5.5(±0.1)
<b>3d</b>	26 (338)	7.2(±0.1)
<b>3e</b>	30 (343)	7.8(±0.1)
<b>4a</b>	<i>Հիպոթրոմիկ էֆ.,</i> 4 (355)	-*
<b>4b</b>	7 (352)	-
<b>4c</b>	1 (350)	-
<b>4d</b>	2 (355)	-
<b>4e</b>	<i>Հիպոթրոմիկ էֆ.,</i> 7 (347)	-

<b>4f</b>	<i>Հիպերքրոմիկ ԷՖ., 5 (349)</i>	-
-----------	---	---

\* որոշված չէ

Այս նուկլեինաթթվի հետ փոխազդեցության ժամանակ ևս տիրման կորերը նկարագրվում են հիպերքրոմիկ էֆեկտով («ալկին» ածանցյալների դեպքում դիտվում է հիպերքրոմիկ էֆեկտ): Այնուամենայնիվ, պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ով տիրման ժամանակ առավելագույն հիպերքրոմիկ էֆեկտը չի գերազանցում 35 %-ը: Յամիացությունը այս դեպքում ևս ցուցաբերում է առավելագույն խնամակցությունը պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի նկատմամբ, մինչդեռ այնուհետև համեմատաբար փոքր կապման հաստատուն պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի նկատմամբ, ի համեմատ ՅԹ-ԴՆԹ-ի ( $8.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ): Պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ կապման հաստատունների արժեքները բերված են աղյուսակ 3-ում:

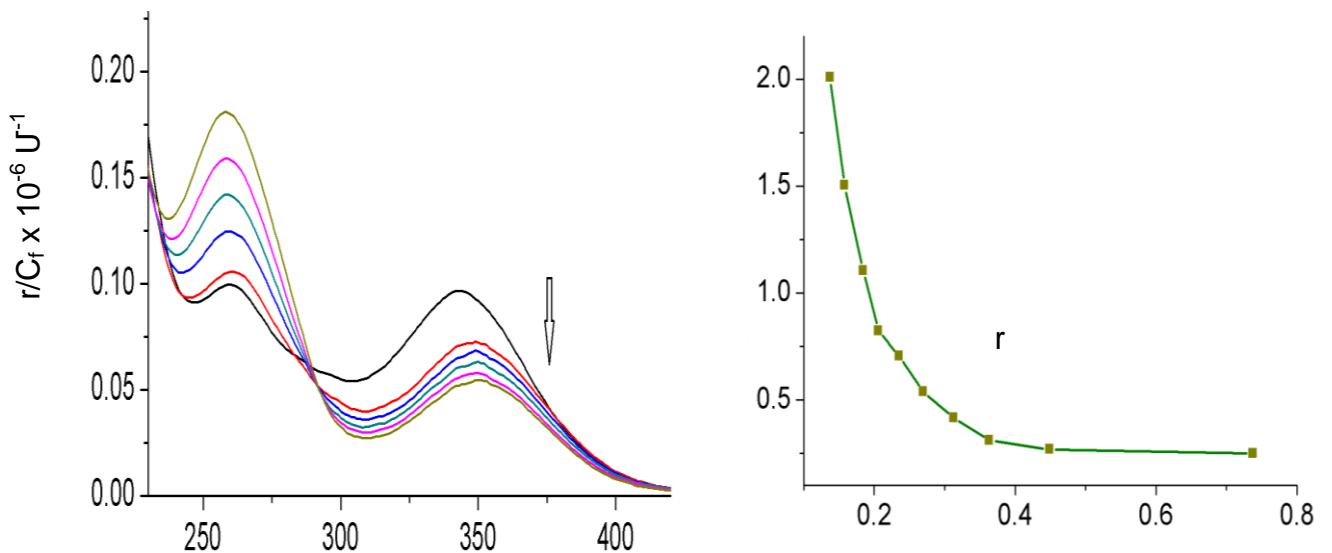
Միևնույն ժամանակ, «ալկին» տիպի ածանցյալները ցուցաբերում են բավական ցածր խնամակցություն պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի նկատմամբ, և նրանց լուծույթների տիրումը պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի լուծույթով արտահայտվում է շատ թույլ հիպերքրոմիկ էֆեկտով, ինչպես նաև որոշ դեպքերում չնչին հիպերքրոմիկ էֆեկտով, ինչպես օրինակ **4a**, **4e**, **4f** միացությունների դեպքում: Այդպիսով մենք սահմանակիսկվել ենք որոշելով միայն «ամին» տիպի ածանցյալների կապման հաստատունները պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի նկատմամբ առավելագույն խնամակցություն ցուցաբերում են **3a** և **3e** միացությունները, որը հավանաբար պայմանավորված է ԴՆԹ-ի Ա-Թ հիմքերի նկատմամբ այս լիզանդների մեծ խնամակցությամբ և տարածական էֆեկտներով, որոնք նպաստում են կապմանը: Ի դեմս ՅԹ-ԴՆԹ-ի հետ կապմանը, պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ **3b** միացության կապումը ավելի թույլ է, ինչը կարող է պայմանավորված լինել այն հանգամանքով, որ պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի փոքր ակոսի կառուցվածքը տարածականորեն խոչընդոտում է նավթալինային խմբի կապմանը:

Մետոքսի-տեղակալ ման էֆեկտը դիտվում է նաև պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ կապման ժամանակ: 3c, 3d և 3e միացությունների շարքում մետոքսի-տեղակալումը նպաստում է պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ կապմանը, միաժամանակ վկայելով, որ այս տեղակալումը չի ազդում Ա-Թ ազոտային հիմքերի «ճանաչմանը»: Միևնույն ժամանակ, այն հանգամանքը, որ պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի նկատմամբ այս ածանցյալները ցուցաբերում են ավելի փոքր կապման հաստատուն, քան ՅԹ-ԴՆԹ-ի հետ, վկայում է այն մասին, որ այս ածանցյալները փոխազդում են ԴՆԹ-ի Գ-Ց ազոտային հիմքերի հետ: Այլ կերպ ասած, ԴՆԹ-ում Գ-Ց ազոտային հիմքերի բացակայությունը հանգեցնում է կապման հաստատունի նվազմանը: Նշված փոխազդեցությունը Գ-Ց ազոտային հիմքերի հետ հաստատվել է նաև տեսական մեթոդով մոլեկուլային դոքինգի հետազոտություններով, որոնց արդյունքները կներկայացնեն ստորև:

**Սաֆկտրային տվյալներ՝ կիրառված կապման հաստատունների որոշման համար**

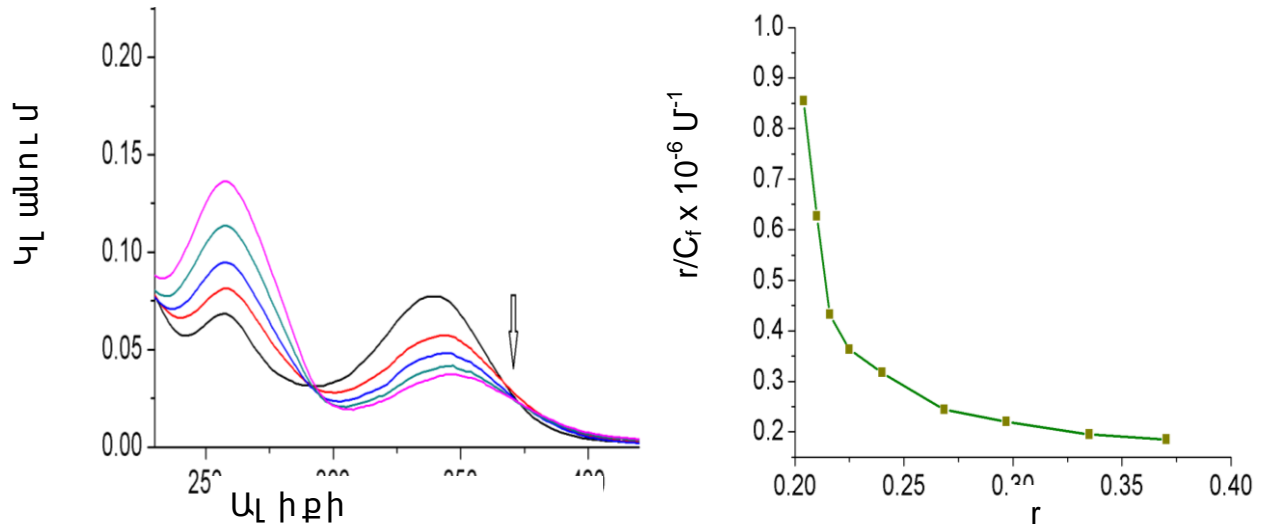
Ստորև ներկայացված են Hoechst 33258-ի և դրա ածանցյալների էլեկտրոնային կլանման սաֆկտրները, դրանց գրանցման պայմանները և Սկետչարդի կորերը, որոնց հիման վրա որոշվել են ԴՆԹ-ի հետ կապման հաստատունները: Պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ տիտրման համար որոշված և բերված են Սկետչարդի կորերը միայն «ամին» տիպի ածանցյալների համար:

**Յորթի թիմուսով տիտրման կորեր «Ամին» ածանցյալներ (Նկ. 35-38)**

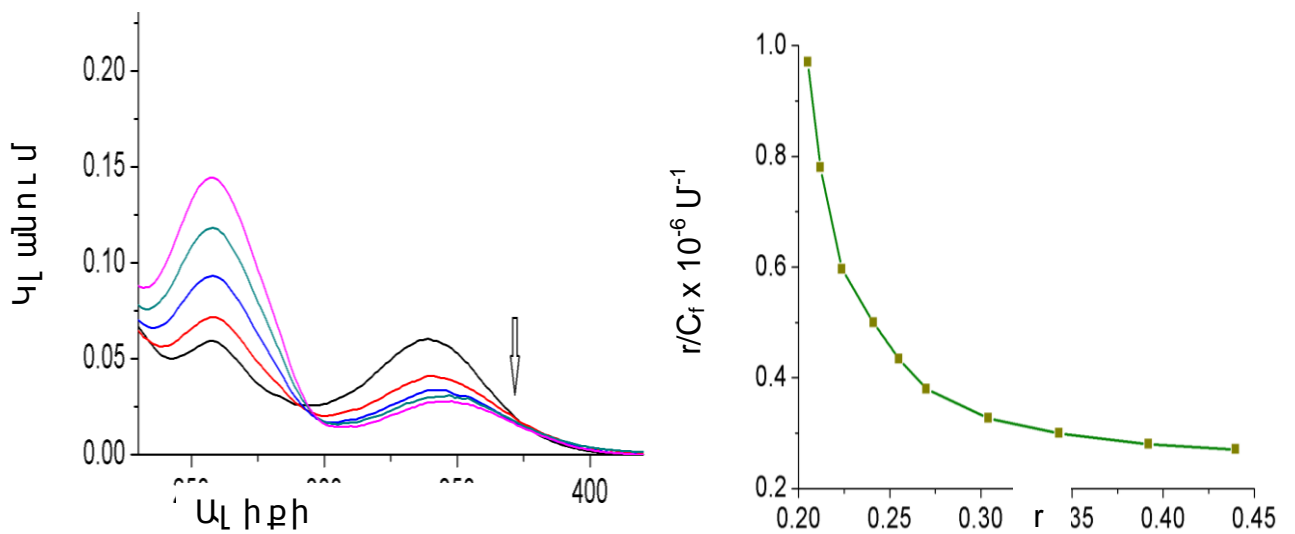




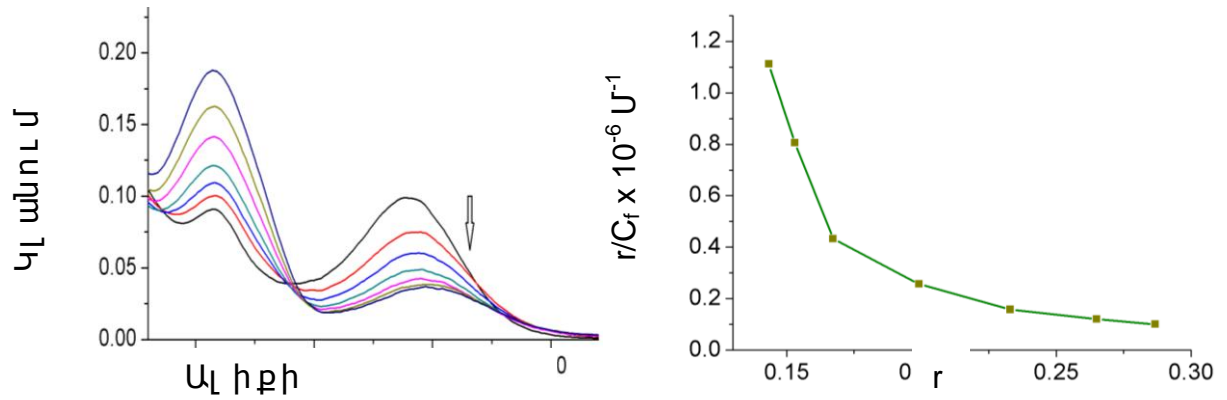
**Նկ. 35.** 3b-ի տիտրման կորերը ՅԹ-ԴՆԹ-ով և համապատասխան Սկետչարդի կախվածությունները.  $[3b]=4$  մկՄ,  $[ՅԹ-ԴՆԹ]=0÷27$  մկՄ:



**Նկ. 36.** 3c-ի տիտրման կորերը ՅԹ-ԴՆԹ-ով և համապատասխան Սկետչարդի կախվածությունները.  $[3c]=4$  մկՄ,  $[ՅԹ-ԴՆԹ]=0÷27$  մկՄ:

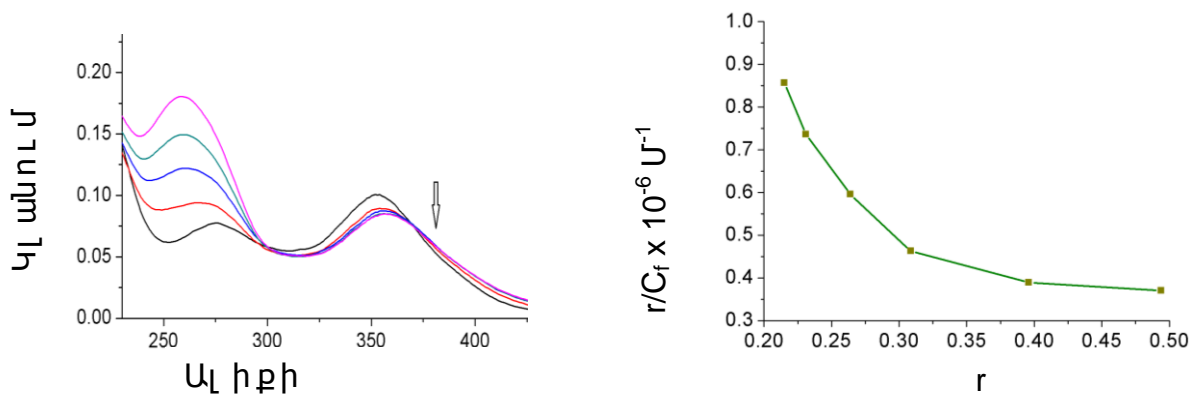


**Նկ. 37.** 3d-ի տիտրման կորերը ՅԹ-ԴՆԹ-ով և համապատասխան Սկետչ արդի կախված ությ ու լ նը . [3d]= 4 մկՄ, [ՅԹ-ԴՆԹ]=0÷27 մկՄ:

