

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՀՈՒՆԱՆՅԱՆ ԼԵՌՆԻԿ ՍՈՒՐԻԿԻ

ԴՆԹ-Ի ՀԵՏ ՀԻՊԵՐԻՑԻՆԻ ԵՎ ՊՈԴՖԻԼՈՏՈՔՍԻՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԴԻՆԱՄԻԿԱՅԻ ՄԵԹՈԴԻ
ՕԳՆՈՒԹՅԱՄԲ

Գ.00.02 – Կենսաֆիզիկա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

Ս Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Ր

ԵՐԵՎԱՆ 2014

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

УНАНЯН ЛЕРНИК СУРИКОВИЧ

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИПЕРИЦИНА И ПОДОФИЛЛОТОКСИНОВ
С ДНК МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.02 – Биофизика

ЕРЕВАН 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում:

Գիտական ղեկավար՝

կենս. գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր Հ. Ռ. Վարդապետյան

Պաշտոնական ընդհանխոսներ՝

կենս. գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր Պ. Հ. Վարդևանյան

ֆիզ.-մաթ. գիտ. թեկնածու,
դոցենտ Ա. Հ. Պողոսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

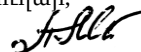
ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2014թ. հունիսի 17-ին, ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2014թ. մայիսի 17-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ՝

 Ս. Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:

доктор биол. наук,
профессор Г. Р. Вардапетян

Официальные оппоненты:

доктор биол. наук,
профессор П.О. Вардеванян,

кандидат физ.-мат. наук,
доцент А.Г. Погосян

Ведущая организация:

Институт молекулярной биологии НАН РА

Защита диссертации состоится 17-го июня 2014г., в 14⁰⁰ часов, на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 17-го мая 2014г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051
кандидат биологических наук, доцент

 М.А. Парсаданян

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы С развитием химической индустрии в нашу жизнь все интенсивнее вторгаются антропогенные ксенобиотики: лекарства, пестициды, гербициды, красители, консерванты, пищевые добавки, косметические средства и др. Попадая в организм, эти вещества могут нарушать нормальные процессы жизнедеятельности, приводить к интоксикациям, мутациям, аллергическим реакциям, могут накапливаться в тканях. Информация о биотрансформациях используется при создании про-лекарств с целью оптимизации фармакокинетических параметров исходной субстанции и фармакодинамических характеристик активного метаболита, при создании так называемых мягких лекарств (*soft drugs*), т.е. соединений, которые разрушаются в живом организме до предсказуемых нетоксичных и неактивных метаболитов после осуществления ими терапевтического воздействия.

В настоящее время фармацевтические компании тратят свыше десяти лет и миллионы долларов на создание и тестирование новых лекарственных препаратов. Несмотря на такие затраты времени и ресурсов, полученные препараты не всегда являются безвредными и зачастую приводят к развитию серьезных осложнений. В доказательство этому можно привести примеры гуманитарных катастроф XX-го века, вызванные побочными эффектами лекарственных препаратов. К наиболее опасным из побочных эффектов можно отнести те, которые обусловлены взаимодействием лекарственных препаратов с наследственным материалом, что отражается на генетике пациентов и может передаваться по наследству следующим поколениям.

В связи с этим чрезвычайно актуальна разработка методов экспресс оценки потенциальных и возможных реальных рисков и прогнозирование возможных побочных эффектов. Одной из современных методик, которая используется в медико-биологических, биофизических и молекулярно-биологических исследованиях, считается метод молекулярной динамики (ММД).

ММД представляет собой компьютерный эксперимент по моделированию поведения молекулярной системы во времени с помощью численного интегрирования уравнений движения. В приложении к биомолекулярным системам метод классической молекулярной динамики (МД) позволяет решать большое число практически важных задач, прежде всего, моделировать конформационные превращения белков и нуклеиновых кислот. Этот метод дает нам возможность наряду с конструированием новых лекарственных препаратов, определять возможные типы и параметры взаимодействия, а также, что немаловажно, прогнозировать ожидаемые результаты в исследованиях разных типов взаимодействий лиганд - мишень. Такие исследования с использованием разных экспериментальных методик не всегда возможны, так как связаны с трудностями, зависящими от чувствительности аппаратуры и условий эксперимента.