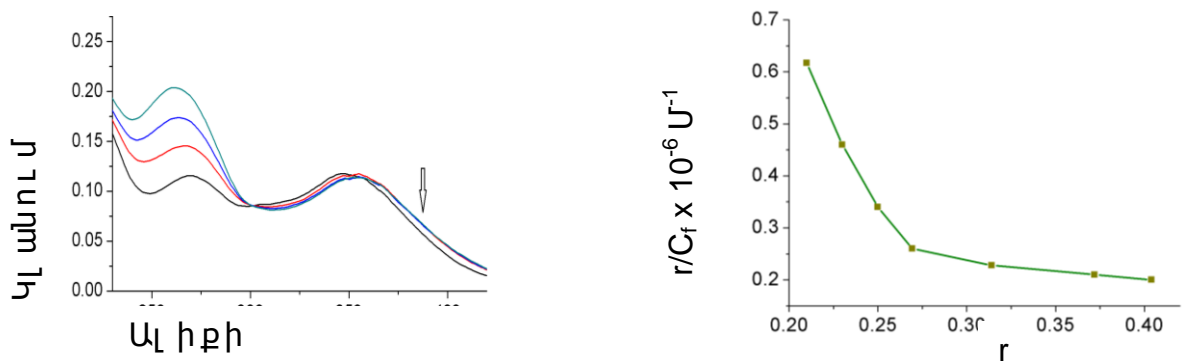


**Նկ. 38.** 3e-ի տիտրման կորերը ՅԹ-ԴՆԹ-ով և համապատասխան Սկետչ արդի կախված ությ ու լ նը . [3e]= 4 մկՄ, [ՅԹ-ԴՆԹ]=0÷27 մկՄ:

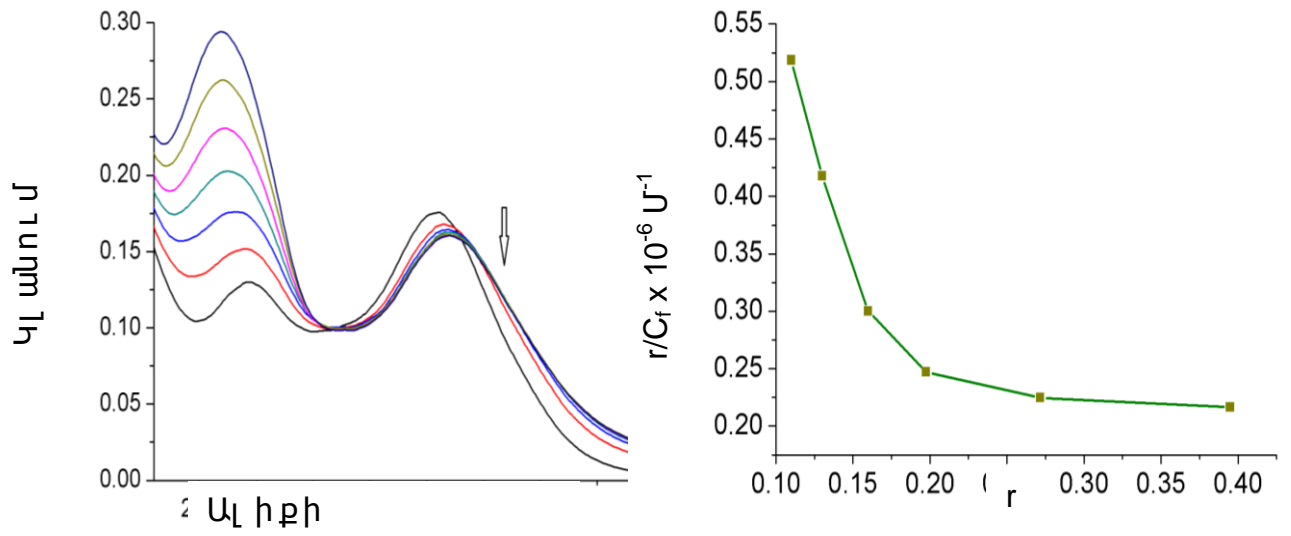
**«Ալ կի ն» ածանցյալ ներ և Hoechst 33258 (Նկ. 39-44)**



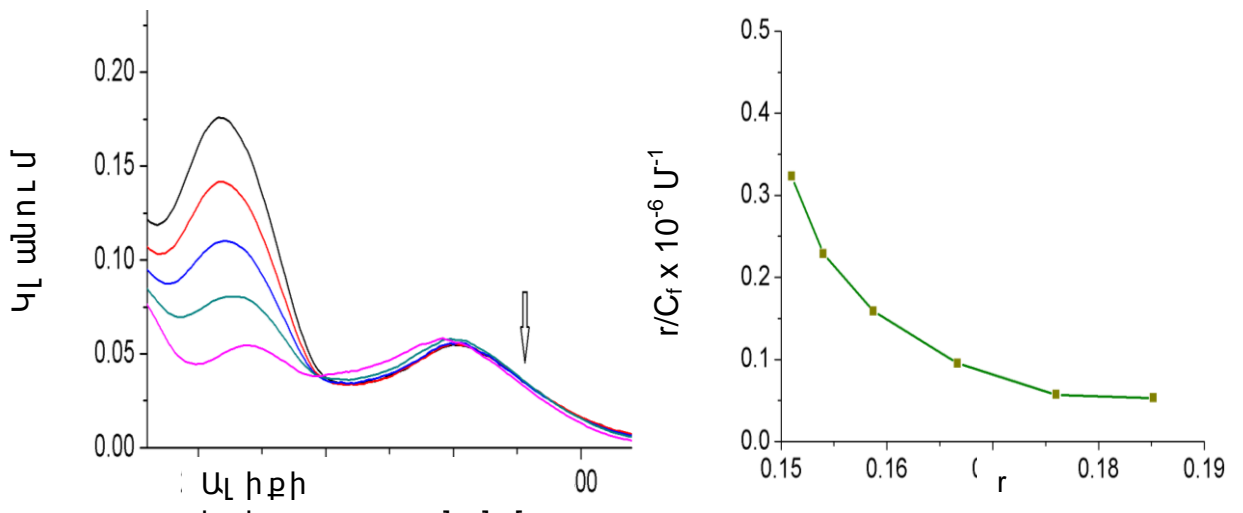
**Նկ. 39.** 4b-ի տիտրման կորերը ՅԹ-ԴՆԹ-ով և համապատասխան Սկետչ արդի կախված ությ ու լ նը . [4b]= 4 մկՄ, [ՅԹ-ԴՆԹ]=0÷27 մկՄ:



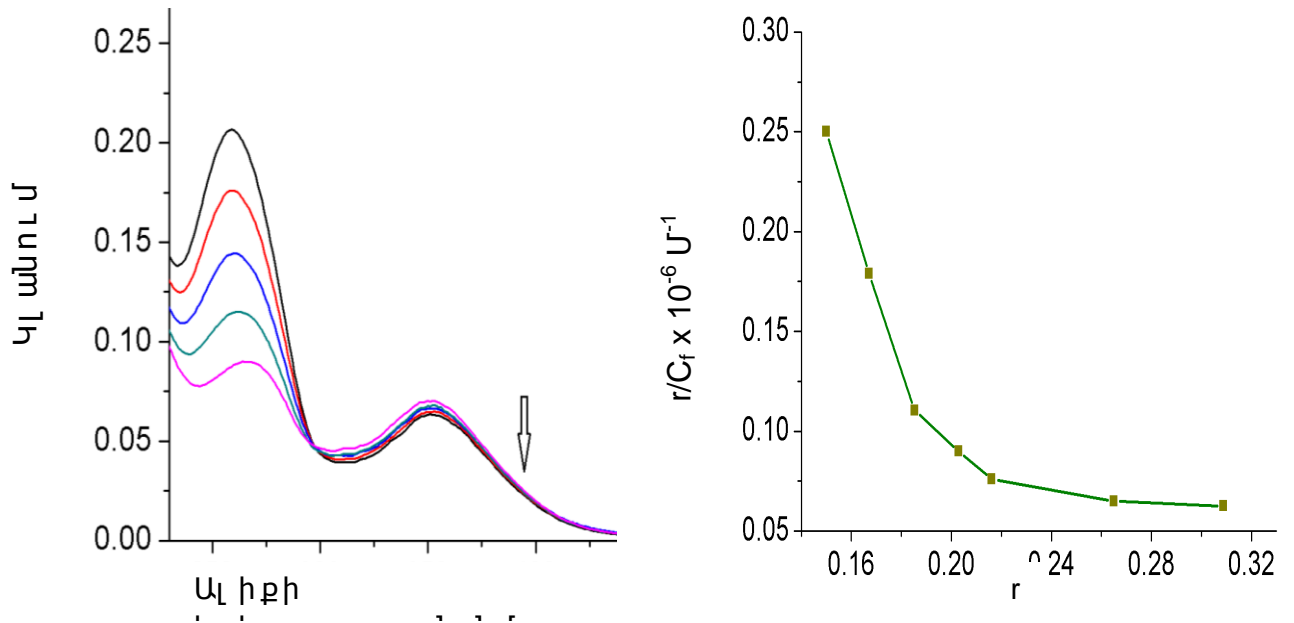
**Նկ. 40.** 4c-ի տիտրման կորերը ՅԹ-ԴՆԹ-ով և համապատասխան Սկետչ արդի կախված ությ ու լ նը . [4c]= 4 մկՄ, [ՅԹ-ԴՆԹ]=0÷27 մկՄ:



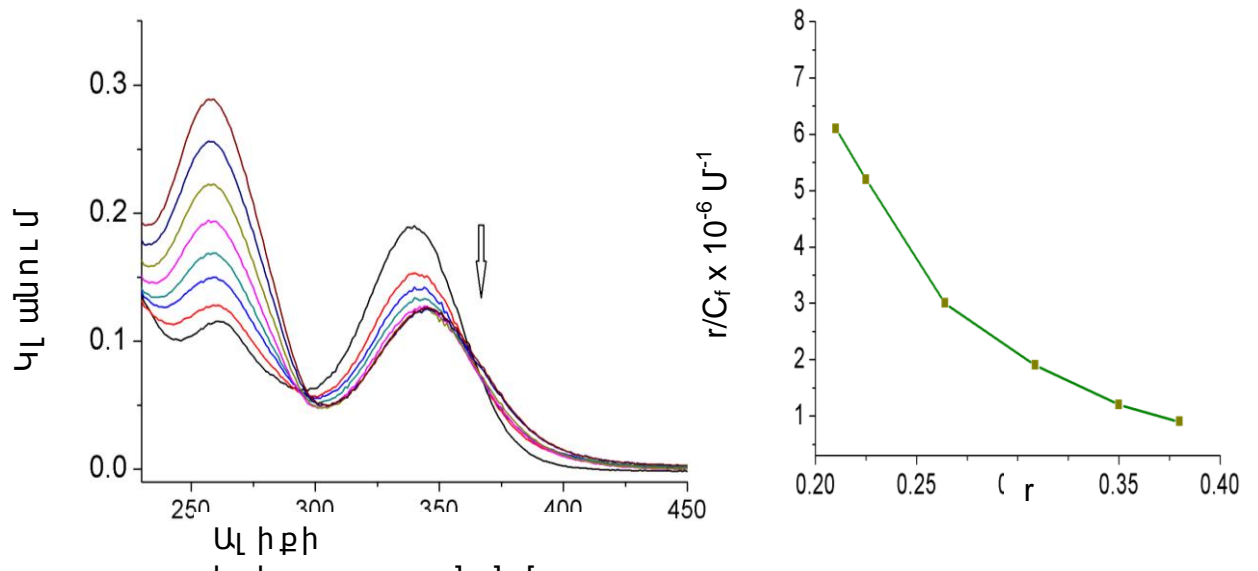
**Նկ. 41.** 4d-ի տիտրման կորերը  $\alpha$ -ԴՆԹ-ով և համապատասխան Սկեռչ արդի կախված ությունը.  $[4d]=4$  մկՄ,  $[\alpha\text{-ԴՆԹ}]=0\div 27$  մկՄ:



**Նկ. 42.** 4e-ի տիտրման կորերը  $\alpha$ -ԴՆԹ-ով և համապատասխան Սկեռչ արդի կախված ությունը.  $[4e]=4$  մկՄ,  $[\alpha\text{-ԴՆԹ}]=0\div 27$  մկՄ:



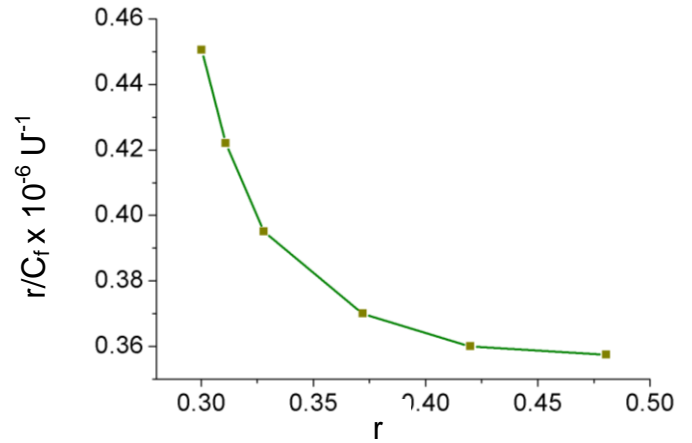
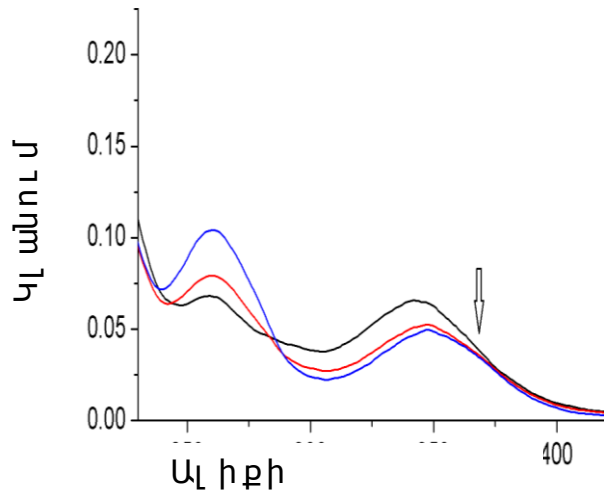
**Նկ. 43.** 4f-ի տիտրման կորերը ՅԹ-ԴՆԹ-ով և համապատասխան Սկետչ արդի կախվածությունները. [4f]= 4 մկՄ, [ՅԹ-ԴՆԹ]=0÷27 մկՄ:



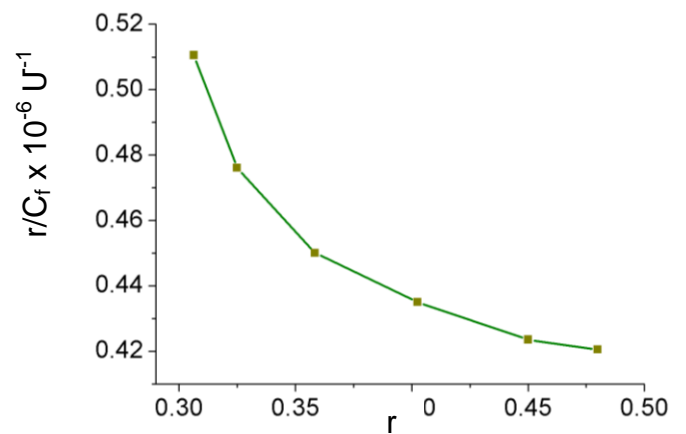
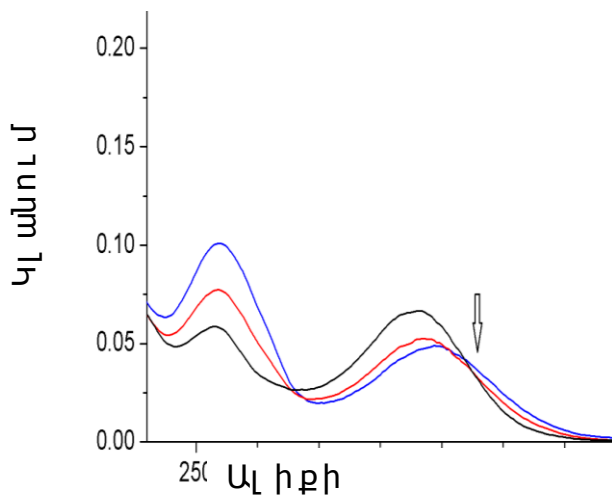
**Նկ. 44.** Hoechst 33258-ի տիտրման կորերը ՅԹ-ԴՆԹ-ով և համապատասխան Սկետչ արդի կախվածությունները. [Hoechst 33258]= 4 մկՄ, [ՅԹ-ԴՆԹ]=0÷35 մկՄ:

**Պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետտիտրման կորեր**

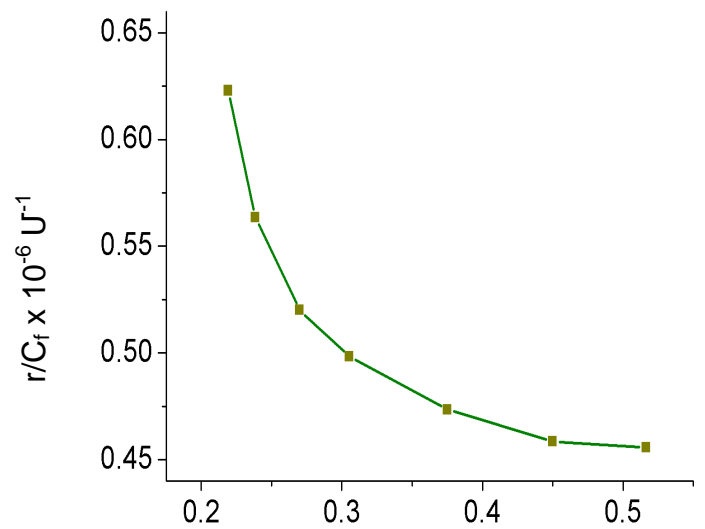
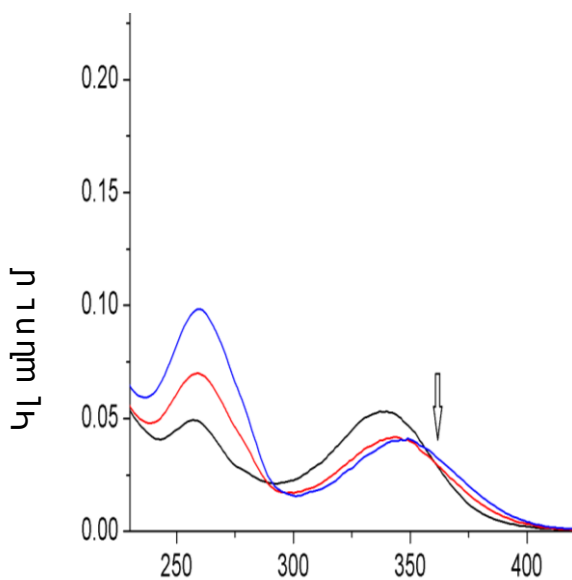
**«Ամհն» ածանցյալներ և Hoechst 33258 (Նկ. 45-49)**



**Նկ. 45.** 3b-ի տիտրման կորերը պրլի [d(A-T)<sub>2</sub>]-ով և համապատասխան Սկետչ արդի կախվածությունները. [3b]= 4 մկՄ, [պրլի [d(A-T)<sub>2</sub>]]=0÷10.6 մկՄ:



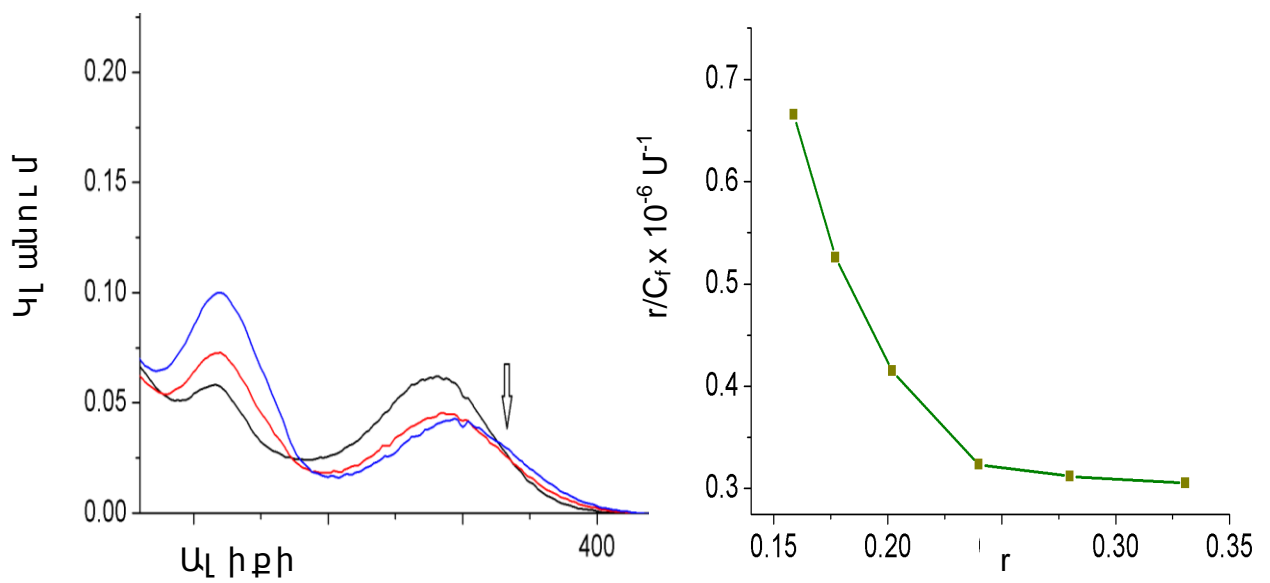
**Նկ. 46.** 3c-ի տիտրման կորերը պրլի [d(A-T)<sub>2</sub>]-ով և համապատասխան Սկետչ արդի կախվածությունները. [3c]= 4 մկՄ, [պրլի [d(A-T)<sub>2</sub>]]=0÷10.6 մկՄ:



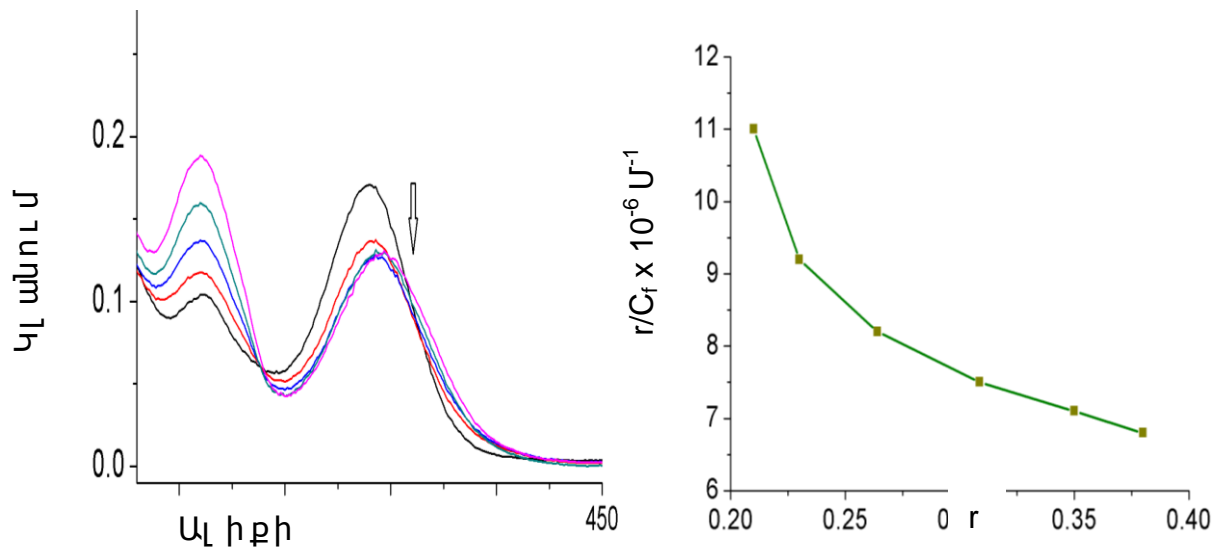
r

r

**Նկ. 47.** 3d-ի տիտրման կորերը պրլի [d(A-T)<sub>2</sub>]-ով և համապատասխան Սկետչ արդի կախվածությունները. [3d]= 4 մկՄ, [պրլի [d(A-T)<sub>2</sub>]] = 0 ÷ 10.6 մկՄ:

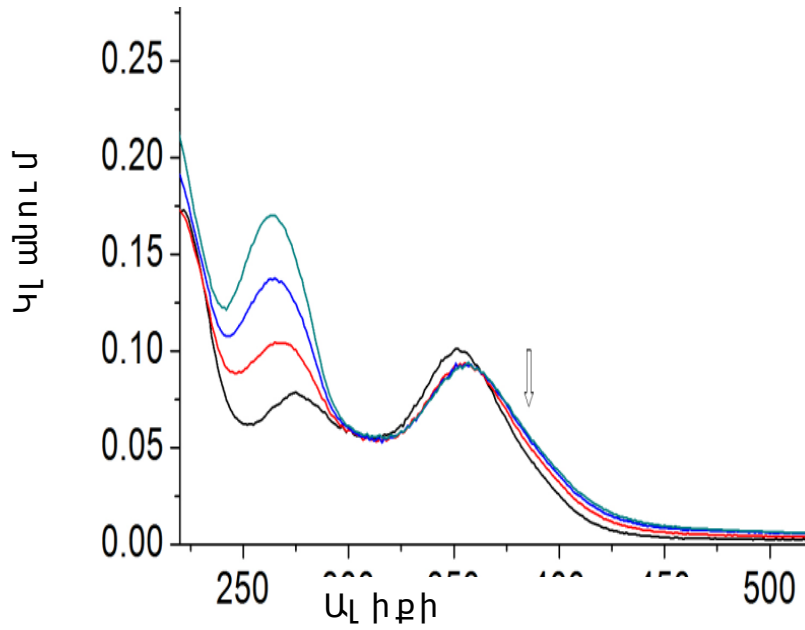


**Նկ. 48.** 3e-ի տիտրման կորերը պրլի [d(A-T)<sub>2</sub>]-ով և համապատասխան Սկետչ արդի կախվածությունները. [3e]= 4 մկՄ, [պրլի [d(A-T)<sub>2</sub>]] = 0 ÷ 10.6 մկՄ:



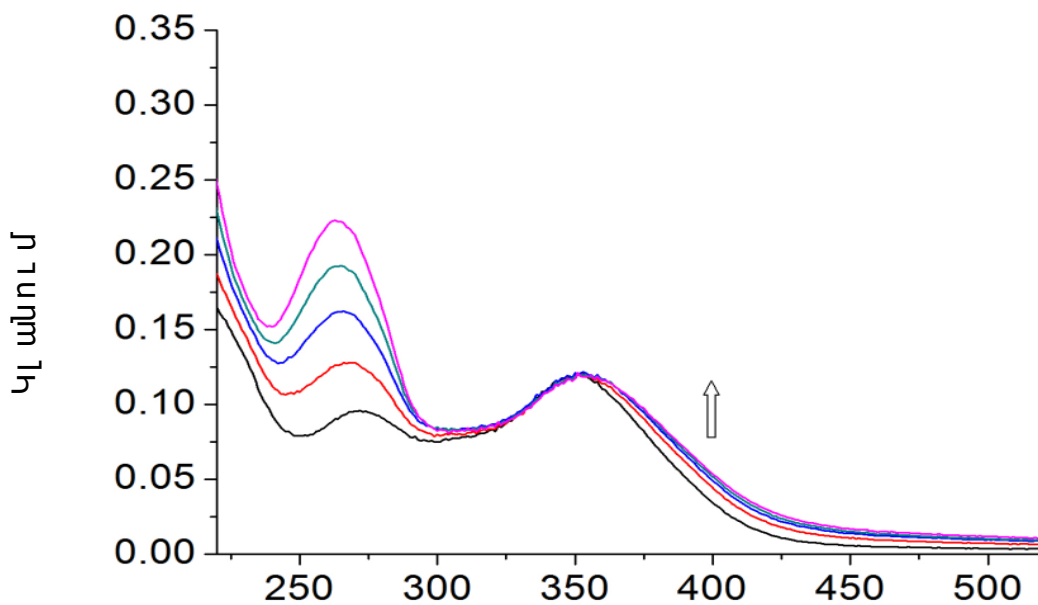
**Նկ. 49.** Hoechst 33258-ի տիտրման կորերը պրԼի [d(A-T)<sub>2</sub>]-ով և համապատասխան Սկետչ արդի կախված ությունը. [Hoechst 33258]=4 մկՄ, [պրԼի [d(A-T)<sub>2</sub>]]=0÷35 մկՄ:

**«Ալկիտ» ածանցյալներ (Նկ. 50-55)**



**Նկ. 50.** 4b-ի տիտրման կորերը պրԼի [d(A-T)<sub>2</sub>]-ով.

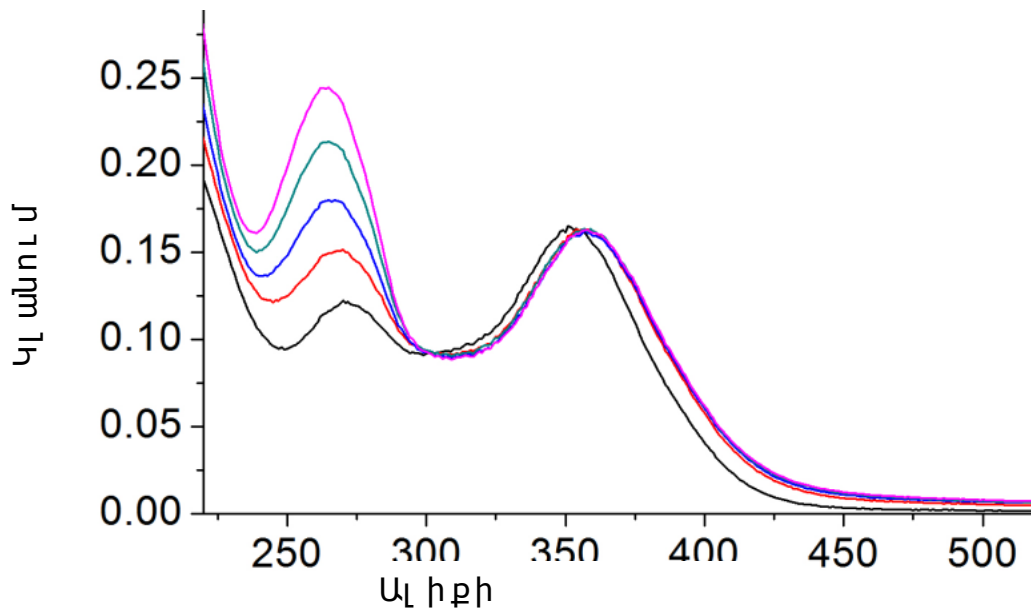
[4b]=4 մկՄ, [պրԼի [d(A-T)<sub>2</sub>]]=0÷20 մկՄ:



Ալիքի

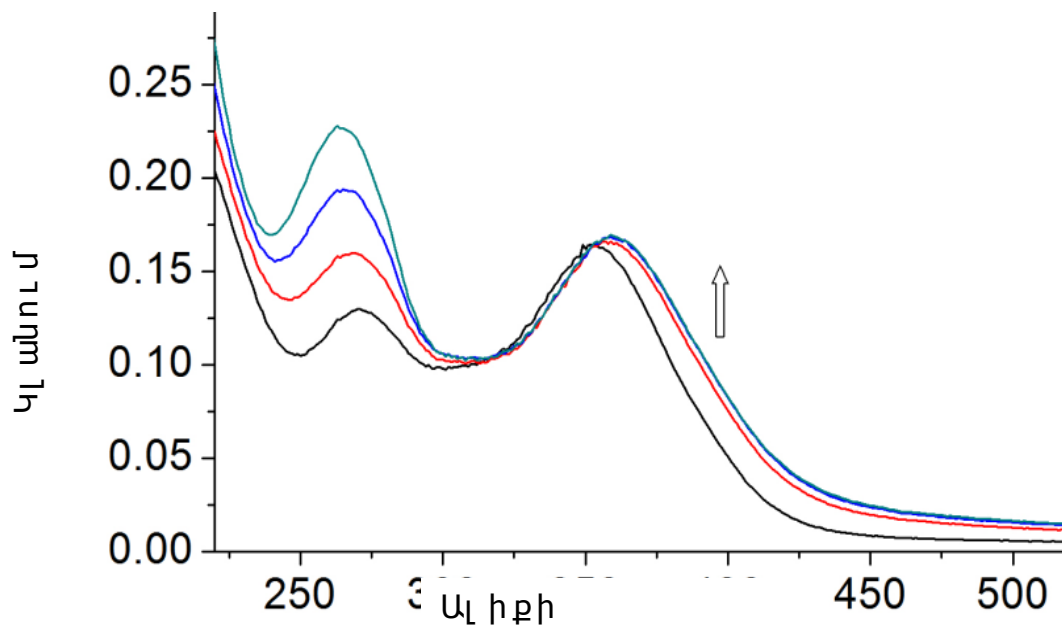
**Նկ. 51.** 4c-ի տիտրման կորերը պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ով.

[4c]=4 մկՄ, [պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]]=0÷25 մկՄ:



**Նկ. 52.** 4d-ի տիտրման կորերը պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ով.

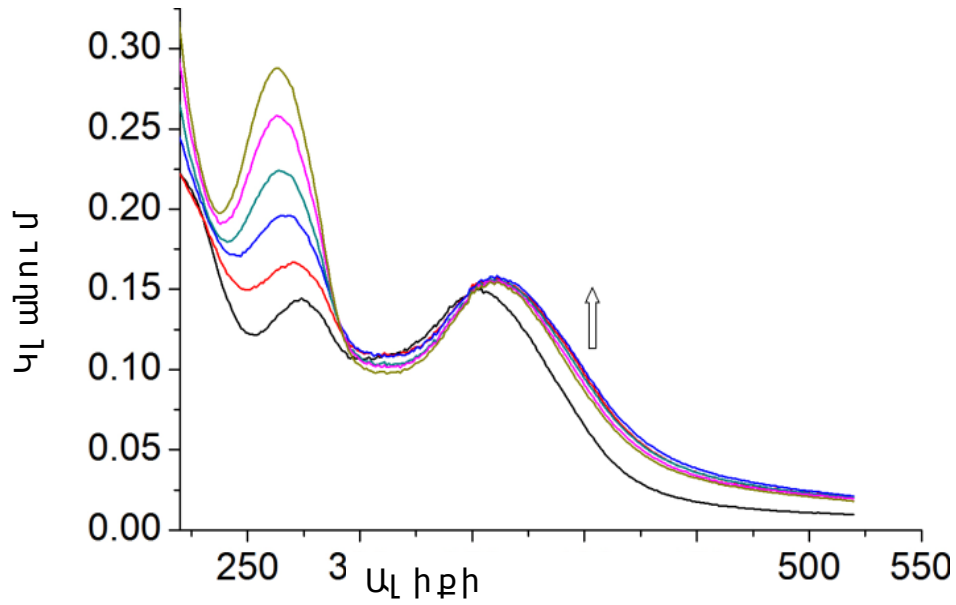
[4d]=4 մկՄ, [պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]]=0÷20 մկՄ:





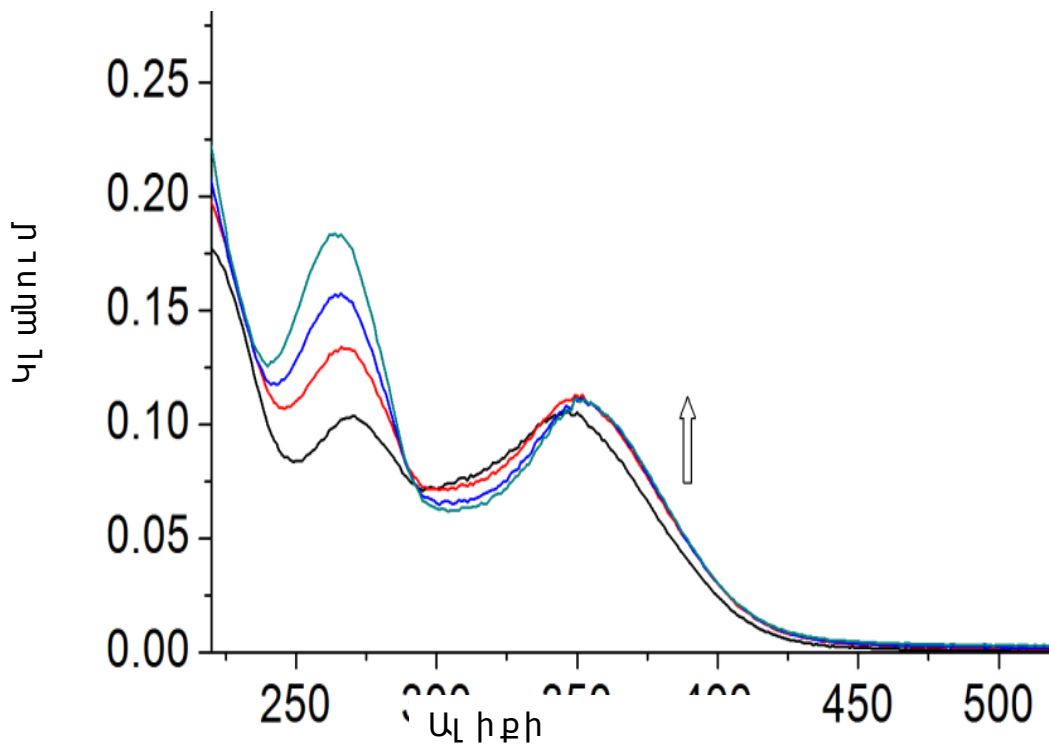
**Նկ. 53.** 4e-ի տիտրման կորերը պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ով.

[4e]=4 մկՄ, [պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]]=0÷25 մկՄ:



**Նկ. 54.** 4f-ի տիտրման կորերը պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ով.

[4f]=4 մկՄ, [պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]]=0÷30 մկՄ:



**Նկ. 55.** 4g-ի տիտրման կորերը պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ով.

[4g]=4 մկՄ, [պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]]=0÷20 մկՄ:

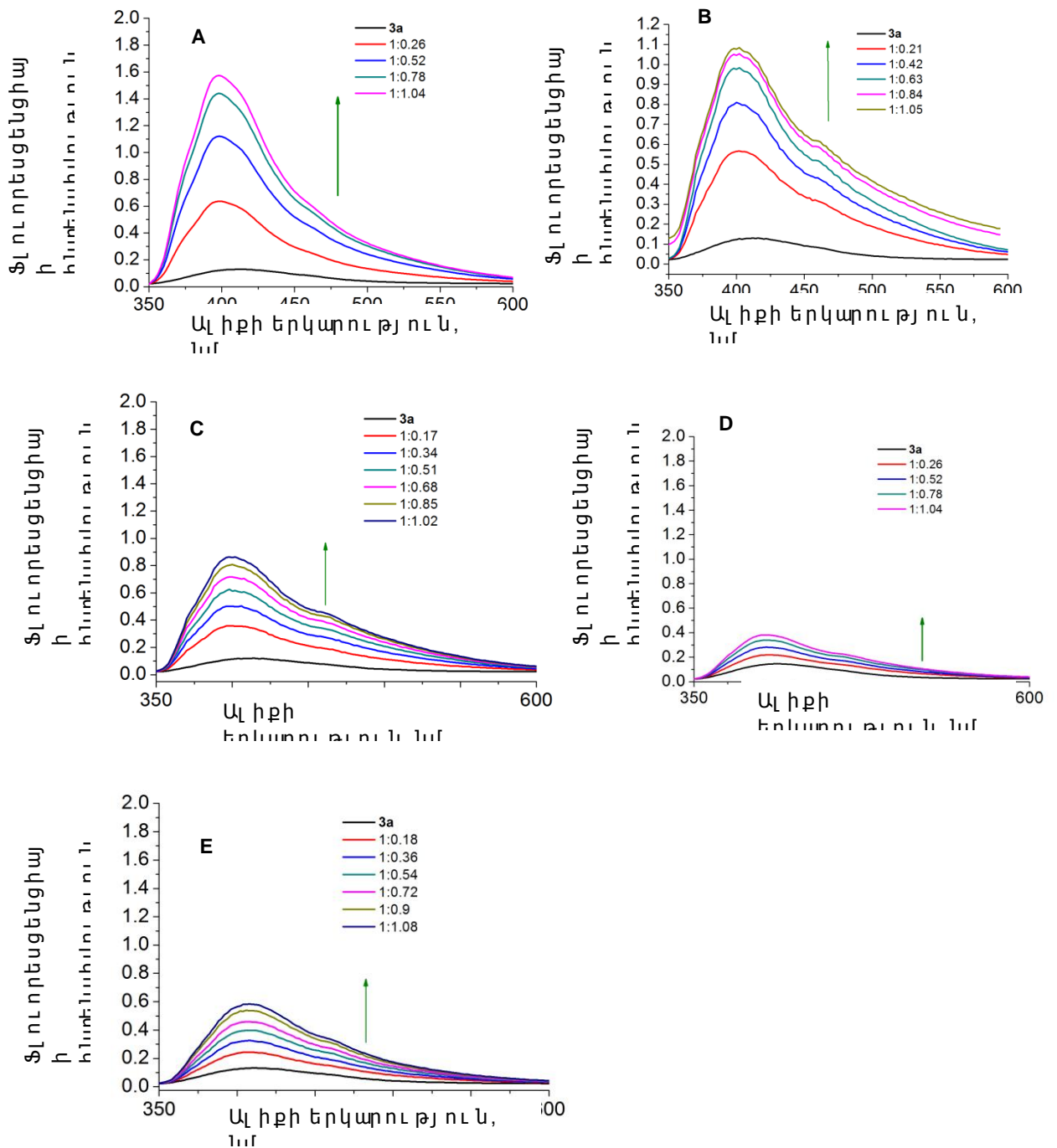
*Կլ անման սպեկտրների գրանցման պայմանները*

Hoechst 33258-ի ածանցյալների և ԴՆԹ-ի հետ կապման բուկոր չափումները իրականացվել են կակոդիլատ բուֆերում, որը պարունակում է 10 մՄ նատրիումի կակոդիլատ ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>As(O)ONa), 100 մՄ նատրիումի քլորիդ, pH=7.5, 25 °C ջերմաստիճանում: Տիտրման ընթացքում ավելացվող ԴՆԹ-ի ծավալը չի գերազանցել լուծույթի ընդհանուր ծավալի 10%-ը և ստացված սպեկտրները ուղղվել են համապատասխան գործակցի միջոցով՝ բացառելու համար նոսրացմամբ պայմանավորված կոնցենտրացիոն շեղումները:

**3.7. Ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի չափումները**

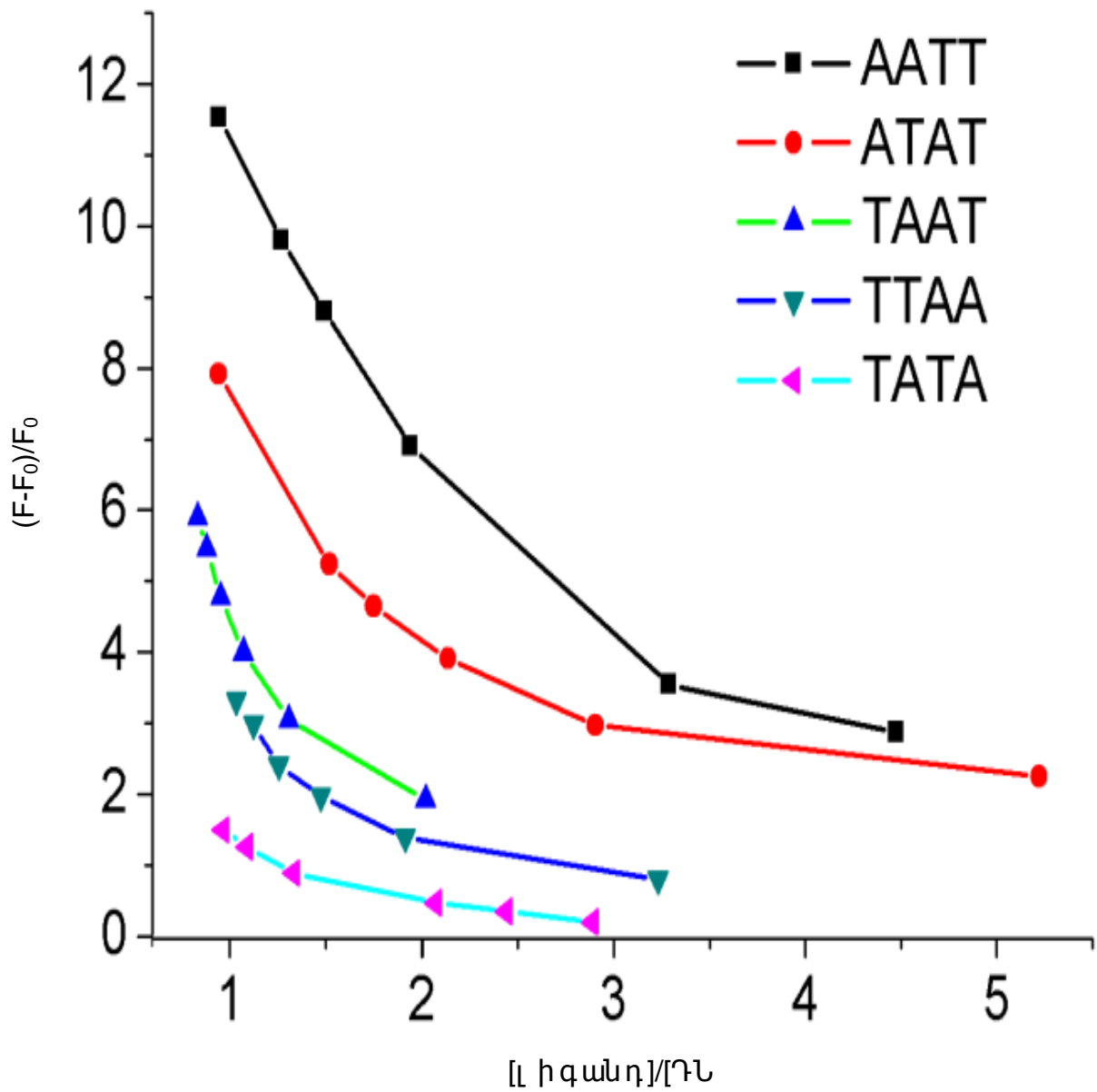
Ինչպես նշվեց վերևում, ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի չափումները լայնորեն կիրառվում են լիզանդ-ԴՆԹ փոխազդեցության նկարագրման համար: ԴՆԹ-ին չկապված վիճակում Hoechst 33258-ի ածանցյալները օժտված են ցածր ֆլուորեսցենցիայով, մինչդեռ կապվելով ԴՆԹ-ի օլիգոնուկլեոտիդին, դրանց ֆլուորեսցենտային ելքը կտրուկ մեծանում է: Ֆլուորեսցենտային մեթոդով չափումները իրականացվել են նկարագրելու համար 3a միացության կապումը տարբեր հաջորդականություններ պարունակող ԴՆԹ-ների հետ: 3a միացության ընտրությունը պայմանավորված է 3Թ-ԴՆԹ-ի և պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի հետ նրա կապման մեծ հաստատունով: Այդ նպատակով 3a-ի 1մկՄ կոնցենտրացիայով լուծույթը տիտրվել է հինգ տարբեր օլիգոնուկլեոտիդներով, որոնք ունեն հետևյալ հաջորդականությունը. 5'-d(CGCGXCGCGTTTTCGCGXCGCG)-3', որտեղ X-ը ներկայացնում է նուկլեիդաթթուների հաջորդականությունը որը փոփոխվել է և իրենից

ներկայացնում է հետևյալ հաջորդականությունները X=ATAT, TAAT, TATA, TTAA և AATT: Յիմնվելով ֆլուորեսցենսային չափումների վրա՝ մենք որոշել ենք 3a-ի համար ուժեղ և թույլ կապման տեղերը: Նկ. 56-ը ներկայացնում է 3a-ի ֆլուորեսցենսային տիտրման կորերը ԴՆԹ-ի նշված շղթաներով: Ստացված ֆլուորեսցենսային տիտրման կորերը վերլուծվել են՝ կառուցելով ֆլուորեսցենսային ինտենսիվության հարաբերական աճի  $(F-F_0)/F_0$  կախվածությունը Լիգանդ/ԴՆԹ հարաբերությունից (նկ. 57): Առավելագույն աճ ֆլուորեսցենսային ինտենսիվության մեջ ի հայտ է եկել AATT հաջորդականության համար, մինչդեռ ամենացածր աճը դիտվել է TATA հաջորդականության համար: Բոլոր դեպքերում, ֆլուորեսցենսային ինտենսիվության աճի ավարտը դիտվել է Լիգանդ/ԴՆԹ-ի 1:1 հարաբերության դեպքում, ինչը փաստում է այն մասին, որ Լիգանդը ԴՆԹ-ի հետ կապվում է մոնոմերային ձևով: Ֆլուորեսցենսային սպեկտրոսկոպիայի չափումները հաստատում են Լիգանդ-ԴՆԹ ամուր կապումը և 3a-ի բարձր խնամակցությունը ԴՆԹ-ի նկատմամբ:



**Նկ. 56.** 3a միացումը ան ֆլուորեսցենսայի նսպեկտրները 5'-d(CGCGXCGCGTTTTTCGCGXCGCG)-3' օլիգոնուկլեոթիդների օլիգոնուկլեոթիդների հետ:

**A.** X=AATT, **B.** X=ATAT, **C.** X=TAAT, **D.** X=TATA, **E.** TTAA (կակոդիլատրոն ֆերմենտի 100 մՄ NaCl, 10 մՄ նատրիումի կակոդիլատ, pH=7.4, 25 °C):



**Նկ. 57.** 3a միացույթի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության հարաբերական աճը կախված է լիգանդ/ԴՆ-ի կոնցենտրացիոն հարաբերությունից:

Ի լրումն, ֆլուորեսցենտային չափումները ի հայտ են բերում 3a միացույթի ինամակցությունը կախված ազոտային հիմքերի հաջորդականությունից (TATA < TTAA < TAAT < ATAT < AATT), որը համապատասխանում է Hoechst 33258-ի ընտրողական հաջորդականությանը ԴՆ-ի նկատմամբ [80]: Հիմնվելով ֆլուորեսցենտային տիտրման արդյունքների վրա, որոշվել են 3a միացույթի կապման հաստատունները նշված հինգ տարբեր

օլիգոնուկլեոտիդների հետ, և կապման հաստատունների արժեքները բերված են աղյուսակ 4-ում:

Աղ. 4.

Յամիացու թյան կապման հաստատունների արժեքները տարբեր

Հաջորդականություն	$K_a \times 10^{-6}, U^1$
<b>AATT</b>	11.2
<b>ATAT</b>	7.6
<b>TAAT</b>	5.8
<b>TTAA</b>	3.1
<b>TATA</b>	1.9

հաջորդականությունն պարունակող օլիգոնուկլեոտիդների հետ:

Ինչպես երևում է աղյուսակ 4-ի տվյալներից, **AATT** հաջորդականությունն պարունակող օլիգոնուկլեոտիդը իրենից ներկայացնում է ամենամուր կապման կենտրոնը Յամիացու թյան համար, **TATA** պարունակող հաջորդականությունը՝ ամենաթուլը:

Ստացված արդյունքը պայմանավորված է նշված հաջորդականությունների փոքր ակոսների չափսերով: Հայտնի է, որ Hoechst 33258-ի մոլեկուլը (և նրամնացորդը ածանցյալների դեպքում) ամուրկապվում է փոքր ակոսի հնարավորինս նեղ հատվածների հետ [80], որով և բացատրվում է հաջորդականությունից կախված նման ընտրողականությունը: Նշվածներից ամենանեղ հատվածը դիտվում է AATT-ի մոտ, որով և պայմանավորված է նրակապման մեծ հաստատունի արժեքը:

Այսպիսով, ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի չափումները ի հայտ են բերում 3a-ի խնամակցությունը ԴՆԹ-ի նկատմամբ՝ կախված դրանում ազոտային հիմքերի հաջորդականությունից: Ավելին, այդ չափումները հաստատում են լիզանդի և ուսումնասիրված օլիգոնուկլեոտիդների միջև 1:1 կոմպլեքսի առաջացումը:

### **3.8. Ջերմային հալման չափումները**

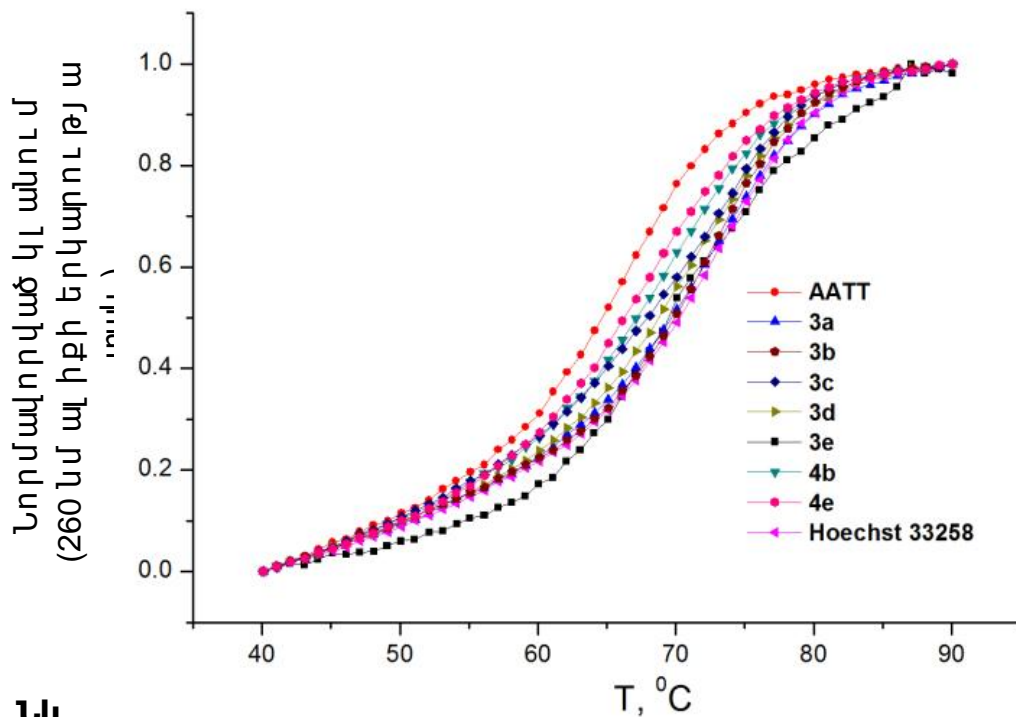
Փոքր մոլեկուլների և ԴՆԹ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրման դասական եղանակ է հանդիսանում ջերմային հալման մեթոդը: Այս հետազոտությունները հնարավորություն են տալիս գնահատել ու լիզանդների հարաբերական խնամակցությունը և հաջորդականության ընտրողականությունը ԴՆԹ-ի նկատմամբ [81, 82]: ԴՆԹ-ի դենատուրացիան ուղեկցվում է կլանման հիպերքրոմիկ էֆեկտով, որը կախված է ջերմաստիճանից: Այն միացությունները, որոնք կապվում են ԴՆԹ-ի հետ և բարձրացնում նրա հալման ջերմաստիճանը ( $T_m$ ), մեծացնում են ԴՆԹ-ի ջերմային կայունությունը: Միևնույն ժամանակ, ԴՆԹ-ի ջերմային կայունության նվազումը խոսում է այն մասին, որ կապվող լիզանդները հարուցում են ԴՆԹ-ի կառուցվածքի խախտում և նվազեցնում են նրա ջերմային կայունությունը:

Հիմնվելով ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի տվյալների վրա, որոնք ցույց են տալիս, որ 3a միացության համար ամենաուժեղ կապման կենտրոն հանդիսանում է AATT հաջորդականությունն պարունակող օլիգոնուկլեոտիդը, հալման չափումները իրականացնելու համար ընտրվել է հետևյալ

օլիգոնուկլեոտիդը, որը պարունակում է նշված AATT հաջորդականությունը. 5'-d(CGAATTCGTTTTCGAATTCG)-3': նշված օլիգոնուկլեոտիդը հանդիսանում է ԴՆԹ-ի պարոլյր, որի եզրերը ինքնակոմպլեմենտար են, իսկ միջնամասում գտնվում է TTTT հանգույցը:

Հալման հետազոտությունները իրականացնելու համար պատրաստվել են նշված օլիգոնուկլեոտիդի լուծույթներ առանց Hoechst-ի ածանցյալների և ընտրված ածանցյալների առկայությամբ, ընդ որում օլիգոնուկլեոտիդի և լիգանդի կոնցենտրացիաների հարաբերությունը եղել է 1:1: Հալման հետազոտությունների համար ընտրվել են հետևյալ ածանցյալները. 3a-e, 4b, 4e և Hoechst 33258-ը համեմատության համար: Հալման չափումները իրականացվել են՝ հետևելով ԴՆԹ-ի և լիգանդի կոմպլեքսի կլանման փոփոխությանը 260 նմ ալիքի երկարության տակ ջերմաստիճանի աստիճանական բարձրացման դեպքում:

Նշված օլիգոնուկլեոտիդի և նրա կոմպլեքսների հալման կորերը բերված են նկ. 58-ում:



**Նկ. 58.** 5'-d(CGAATTCGTTTTCGAATTCG)-3' օլիգոնուկլեոտիդի և 3a-e, 4b, 4e և Hoechst 33258-ի հետնրակոմպլեքսների հալման կորերը:



Հալման ջերմաստիճանները որոշվել են հալման կորերի առաջին կարգի դիֆերենցիալներից (սխալ անքը՝ 0.5 °C) և ներկայացված են աղյուսակ 5-ում: 3a և 3b միացությունները ամենամեծ չափով են կայունացնում ԴՆԹ-ն մնացած բոլոր ածանցյալների հետ համեմատած ( $\Delta T_m = 7.2$  և  $7$  °C, համապատասխանաբար), որը գրեթե համարժեք է Hoechst 33258-ի կոմպլեքսի համար հալման ջերմաստիճանների տարբերությանը: Ստացված արդյունքները բավականին լավ համապատասխանության մեջ են նշված ածանցյալների կապման հաստատունների արժեքների հետ, որոնք որոշվել են էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի եղանակով: «Էթիլամինային» միացությունները, որոնք են 3e, 3d և 3c, ցուցաբերում են ԴՆԹ-ն կայունացնող միջին ազդեցություն: Միևնույն ժամանակ, 4b և 4e միացությունները չեն ցուցաբերում ԴՆԹ-ն կայունացնող հատկություն, որը ամենայն հավանականությամբ, պայմանավորված է նրանց կապման փոքր հաստատունով: ԴՆԹ-ի և Hoechst 33258-ի ածանցյալների կոմպլեքսների հալման չափումների արդյունքները ևս հաստատում են «պրոպիլամին» շղթայի առկայության դեպքում ավելի ամուր կապումը ԴՆԹ-ին, քան «Էթիլամինային» միացությունների դեպքում: Ստացված արդյունքը պայմանավորված է պրոպիլ շղթայի շարժունակությամբ, որը նպաստում է պիրիդինային և մետոքսիբենզիլ խմբերի հասանելիությանը ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում: Այս շղթայի ներմուծումը ամենայն հավանականությամբ նպաստում է նաև ջրածնական կապերի առաջացմանը լիզանդի և ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերի միջև: Միևնույն ժամանակ, հալման չափումները հաստատում են, որ մետոքսի խմբի ներմուծումը բենզիլ խմբում նպաստում է կոմպլեքսի կայունության մեծացմանը:

**Աղ. 5.**

5'-d(CGAATTCGTTTTCGAATTCG)-3' օլիգոնուկլեոտիդի և Hoechst-ի ածանցյալների և կոմպլեքսների հալման կորերը:

Միացություն	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
-------------	------------	-------------------

<b>3a</b>	74.3	7.2
<b>3b</b>	74.1	7.0
<b>3c</b>	70.2	3.1
<b>3d</b>	70.6	3.5
<b>3e</b>	70.8	3.7
<b>4b</b>	68.9	1.8
<b>4e</b>	68.3	1.2
<b>Hoechst 33258</b>	74.5	7.4

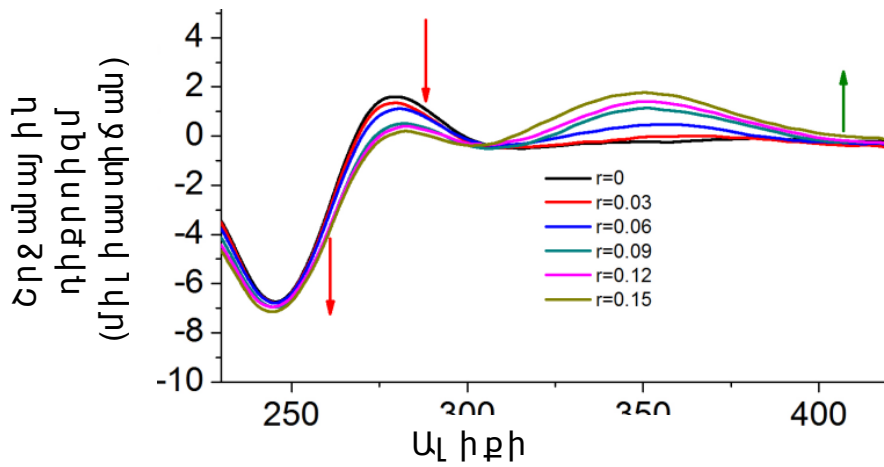
**3.9.**

**Շրջանային**

**դիքրոիզմի սպեկտրոսկոպիական չափումները**

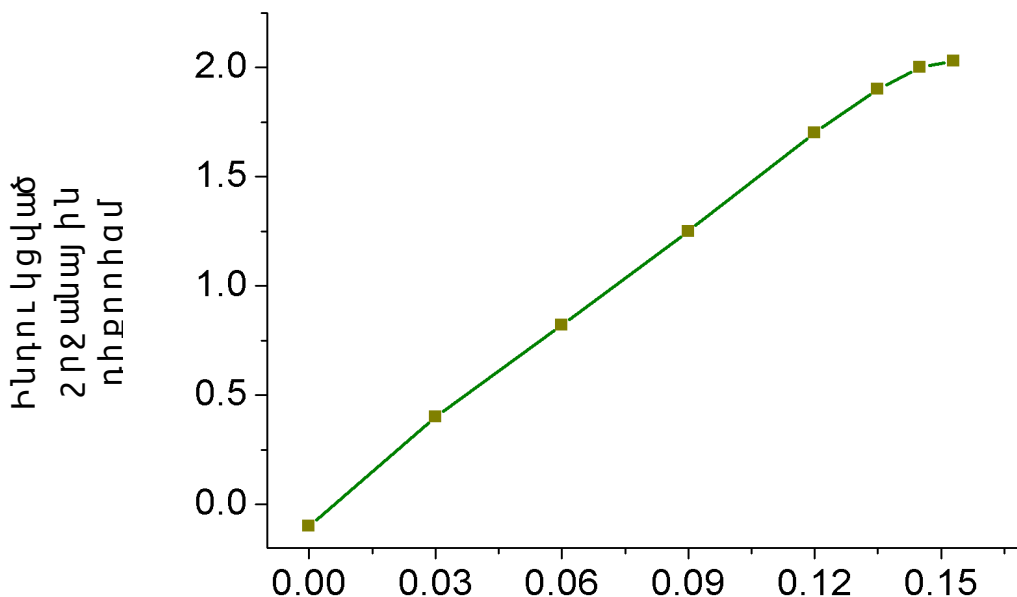
Շրջանային դիքրոիզմի սպեկտրոսկոպիական լայնորեն կիրառվում է ԴՆԹ-լիզանդ փոխազդեցությունների ուսումնասիրության ժամանակ [59, 60]: Ի համեմատ ինտերկալյատորների, ԴՆԹ-ի փոքր ակոսին կապվող լիզանդները ինդուկցում են դրական շրջանային դիքրոիզմի ազդանշան: Շրջանային դիքրոիզմի չափումները իրականացվել են 3a միացության և հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ի միջև: Ոչ լիզանդը, ոչ հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ն չունեն ծԴ ազդանշան 300 նմ տիրույթից մեծ ալիքային երկարությունների դեպքում: Յետևելով հարուցված շրջանային դիքրոիզմի ազդանշանին, որոշվել են 3a միացության կապման եղանակը և ԴՆԹ-ի հետ փոխազդեցության հագեցման հարաբերությունը: 3a միացության ավելացումը հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ի լուծույթին բերում է զգալի ծԴ ազդանշանի հարուցմանը 300-400 նմ ալիքային երկարության տիրույթում, ինչը փաստում է 3a –ի

կապումը ԴՆԹ-ի փոքր ակոսիս: Յորթի թիմուսի ԴՆԹ-ի տիտրման ՇԴ կորերը 3a միացու թյ ամբ բերված են նկ. 59-ում:



**Նկ. 59.** ԴՆԹ-ի շրջանային դիքրոիզմի սպեկտրները առանց 3a-ի ( $r=0$ ,  $[3a-ԴՆԹ]=80$  մկՄ) և 3a-ի տարբեր քանակություների առկայության դեպքում, երբ լիգանդ/ԴՆԹ հարաբերությունը կազմել է 0, 0.03, 0.06, 0.09, 0.12, 0.15: Կարմիր սլաքները մատնանշում են ԴՆԹ-ի ՇԴ ազդանշանի նվազումը, կանաչը՝ ինդուկցված ՇԴ-ը:

Հատկանշական է, որ 3a-ի հարուցված ՇԴ ազդանշանի դիրքը համընկնում է նրակլանման պիկի դիրքի հետ, ինչը փաստում է այն մասին, որ միևնույն քրոմոֆորն է պատասխանատու ինդուկցված ՇԴ ազդանշանի համար: Ինդուկցված ՇԴ ազդանշանի ինտենսիվության կախվածությունը լիգանդ/ԴՆԹ կոնցենտրացիոն հարաբերությունից բերված է նկ. 60-ում:

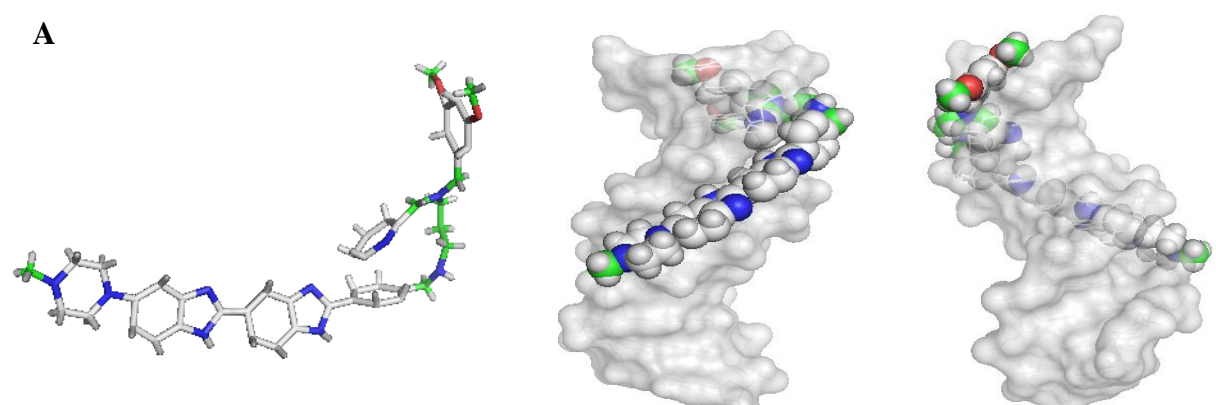


**Նկ. 60.** 3a միացության  $\bar{K}_d$  հարուցված ՇԴ ազդանշանի փոփոխությունները 350 նմ ալիքի երկարության տակ կախված Լիգանդ/ԴՆ-կոնցենտրացիոն հարաբերությունից:

Հորթի թիմուսի ԴՆ-ի ՇԴ ազդանշանները նվազում են 245 և 280 նմ ալիքի երկարությունների տակ և  $r=0.15$  հարաբերությունից բարձր արժեքների դեպքում 3a միացության հետագա ավելացումը այլևս չի բերում որևէ փոփոխության: Նշված հագեցման կետը հաստատում է էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի եղանակով ստացված հագեցման արդյունքը, երբ ուպարամետրի արժեքը հավասար է 6.8-ի, որը համապատասխանում է Լիգանդ/ԴՆ հետևյալ հարաբերությանը՝  $1/6.8=0.147$ : Այսպիսով, ՇԴ սպեկտրոսկոպիայի չափումները պարզում են 3a միացության՝ ԴՆ-ի փոքր ակոսում կապվելը և հաստատում են նրանց փոխազդեցության հագեցման կոնցենտրացիոն տիրույթը:

**3.10. Տեսական մոլեկուլային մոդելավորման հետազոտությունները. Մոլեկուլային դոքինգ**

3a-ի կապումը ԴՆ-ին ավելի մանրակրկիտ նկարագրելու և բացահայտելու համար ամենահավանական կոնֆորմացիաները, որոնցով միանում է 3a-ն ԴՆ-ին, մենք իրականացրել ենք նաև մոլեկուլային դոքինգի տեսական հետազոտություններ: ԴՆ-ի համար որպես կրկնակի պարունյր ընտրվել է հետևյալ հաջորդականությունը. 5'-d(CGCGAATTCGCG)-3' (Դիկերսոնի հաջորդականություն): Դոքինգի հետազոտությունները իրականացվել են AutoDock Vina համակարգչային ծրագրի միջոցով: Մոլեկուլային դոքինգի արդյունքները ներկայացված են նկ. 61-ում:



Կոնֆորմացիա	Խնամակցության բացարձակ արժեքները, կՋ·մոլ <sup>-1</sup>
-------------	--

**Նկ. 61.** 3a միացության մոլեկուլային մոդելները 5'-d(CGCGAATTCGCG)-3' հաջորդականության վրա դոքսիսիբի արդյունքում: **A.** 3a միացության կոնֆորմացիան որի դեպքում այն ունի առավելագույն խնամակցություն ԴՆԹ-ի նկատմամբ, Դոքսիսիբի արդյունքները` **B.** ԴՆԹ-ի փոքր ակոսից, **C.** ԴՆԹ-ի մեծ ակոսից դիտելիս: Պատկերները ստացվել են դոքսիսիբի արդյունքների հիման վրա՝ օգտագործելով PyMol համակարգչային ծրագիրը:

3a միացության համար դոքսիսիբի արդյունքները ի հայտ են բերել ինը հնարավոր կոնֆորմացիաներ, որոնց համար խնամակցությունը ընկած է -54.8-ից -47.9 կՋ·մոլ<sup>-1</sup>: Խնամակցությունների արժեքները բերված են աղյուսակ 6-ում:

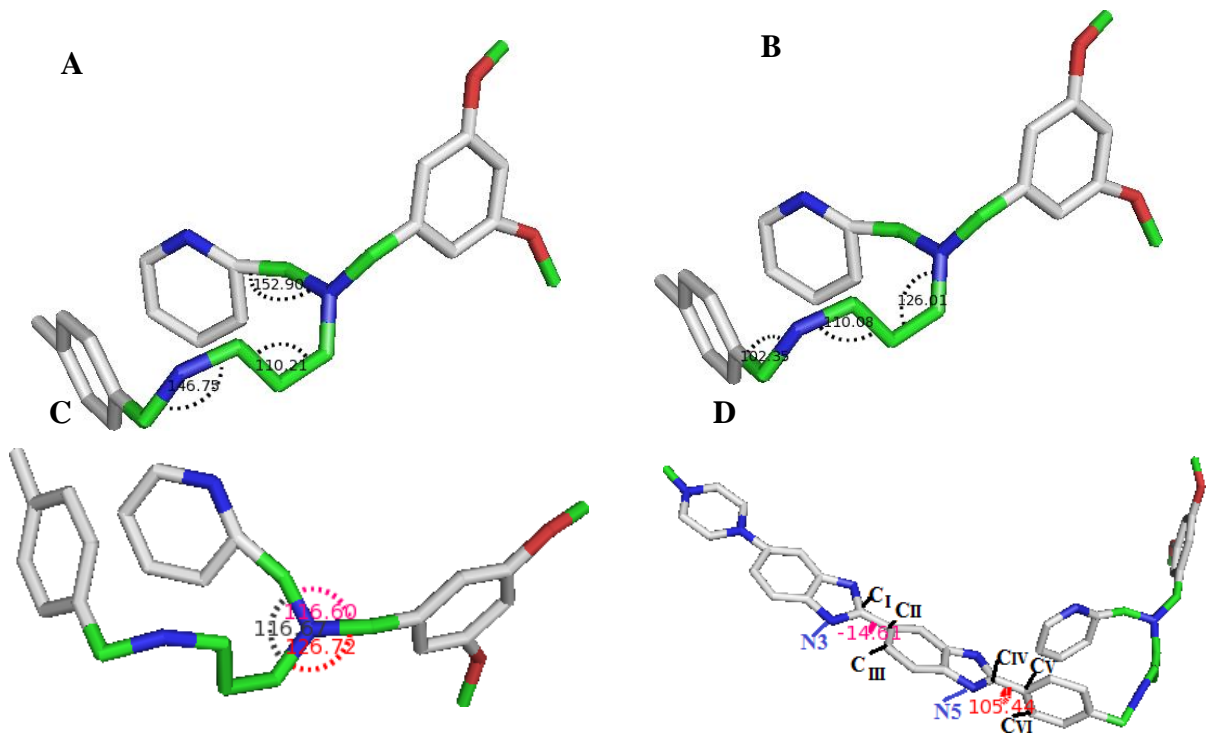
1	54.8
2	53.4
3	52.6
4	51.3
5	50.1
6	49.4
7	48.9
8	48.4
9	47.9

**Աղ. 6.**

3a միացու թյ ան ինամակցու թյ ու նները 5'-d(CGCGAATTCGCG)-3' ԴՆԹ-ի դոդեկամերի նկատմամբ տարբեր կոնֆորմացիաների դեպքում:

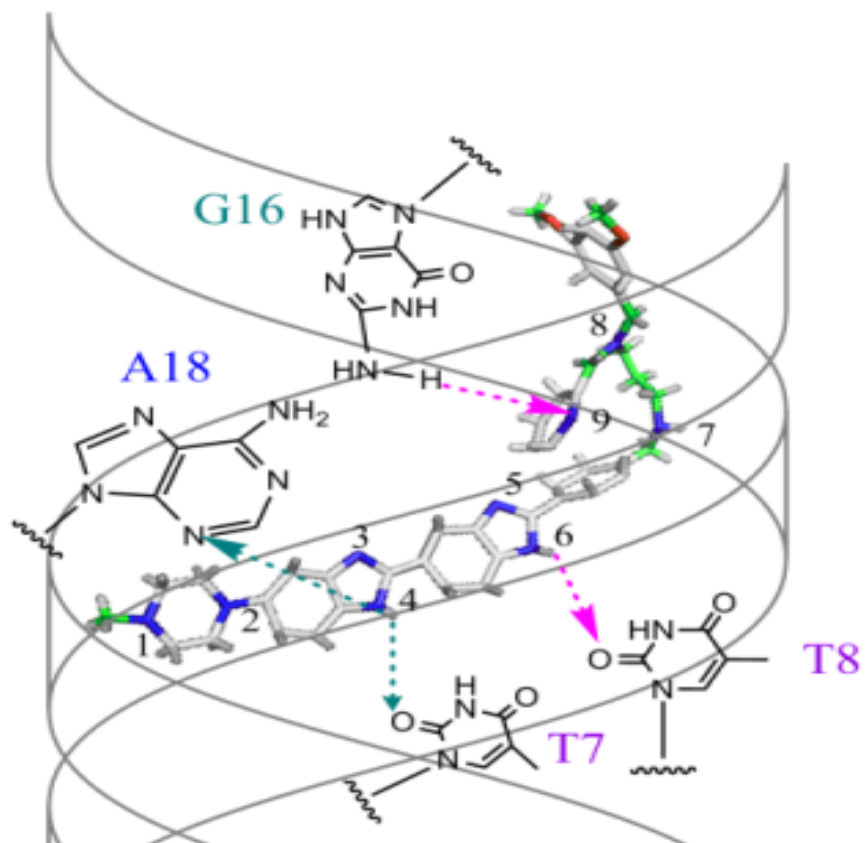
Նկ. 61-ում պատկերված է 3a-ի կոնֆորմացիան ԴՆԹ-ի նկատմամբ ամենամեծ ինամակցու թյ ան դեպքում: Դոքինգի արդյունքները ի հայտ են բերում ջրածնական կապի միջոցով փոխազդեցու թյ ան հնարավորու թյ ու ն բենզիմիդազոլ այ ին օղակի N-H խմբի և ԴՆԹ-ի Ա և Թ հիմքերի միջև, ԴՆԹ-ի փոքր ակոսի հատակում, որը բնութագրական է Hoechst-ի ընտանիքին պատկանող բենզիմիդազոլ պարունակող լիգանդների համար [83]: Ավելի ին, դոքինգի արդյունքները ցույց են տալիս ջրածնական կապերի առաջացումը պիրիդինային օղակի և գուանին ազոտային հիմքի միջև, որը մեծացնում է գուանին հիմքի նկատմամբ ինամակցու թյ ու նը 3a միացու թյ ան համար (ինչպես նաև նրա հոմոլոգների համար): Հայտնի է որ չմոդիֆիկացված Hoechst-ը թույլ է փոխազդում ԴՆԹ-ի ցիտոզին և գուանին հիմքերի հետ: Պիրիդինային օղակի ներմուծումը ապահովում է այս լիգանդների փոխազդեցու թյ ու նը գուանին ազոտային հիմքի հետ՝ մեծացնելով

Նշված միացուղյուկների կիրառման ապարտգը: Պիրիդինային օղակի ջրածնական կապի ակցեպտոր լինելը հաստատված էրևույթ է [84, 85]: Նկ. 62-ում ներկայացված են 3a միացուղյան Hoechst-ին կապված մնացորդի մանրակրտիտ պատկերը, որտեղ նշված են բոլոր անկյունները: Բոլոր պատկերները ստացվել են PyMOL համակարգչային ծրագրի օգնությամբ:



**Նկ. 62.** 3a միացուղյան կառուցվածքային հատկուղյուկները դոքինգի ենթարկված կոնֆորմացիայի դեպքում. **A, B, C** - 3a միացուղյան դիամինային խմբի կապերի միջև եղած անկյունները, (միևնույն խմբի պատկերները ցույց են տրված մի քանի անգամ պարզուղյան համար), **D.** Մուլեկուլի արոմատիկ օղակների միջև եղած երկնիստ անկյունները: Բոլոր անկյունները որոշվել են օգտագործելով PyMOL համակարգչային ծրագիրը:

ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերի հետ 3a միացուղյան առաջացրած հնարավոր ջրածնական կապերը ցույց են տրված նկ. 63-ում: Ելնելով ստացված տվյալներից, որոշվել են նաև նշված ջրածնական կապերի երկարուղյուկները, որոնք բերված են աղյուսակ 7-ում:



**Նկ. 63.** 3a միացույթի և ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերի միջև հնարավոր ջրածնական կապերի առաջացումը, որոնք ցույց են տրված կետավոր սլաքների տեսքով: Պարզույթի համար ցույց են տրված միայն այն ազոտային հիմքերը, որոնք մասնակցում են ջրածնական կապերի առաջացմանը:

Նկ. 63-ում ջրածնական կապերը հետևյալն են. I. 3a-ի N4 ազոտի ատոմի և 18 ադենին ազոտային հիմքի միջև (A18), II. 3a-ի N4 ազոտի ատոմի և 7 թիմին ազոտային հիմքի միջև (T7), (I և II-ը հավասար հավանական ջրածնական կապեր են), III. 3a-ի N6 ազոտի ատոմի ջրածնի և թիմին 8 ազոտային հիմքի միջև (T8), IV. 3a-ի N9 ազոտի ատոմի և գուանին 16 ազոտային հիմքի NH<sub>2</sub> խմբի միջև (G16): ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրի ազոտային հիմքերը համարակալվել են սկսած 5' ուղղությունից:

#### Նկ. 7.

Լիգանդ-ԴՆԹ ջրածնական կապերի հեռավորությունները 3a և



5'-d(CGCGAATTCGCG)-3' օլիգոնուկլեոտիդի հաջորդականության միջև առաջացած կոմպլեքսի համար

3a մոլեկուլի ատոմը	ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքի ատոմը	Հեռավորություն (Å)
H (N4)	O2 (T7)	3.1
H (N4)	N3 (A18)	2.9
H (N6)	O2 (T8)	3.2
N9	H (NH2) (G16)	3.0

Ինչպես երևում է աղյուսակ 7-ի տվյալներից, ջրածնական կապերի երկարությունները ընկած են 3 Å-ի տիրույթում:

Այսպիսով, մոլեկուլային դոքինգի արդյունքները բացահայտում են 3a միացության և ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերի միջև առկա փոխազդեցությունները, հնարավորություն են տալիս գնահատել 3a-ի խնամակցությունը ԴՆԹ-ի դոդեկամերի նկատմամբ: Ջրածնական կապերը առաջանում են 3a մոլեկուլի ազոտի ատոմներ և ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերի միջև: Կատարված հաշվարկների միջոցով որոշվել են հնարավոր ջրածնական կապերի հեռավորությունները:

**ԵԶՐԱԿԱՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ**

1. Էլեկտրոնային կլանման և  $\Phi$ լուորեսցեստային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդներով ցույց է տրվել, որ ԴՄՍՕ-ն նվազեցնում է Hoechst-ԴՆԹ կոմպլեքսի ջերմային կայունությունը:  $\Phi$ լուորեսցեստային անիզոտրոպիայի մեթոդով որոշվել է ԴՆԹ-ի հետ կապված էթիդիոլմի բրոմիդի անիզոտրոպիան և մոլեկուլի անկյունային տեղաշարժը:
2. Էլեկտրոնային կլանման,  $\Phi$ լուորեսցեստային, շրջանային դիֆրոիզմի սպեկտրոսկոպիաների միջոցով բազմակողմանիորեն նկարագրվել են Hoechst-ի նորածանցյալների խնամակցությունները տարբեր ԴՆԹ-ների նկատմամբ: Էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի արդյունքները ցույց են տվել, որ «ամին» տիպի ածանցյալները նկարագրվում են ավելի բարձր խնամակցությամբ հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ի և պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-ի նկատմամբ, քան նրանց «ալկին» ածանցյալները, որը պայմանավորված է մոլեկուլի տարբեր հատվածների շարժունակությամբ և Էլեկտրոստատիկ փոխազդեցություններով:
3.  $\Phi$ լուորեսցեստային սպեկտրոսկոպիայի չափումները ի հայտ են բերում 3a միացության (որպես ԴՆԹ-ի նկատմամբ ամենամեծ խնամակցություն ունեցող ածանցյալի) խնամակցությունը՝ կախված ԴՆԹ-ի օլիգոնուկլեոտիդների հաջորդականությունից: Արդյունքները ցույց են տալիս, որ 3a-ի խնամակցությունը, կախված նուկլեոտիդների հաջորդականությունից, աճում է հետևյալ հաջորդականությամբ. TATA<TTAA<TAAT<ATAT<AATT:
4. Hoechst-ի ածանցյալների և 20 ազոտային հիմք պարունակող օլիգոնուկլեոտիդների հետ ջերմային հալման հետազոտությունները հաստատում են Էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի միջոցով գնահատված խնամակցությունները: Շրջանային դիֆրոիզմի չափումները ցույց են տալիս 3a-ի կապումը 3Թ-ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում: Մոլեկուլային դոքիմիկ չափումները ի հայտ են բերում 3a միացության և ԴՆԹ-ի օլիգոնուկլեոտիդի միջև հնարավոր

Ջրածնական կապերը: Ջրածնական կապերի առաջացմանը մասնակցում են 3a մոլեկուլի ազոտի ատոմները և ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերը:

## ՕԳՏԱԳՈՐԾՎԱԾ ՀԱՊԱՎՈՒՄՆԵՐԸ

ԴՄՍՕ - դիմեթիլ սուլֆոքսիդ

ԴԷՍՕ – դիէթիլ սուլֆոքսիդ

ԴՆԹ – դեզօքսիռիբոնուկլեինաթթու

ՌՆԹ - ռիբոնուկլեինաթթու

ՀԹ-ԴՆԹ – հորթի թիմուսի ԴՆԹ

Պոլի[d(A-T)<sub>2</sub>]-պոլիդեզօքսիադենիլ թիմինիլ նուկլեինաթթու

ԷԲ - Էթիդիոլ մի քրոմիդ

Ա/Ա - ադենին

Գ/Գ - գուանին

Թ/Թ – թիմին

Ց/Ց – ցիտոզին

ԴԱՊԻ - 4',6-դիամինո-2-թենիլ ինդոլ

ՖՈԷԱ-Ֆլուորեսցենտային ռեզոնանսային Էներգիայի անցում

## ՆԱՆՈՐՈՒԹՅՈՒՆ

Մուշեղ Կառնախոսու թյան հետազոտական մասը իրականացվել է Երևանի պետական համալսարանի «Ֆիզիկական քիմիայի» ամբիոնում և Մոսկվայի համալսարանի (Ֆրանսիա) «Մաքս Մուսղոն» գիտահետազոտական կարոտորիայում «Erasmus mundus» միջհամալսարանական փոխանակային ծրագրի շրջանակներում:

## ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Chaires J.B., *Drug-DNA interactions*. Current Opinion in Structural Biology, 1998, v. 8, №3, p. 314-320.
2. Stokke T. and Steen H.B., *Multiple binding modes for Hoechst 33258 to DNA*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1985. v. 33, №4, p. 333-338.
3. Smith J.D., *Biophysics: An introduction: Cotterill, Rodney*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2003. v. 31, №3 p. 218-219.
4. Evans M.S., Reid K.H., and Sharp J.B., *Dimethylsulfoxide (DMSO) blocks conduction in peripheral nerve C fibers: a possible mechanism of analgesia*. Neurosci Lett, 1993, v. 150, №2, p. 145-148.
5. David N.A., *The Pharmacology of Dimethyl Sulfoxide*. Annual Review of Pharmacology, 1972, v. 12, №1, p. 353-374.
6. Kopka M.L., Yoon C., Goodsell D., Pjura P., and Dickerson R. E., *Binding of an antitumor drug to DNA netropsin and C-G-C-G-A-A-T-T-BrC-G-C-G*. Journal of Molecular Biology, 1985, v. 183, №4, p. 553-563.
7. Kopka M.L., Yoon C., Goodsell D., Pjura P., and Dickerson R. E., *The molecular-origin of dna drug specificity in netropsin and distamycin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985, v. 82, №5, p. 1376-1380.
8. Lipfert J., Klijnhout S., and Dekker N.H., *Torsional sensing of small-molecule binding using magnetic tweezers*. Nucleic Acids Research, 2010, v. 38, №20, p. 7122-7132.
9. Malcolm A.D.B. and Snounou G., *Netropsin increases the linking number of DNA*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1982, v. 47, p. 323-326.
10. Snounou G. and Malcolm A.D.B., *Production of positively supercoiled DNA by netropsin*. Journal of Molecular Biology, 1983, v. 167, №1, p. 211-216.
11. Triebel H., Bär H., Walter A., Burckhardt G., Zimmer C., *Modulation of DNA supercoiling by interaction with netropsin and other minor-groove binders*. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 1994, 11, №5, p. 1085-1105.
12. Zimmer C., and Wahnert U., *Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological*

- investigations of the genetic material*. Prog Biophys Mol Biol, 1986, 47, №1, p. 31-112.
13. Baraldi P.G., Preti D., Fruttarolo F., Tabrizi M.A., Romagnoli R., *Hybrid molecules between distamycin A and active moieties of antitumor agents*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007, v. 15, №1, p. 17-35.
  14. Barrett M.P., Gemmell C.G., and Suckling C.J., *Minor groove binders as anti-infective agents*. Pharmacology & Therapeutics, 2013, v. 139, №1, p. 12-23.
  15. Fesen M. and Pommier Y., *Mammalian topoisomerase-ii activity is modulated by the DNA minor groove binder distamycin in simian virus-40 dna*. Journal of Biological Chemistry, 1989, v. 264, №19, p. 11354-11359.
  16. Majumder P., Banerjee A, Shandilya J, Senapati P, Chatterjee S, Kundu TK, Dasgupta D., *Minor Groove Binder Distamycin Remodels Chromatin but Inhibits Transcription*. Plos One, 2013, v. 8, №2, p. 9-18.
  17. Pagano B., Fotticchia I, De Tito S, Mattia CA, Mayol L, Novellino E, Randazzo A., Giancola C., *Selective Binding of Distamycin A Derivative to G-Quadruplex Structure d(TGGGGT)<sub>4</sub>*. Journal of nucleic acids, 2010, v. 2010, ID 247137.
  18. Vijayanthi T., Bando T, Pandian GN, Sugiyama H., *Progress and Prospects of Pyrrole-Imidazole Polyamide-Fluorophore Conjugates as Sequence-Selective DNA Probes*. Chembiochem, 2012, v. 13, №15, p. 2170-2185.
  19. Ashwoodsmith M.J., *Human sperm sex selection - safety of human sperm selection by flow-cytometry*. Human Reproduction, 1994, v. 9, №5, p. 757-757.
  20. Breusegem S.Y., Clegg R.M., and Loontjens F.G., *Base-sequence specificity of Hoechst 33258 and DAPI binding to five (A/T)<sub>4</sub> DNA sites with kinetic evidence for more than one high-affinity Hoechst 33258-AATT complex*. Journal of Molecular Biology, 2002, v. 315, №5, p. 1049-1061.
  21. Kubbies, M., *Flow cytometric recognition of clastogen induced chromatin damage in g0/g1 lymphocytes by nonstoichiometric hoechst fluorochrome binding*. Cytometry, 1990, v. 11, №3, p. 386-394.
  22. Kubbies M. and Rabinovitch P.S., *Flow cytometric analysis of factors which influence the brdurd-hoechst quenching effect in cultivated human-fibroblasts and lymphocytes*. Cytometry, 1983, v. 3, №4, p. 276-281.