В силу этого, актуальными являются исследования, проводимые ММД, которые призваны облегчить изучение взаимодействия биологически активных соединений различной природы с субклеточными структурами, в частности с ДНК, которая является основным носителем и передатчиком наследственной информации.

Подобные исследования актуальны еще и потому, что при анализе полученных результатов могут проявляться параметры, которые позволят повысить эффективность действия лекарственных препаратов, а также выявлять молекулярные механизмы их действия на генетический аппарат клетки.

Компьютерные методы позволяют не только прогнозировать биотрансформацию химических структур, в том числе виртуальных, но и прогнозировать молекулярные механизмы их взаимодействия с основными субклеточными структурами клетки. Молекулярное моделирование, в частности, молекулярный докинг, и методы квантовой химии лежат в основе анализа взаимодействия низкомолекулярных лигандов и

клеточных мишеней с учетом их пространственной структуры.

Цель и задачи исследования

Целью работы явилось:

- Исследование взаимодействия лигнанов, диантронов и алкалоидов с ДНК методом молекулярной динамики.
- Определение основных физико-химических и биофизических параметров взаимодействия.
- Выявление числа мест и параметров связывания исследуемых соединений с ДНК.
- Сравнение параметров, полученных методом молекулярной динамики, с результатами, полученными экспериментальным путем.
- Исследование особенностей взаимодействия лигандов различной природы (лигнанов, диантронов и алкалоидов) с ДНК.

Осуществление поставленной цели достигалось решением следующих задач:

1. Построение молекулярных моделей исследуемых соединений (лигнанов, диантронов и алкалоидов).
2. Исследование взаимодействия подофиллотоксина (Птокс) и его полусинтетических производных, этопозида (Этоп) и тенипозида (Тен) с молекулой ДНК *in silico*.
3. Исследование взаимодействия гиперлица (Гп) в водной среде и с молекулой ДНК *in silico*.
4. Исследование взаимодействия алкалоидов винбластина (ВБ), винкристина (ВК) и винорельбина (ВИ) с молекулой ДНК *in silico*.
5. Определение типов, возможных мест связывания и параметров взаимодействия исследуемых соединений с использованием разных программ по биомоделированию.
6. Сравнительный анализ результатов, полученных методом молекулярной динамики, с экспериментальными результатами.

Научная новизна и практическая ценность

Впервые были сконструированы молекулярные модели исследуемых соединений, сопоставимые с кристаллографическими данными. Были получены силовые поля и топологические файлы.

Методом МД обнаружены возможные места связывания исследуемых соединений (лигнанов, диантронов и алкалоидов) с ДНК.

Определены параметры и типы взаимодействия соединений различной природы с ДНК *in silico*.

Впервые ММД получены константы связывания и число мест связывания лигандов различной природы (лигнанов, диантронов и алкалоидов) на молекуле ДНК с использованием разных программ по биомоделированию.

Впервые проведен сравнительный анализ полученных результатов ММД с другими экспериментальными методами.

На защиту выносятся следующие основные положения

1. Птокс и Этоп взаимодействуют с ДНК двумя типами: сильным и слабым. По сравнению с Птокс, Этоп сильнее связывается с ДНК, хотя число мест связывания у него меньше, чем у Птокс.
2. Молекула Птокс при взаимодействии не имеет предрасположенности к конкретным сайтам по сравнению с Этоп.
3. ВБ и ВИ взаимодействуют с ДНК, причем взаимодействие приходится на большой желобок ДНК. Взаимодействие ВК с ДНК не наблюдается.

4. Гиперицин связывается с ДНК, при этом наблюдается слабый тип связывания.
5. Ограничения дозировки Гп при приеме внутрь могут быть обусловлены способностью молекулы Гп образовывать агрегаты.
6. ММД может стать удобным инструментом при исследованиях как с точки зрения конструирования или модификации новых лекарственных соединений (*drug - design*), так и для изучения взаимодействий разных соединений с субклеточными структурами.

Апробация работы.

Материалы диссертации были доложены на международных и республиканских конференциях: на 2-ой, 4-ой международной конференции “Biotechnology and Health” & DAAD Alumni seminar (Ереван, Армения, 2008, 2010), Международная конференция молодых ученых “Перспективы развития молекулярной и клеточной биологии” (Ереван, Армения, 2010), Шестая годовичная научная конференция РАУ (Ереван, Армения, 2011), Седьмая годовичная научная конференция РАУ (Ереван, Армения, 2012), Межвузовская конференция “Перспективы развития современной биологии” (Ереван, Армения, 2012), VI международная заочная научно-практическая конференция “Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии” (Москва, Россия, 2013), Международная научно-практическая конференция “Инновационная наука и современное общество” (Уфа, Россия, 2013), II Международная научная интернет – конференция: «Физико-химическая биология» (Ставрополь, Россия, 2013), V международная научно-практическая конференция "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине" (Санкт-Петербург, Россия, 2013).

Материалы диссертации также докладывались и обсуждались на кафедре молекулярно-клеточной биологии и медицинской биохимии РАУ, на кафедре биофизики ЕГУ.

Публикации: По теме диссертации опубликовано 11 статей и тезисов.

Объем и структура работы: Работа изложена на 122 страницах, содержит 24 таблиц, 26 рисунков и 6 диаграмм. Библиография включает 188 наименований литературных источников. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы приводятся: побочные эффекты действия лекарственных препаратов, последствия взаимодействия ЛС с клеточными структурами, особенности метода молекулярной динамики (ММД), сложности при моделировании биологических систем, история ММД, конструирование новых лекарственных средств (*drug - design*), вклад ММД в *drug - design*, перспективы метода МД, выбор лекарственных препаратов, взаимодействие биологически активных соединений с ДНК, основные типы исследуемых соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Конструирование молекулярных моделей. Для создания виртуальных молекулярных структур исследуемых соединений была использована программа “MarvinSketch”. После построения первичной структуры определялись заряды атомов, используя пакет “UCSF Chimera”, основанный на алгоритме AM1-BCC (полупирический (AM1) с применением “bond charge correction (BCC)”), который использует уравнение Шредингера (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Были получены силовые поля и топологические файлы исследуемых соединений с помощью “ACSPYR”, совместно с

“amber 99sb forcefield (GAFF)” (Wang et al., 2006).

Определение возможных мест связывания (Докинг). Для проведения симуляции взаимодействия и для выявления возможных сайтов связывания был использован метод “слепой способ”, в основе которого лежат программы “autodock” и “autodock vina” (Oleg et al., 2010).

Создание пространства виртуальной среды. Для проведения симуляции был выбран бокс додекаэдрного типа. Выбор данного типа бокса обусловлен параметрами симуляции (<http://www.bevanlab.biochem.vt.edu>).

Подготовка системы для проведения симуляции. Процесс подготовки можно распределить на: введение требуемых параметров (время, температура, давление, концентрация и т.д.), расположение молекул в боксе, растворитель (водное окружение, добавление ионов), минимизацию энергии системы. Расчет концентрации проводился по системе “число молекул – растворитель”, соответствующие определенной концентрации (Apol et al., 2000).

Определение тотальной энергии взаимодействия. Расчет энергии комплексообразования был проведен согласно уравнениям (Chaires, 1997, Lane & Jenkins, 2000).

Определение константы связывания. Константы связывания определялись по уравнению Гиббса для расчета константы связывания, проходящей в химической реакции (Базаров, 1991).

Расчет энергетических характеристик взаимодействия. При расчете были использованы уравнения, приведенные в работе (Apol et al., 2000), где описаны расчет кинетической энергии, потенциала Линерда-Джонса, кулоновских сил взаимодействия.

Модели ДНК. Для моделирования взаимодействия были использованы два двухцепочечных фрагмента ДНК. Первый фрагмент, состоящий из 18 пар оснований, был взят из базы данных RCSB (<http://www.rcsb.org>). А второй был создан нами, в соответствии с принятыми протоколами по биомоделированию (Macke et al., 2012), состоящий из 26 пар оснований.