23. Latt S.A. and Stetten G., *Spectral studies on 33258-hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic-acid synthesis*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1976, v. 24, №1, p. 24-33.
24. Latt S.A., Stetten G., Juergens L.A., Willard H.F., Scher C.D., *Recent developments in detection of deoxyribonucleic-acid synthesis by 33258-hoechst fluorescence*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1975, v. 23, №7, p. 493-505.
25. Mocharla R., Mocharla H., and Hodes M.E., *A novel, sensitive fluorometric staining technique for the detection of dna in rna preparations*. Nucleic Acids Research, 1987, v. 15, №24, p. 10589-10589.
26. Parrilla I., Vazquez J. M., Cuello C., Gil, M. A., Roca, J., Di Bernardino, D., Martinez E. A., *Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa*. Reproduction, 2004, v. 128, №5, p. 615-621.
27. Portugal J. and Waring M.J., *Assignment of DNA-binding sites for 4',6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (hoechst-33258) - a comparative footprinting study*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1988, v. 949, №2, p. 158-168.
28. Sterzel W., Bedford P., and Eisenbrand G., *Automated-determination of dna using the fluorochrome hoechst-33258*. Analytical Biochemistry, 1985, v. 147, №2, p. 462-467.
29. Lee M.S., Johansen L., Zhang Y. Z., Wilson A., Keegan M., Avery W., Elliott P., Borisy A. A., Keith C. T., *The novel combination of chlorpromazine and pentamidine exerts synergistic antiproliferative effects through dual mitotic action*. Cancer Res. 2007, v. 67, №23, p. 11359-11367.
30. Nguewa P.A., Fuertes M. A., Cepeda V., Iborra S., Carrion, J.; Valladares B.; Alonso C.; Perez J. M., *Pentamidine is an antiparasitic and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin*. Chemistry & Biodiversity, 2005, v. 2, №10, p. 1387-1400.
31. Sun T. and Zhang Y., *Pentamidine binds to tRNA through non-specific hydrophobic interactions and inhibits aminoacylation and translation*. Nucleic Acids Research, 2008, v. 36, №5, p. 1654-1664.
32. Thakur C.P., Kumar M., and Pandey A.K., *Comparison of regimes of treatment of antimony-resistant kala-azar patients - a randomized study*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1991, v. 45, №4, p. 435-441.



33. Biancardi A., Biver T., Secco F.; Mennucci B., *An investigation of the photophysical properties of minor groove bound and intercalated DAPI through quantum-mechanical and spectroscopic tools*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013, v. 15, №13, p. 4596-4603.
34. Kapuscinski J., *DAPI-a dna-specific fluorescent-probe*. Biotechnic & Histochemistry, 1995, v. 70, №5, p. 220-233.
35. Ohta T., Tokishita S., and Yamagata H., *Ethidium bromide and SYBR Green I enhance the genotoxicity of UV-irradiation and chemical mutagens in E-coli*. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2001, v. 492, №1, p. 91-97.
36. Russell W.C., Newman C., and Williamson D.H., *Simple cytochemical technique for demonstration of dna in cells infected with mycoplasmas and viruses*. Nature, 1975, v. 253, №5491, p. 461-462.
37. Zink D., Sadoni N., and Stelzer E., *Visualizing chromatin and chromosomes in living cells*. Methods, 2003, 29, №1, p. 42-50.
38. Loontjens, F.G., Regenfuss P., Zechel A., Dumortier L., Clegg, R. M., *Binding characteristics of hoechst-33258 with calf thymus dna, poly d(A-T) , and d(CCGGAATTCCGG) - multiple stoichiometries and determination of tight-binding with a wide spectrum of site affinities*. Biochemistry, 1990, 29, №38, p. 9029-9039.
39. Weisblum B. and Haenssle E., *Fluorometric properties of bibenzimidazole derivative hoechst 33258, a fluorescent-probe specific for AT concentration in chromosomal DNA*. Chromosoma, 1974, v. 46, №3, p. 255-260.
40. Mikhailov, M.V., Zasedatelev A. S., Krylov A. S., Gurskii G. V., *Mechanism of the recognition of AT pairs in DNA by molecules of the dye HOECHST 33258*. Molecular Biology, 1981, v. 15, №3, p. 541-554.
41. Steiner R.F., and Sternberg H., *Interaction of HOECHST-33258 with natural and biosynthetic nucleic-acids*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1979, v. 197, №2, p. 580-588.
42. Zimmer C. and Wahnert U., *Nonintercalating DNA-binding ligands - specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material*. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 1986, v. 47, №1, p. 31-112.

43. Teng, M., Usman N.; Frederick C. A.; Wang, A. H. J., *The molecular-structure of the complex of HOECHST-33258 and the DNA dodecamer d(CGCGAATTCGCG)*. Nucleic Acids Research, 1988, v. 16, №6, p. 2671-2690.
44. Huang C.Y., *Determination of binding stoichiometry by the continuous variation method - the job plot*. Methods in Enzymology, 1982, v. 87: p. 509-525.
45. Job P., *Studies on the formation of complex minerals in solution and on their stability*. Annales De Chimie France, 1928, v. 9, p. 113-203.
46. Krey A.K. and Hahn F.E., *Studies on methyl green DNA complex and its dissociation by drugs*. Biochemistry, 1975, v. 14, №23, p. 5061-5067.
47. Baguley B.C., *Non-intercalative DNA-binding anti-tumor compounds*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1982, v. 43, №3, p. 167-181.
48. Langlois R.G. and Jensen R.H., *Interactions between pairs of dna-specific fluorescent stains bound to mammalian-cells*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1979, v. 27, №1, p. 72-79.
49. Harshman K.D. and Dervan P.B., *Molecular recognition of B-DNA by HOECHST 33258*. Nucleic Acids Research, 1985, v. 13, №13, p. 4825-4835.
50. Martin R.F. and Holmes N., *Use of an I-125-labeled DNA ligand to probe DNA-structure*. Nature, 1983, v. 302, №5907, p. 452-454.
51. Jorgenson K.F., Varshney U., and Vandesande J.H., *Interaction of HOECHST-33258 with repeating synthetic dna polymers and natural DNA*. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 1988, v. 5, №5, p. 1005-1023.
52. Pjura P.E., Grzeskowiak K., and Dickerson R.E., *Binding of HOECHST-33258 to the minor groove of B-DNA*. Journal of Molecular Biology, 1987. 197, №2, p. 257-271.
53. Scheibe G., *On the stereoisomery of organic colourings and their connections to the constitution and characteristics of reversible polymeric colourings*. Angewandte Chemie, 1939, v. 52, p. 631-637.
54. Busto N., Cano B., Tejido R., Biver T., Leal J. M., Venturini, M., Secco, F., Garcia, B., *Aggregation Features and Fluorescence of Hoechst 33258*. Journal of Physical Chemistry B, 2015, v. 119, №13, p. 4575-4581.
55. Bazhulina N.P., Nikitin A. M., Rodin S. A., Surovaya A. N., Kravatsky Y. V., Pismensky, V. F., Archipova V. S., Martin R., Gursky G. V., *Binding of Hoechst*

- 33258 and its Derivatives to DNA*. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2009, v. 26, №6, p. 701-718.
56. Sando S., Narita A., Hayami M., Aoyama Y., *Transcription monitoring using fused RNA with a dye-binding light-up aptamer as a tag: a blue fluorescent RNA*. Chemical Communications, 2008 v. 33, p. 3858-3860.
57. Lakowicz J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2007, Springer USA.
58. Vardevanyan, P.O., Antonyan A. P., Parsadanyan M. A., Pirumyan K. V., Muradyan A. M., Karapetian A. T., *Influence of ionic strength on Hoechst 33258 binding with DNA*. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2008, v. 25, №6, p. 641-646.
59. Karlsson H.J., Eriksson M., Perzon E., Akerman B.; Lincoln P.; Westman G., *Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: syntheses and characterization of the DNA-binding*. Nucleic Acids Research, 2003, v. 31, №21, p. 6227-6234.
60. Norden B., Kubista M., and Kurucsev T., *Linear dichroism spectroscopy of nucleic acids*. Quarterly Reviews of Biophysics, 1992, v. 25, №1, p. 51-170.
61. Coupez B. and Lewis R.A., *Docking and scoring - Theoretically easy, practically impossible?* Current Medicinal Chemistry, 2006, v. 13, №25, p. 2995-3003.
62. Halperin I., Ma B.Y., Wolfson H., Nussinov R., *Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions*. Proteins-Structure Function and Genetics, 2002, v. 47, №4, p. 409-443.
63. Kitchen D.B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J., *Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications*. Nature Reviews Drug Discovery, 2004, v. 3, №11, p. 935-949.
64. Leach A.R., Shoichet B.K., and Peishoff C.E., *Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: Successes and gaps*. Journal of Medicinal Chemistry, 2006, v. 49, №20, p. 5851-5855.
65. Mohan V., Gibbs A. C., Cummings M. D., Jaeger E. P., DesJarlais R. L., *Docking: Successes and challenges*. Current Pharmaceutical Design, 2005, v. 11, №3, p. 323-333.
66. Sousa S.F., Fernandes P.A., and Ramos M.J., *Protein-ligand docking: Current status and future challenges*. Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 2006, v. 65, №1, p. 15-26.

67. Taylor R.D., Jewsbury P.J., and Essex J.W., *A review of protein-small molecule docking methods*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2002, v. 16, №3, p. 151-166.
68. Trott O. and Olson A.J., *Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading*. Journal of Computational Chemistry, 2010, v. 31, №2, p. 455-461.
69. Cosconati S., Forli S.; Perryman A. L.; Harris R.; Goodsell D. S.; Olson A. J., *Virtual screening with AutoDock: theory and practice*. Expert Opinion on Drug Discovery, 2010, v. 5, №6, p. 597-607.
70. Ամիրբեկյան Կ., Պետրոսյան Յ., *ԴԼԹ-Էթիդիոլմի բրոմիդ փոխազդեցության ու սուլֆոնամիդների ներդրումը ֆլուորեսցենսային անիզոտրոպիայի միջոցով*, ԵՊՀ ՌԻԳԸ գիտական հոդվածների ժողովածու, 2015, 1.1 №4, բնական գիտությունների (կենսաբանություն և քիմիա), 126-130.
71. Ismail M.A., Rodger P.M., and Rodger A., *Drug Self-Assembly on DNA: Sequence Effects with trans-bis-(4-N-methylpyridiniumyl)diphenyl Porphyrin and Hoechst 33258*. Journal of biomolecular structure & dynamics, 2000. 17 Suppl 1: p. 335-348.
72. Jin R. and Breslauer K.J., *Characterization of the minor groove environment in a drug dna complex - bisbenzimidazole bound to the Polyd(AT) .Poly d(AT) duplex*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, v. 85, №23, p. 8939-8942.
73. Kaushik M. and Kukreti S., *Temperature induced hyperchromism exhibited by Hoechst 33258: evidence of drug aggregation from UV-melting method*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2003, v. 59, №13, p. 3123-3129.
74. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., and Ivanov S.D., *Spectral properties of bisbenzimidazole dyes upon interaction with DNA*. Bioorganicheskaya Khimiya, 1997, v. 23, №12, p. 969-978.
75. Aznauryan M.G. and Markarian S.A., *Properties of DNA plus Dipropylsulfoxide or Dibutylsulfoxide plus Water Ternary Solutions*. Journal of Solution Chemistry, 2010, v. 39, №1, p. 43-50.

76. Markarian S.A., Asatryan A. M., Grigoryan K. R., Sargsyan H. R., *Effect of diethylsulfoxide on the thermal denaturation of DNA*. Biopolymers, 2006, v. 82, №1, p. 1-5.
77. Amirbekyan K.Y., Antonyan A. P.; Vardevanyan P. O.; Markarian S. A., *Molecular interactions between benzimide trichloride (Hoechst 33258) and DNA in dimethyl sulfoxide aqueous solutions, according to spectroscopy data*. Russian Journal of Physical Chemistry A, 2013, v. 87, №12, p. 2027-2029.
78. Amirbekyan K. Yu., *Study of interaction of Hoechst 33258 and DNA in water–dmso mixed solvents*, Proceedings of the Yerevan State University, 2016, № 1, pp. 10–13.
79. Amirbekyan, K., Duchemin N.; Benedetti E.; Joseph R.; Colon A.; Markarian S. A.; Bethge L.; Vonhoff S.; Klussmann S.; Cossy J.; Vasseur J.-J.; Arseniyadis S.; Smietana, M., *Design, Synthesis and Binding Affinity Evaluation of Hoechst 33258 Derivatives for the Development of Sequence-specific DNA-based Asymmetric Catalysts*. ACS Catalysis, 2016, v. 6, №5, p. 3096-3105.
80. Abudaya A., Brown P.M., and Fox K.R., *DNA-sequence preferences of several at-selective minor-groove binding ligands*. Nucleic Acids Research, 1995, v. 23, №17, p. 3385-3392.
81. Rettig M., Kamal A., Ramu R., Mikolajczak J., Weisz K., *Spectroscopic and calorimetric studies on the DNA recognition of pyrrolo 2,1-c 1,4 benzodiazepine hybrids*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009, v. 17, №2, p. 919-928.
82. Wilson, W.D., Tanious F. A., Fernandez-Saiz M., Rigl C. T., *Evaluation of drug-nucleic acid interactions by thermal melting curves*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1997, v.90, p. 219-240.
83. Clark G.R., Boykin D. W., Czarny A., Neidle S., *Structure of a bis-amidinium derivative of Hoechst 33258 complexed to dodecanucleotide d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub>: The role of hydrogen bonding in minor groove drug-DNA recognition*. Nucleic Acids Research, 1997, v. 25, №8, p. 1510-1515.
84. Du Y., Du X., and George S.M., *Mechanism of pyridine-catalyzed SiO<sub>2</sub> atomic layer deposition studied by Fourier transform infrared spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry C, 2007, v. 111, №1, p. 219-226.

85. Li T.L., Zhou P.P., and Mattei A., *Electronic origin of pyridinyl N as a better hydrogen-bonding acceptor than carbonyl O*. Crystengcomm, 2011, v. 13, №21, p. 6356-6360.