Симуляционные боксы (все в одном). Процедура МД протекала с временным шагом $\Delta t = 2$ фс, при $T = 300$ К и давлением в 1 атм. Координаты всех атомов записывались каждые 2 пс. Расчетные критерии радиуса взаимодействия рассчитывались по стандарту: для Кулоновских взаимодействий - 0.9 нм, Ван-дер-ваальсовских взаимодействий – 1.4 нм (Hornak et al., 2006). В таблицах, на графиках и диаграммах приведены средние арифметические и их стандартные ошибки в 10 %.

Использованные программы и модули. “Marvin Sketch” - создание первичной структуры исследуемых соединений. “UCSF Chimera” - оптимизация структуры, заряды, углы. “ACPYPE”, “AmberTools” - amber 99sb forcefield (GAFF) - используются “UCSF Chimera”. “GROMACS” - процесс симуляции. “Autodock”, “Vina” - определение возможных сайтов связывания. “VMD” - визуализация процесса, LINUX - операционная система. Компьютер - 4-х ядерный на базе Intel Pentium®. Кластер PAU на базе Intel Pentium®. Кластер-online - The GROMACS web server и “WeNMR”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Построение молекулярных моделей

Для построения моделей молекул важным критерием является получение силовых полей и топологических файлов для исследуемых соединений. Отметим тот факт, что до настоящего времени в принятых базах данных (например NCBI) эти параметры отсутствуют или конструированные соединения не всегда соответствуют принятым стандартам, выявленным экспериментальным путем, например кристаллографическими данными. Для получения компьютерных моделей исследуемых соединений было необходимо создание моделей молекул, основанных на физико-химических, стерео-

химических, кристаллографических и других параметрах.

Молекула гиперицина. Пространственная оптимизация молекулы проводилась с учетом симметрии $C_{(III)}$ кольца по системе (Pertich et al., 1998). Полученные результаты свидетельствуют о том, что структура Гп не является плоской, боковые цепи ароматического скелета отталкиваются друг от друга, создавая форму "бабочки", и не допускают формирования плоской конформационной структуры, при этом боковые цепи имеют торсионные углы, равные 21.60° и 30.41° , соответственно. Длина молекулы Гп по оси (X) со стороны (I) и (III) кольца составляла $10.27 \text{ \AA}$, по оси (Y) со стороны (III) и (VIII) кольца $10.48 \text{ \AA}$, а диаметр окружности молекулы - $11,15 \text{ \AA}$. Процентное отклонение параметров, полученных с помощью кристаллографического анализа, от «натуральной» молекулы, не превышало 17% (<http://www.chemicalize.org>).

Молекула бромистого этидия. Проведенные расчеты пространственных параметров после построения молекулы БЭ и минимизации энергии выявили, что фенантридиновая часть молекулы БЭ имеет плоскую форму, а пространственная ориентация подвешного ароматического кольца отклоняется от плоскости фенантридиновой части на 0.3° , с торсионным углом 91.54° . Длина молекулы в обеих плоскостях, составляла по оси (X) - $10.87 \text{ \AA}$, по оси (Y) - $9.53 \text{ \AA}$, соответственно. Расстояние подвешного кольца от фенантридиновой части молекулы также было рассчитано и составляло $1.43 \text{ \AA}$, а диаметр окружности молекулы - $11.00 \text{ \AA}$. Полученные результаты коррелируют с литературными данными (Subramanian, 1971).

Молекула подофиллотоксина. Получены пространственные, стереохимические параметры Птокс, указывающие на то, что тетрациклическая часть молекулы имеет плоскую форму, кроме кольца D. За счет карбонильной группы кольцо D претерпевает деформацию и приобретает торсионный угол, с отклонением плоскости на 2.68° . Со стороны тетрациклической части по оси X длина молекулы составляет $9.17 \text{ \AA}$, а по оси Y со стороны подвешного E кольца $6.61 \text{ \AA}$. Также был рассчитан угол наклона кольца E по отношению к тетрациклической части, который составил 112.51° .

Молекула этопозида. Длина молекулы со стороны тетрациклической части по оси X= $9.00 \text{ \AA}$, по оси Y со стороны подвешных частей кольца D - $17.54 \text{ \AA}$. Также был рассчитан угол наклона кольца E по отношению к тетрациклической части, который составил 117.54° . Изменяется также угол наклона D кольца на $7.54 \text{ \AA}$. По сравнению с Птокс у Этоп угол наклона больше, что можно объяснить дополнительными ароматическими кольцами в кольце D, в присутствии которого наблюдается перекрывание поверхностных электростатических полей. У Птокс таких перекрываний не наблюдается. Модифицированная часть ароматического кольца имеет торсионный угол на 119.24° , по отношению к тетрациклической части.

Модифицированная часть кольца D имеет сложную структуру и не является плоской. Присутствующие гидроксильные группы отталкиваются друг от друга, принимая форму Z, с противоположным наклоном в 57.45° .

Молекула тениозида. Длина молекулы Тен по оси X= $9.93 \text{ \AA}$, Y= $17.48 \text{ \AA}$, угол наклона D кольца от плоскости тетрациклической части = 2.63° , также был рассчитан угол наклона кольца E по отношению к тетрациклической части, который составил 113.39° . Ароматическое кольцо модифицированной части идентично по параметрам Этоп. Торсионный угол наклона модифицированной части по отношению к тетрациклической части составляет 114.33° .

Молекулы винбластин, винкристин, винорелбин. Размеры молекулы ВБ по оси X= $18.51 \text{ \AA}$, по оси Y= $11.75 \text{ \AA}$, длина связи между катарантиновой и виндолиновой частью составляет $1.56 \text{ \AA}$. Размеры молекулы ВК по оси X= $14.33 \text{ \AA}$, Y= $12.77 \text{ \AA}$ длина связи между катарантиновой и виндолиновой частью составляет $1.53 \text{ \AA}$. Размеры молекулы ВИ по оси X= $17.59 \text{ \AA}$, Y= $11.74 \text{ \AA}$, длина связи между катарантиновой и виндолиновой частью составляет $1.51 \text{ \AA}$. По сравнению с ВБ молекула ВК более компактна. Это можно

объяснить углом наклона димерной структуры у *BK*, равным 118.12° в то время, как у *BB* он составляет 106.82° . Что касается *ВН*, то его параметры схожи с *BK* и угол наклона имеет значение 117.10° .

Внутримолекулярная связь исследуемых соединений

Известно, что внутримолекулярная связь влияет на физико-химические свойства молекул, например спектральные характеристики, вязкость, кислотно-щелочные свойства и т.д. С использованием ММД, нами был проведен расчет и анализ возможных внутримолекулярных связей всех исследуемых соединений. Результаты свидетельствуют о том, что после симуляции во временном интервале до 40 нс, используя платформу GROMACS, у *BB* и Гп образуются водородные связи, причем их количество больше у молекулы Гп. Исследования выявили наличие 4 внутримолекулярных связей у Гп, которые образуются между гидроксильными и карбонильными группами молекулы. Были рассчитаны дистанции этих связей, которые составляли $2.14 \text{ \AA}$ для $\text{H}_{47}\text{-O}_{48}$; $2.46 \text{ \AA}$ для $\text{H}_{50}\text{-O}_{48}$, и $2.15 \text{ \AA}$ для $\text{H}_{41}\text{-O}_{39}$; $2.52 \text{ \AA}$ для $\text{H}_{38}\text{-O}^{39}$, соответственно. Энергия этих связей при этом не превышает 20 КДж/моль .

Взаимодействие бромистого этидия (БЭ) с ДНК

В качестве стандарта для тестирования используемой ММД была выбрана молекула БЭ. БЭ является классическим интеркалятором и обычно используется для окрашивания ДНК и РНК. Механизм взаимодействия БЭ с ДНК хорошо изучен, в зависимости от разных физико-химических параметров.

Показано, что молекула БЭ связывается с ДНК как минимум двумя способами, один из которых является “сильным”, а другой “слабым” (Vardevanyan et al., 2003). Отличительной чертой “сильного” способа можно считать взаимодействие, при котором связывание не зависит от ионной силы (Вардеванян и Антонян, 2010). При этом наблюдается встраивание молекулы БЭ между парами оснований ДНК (интеркаляционный тип связывания). Второй “слабый” способ, сильно зависит от ионной силы, при котором наблюдается взаимодействие с внешними участками ДНК (Вардеванян и Антонян, 2010). Для проведения симуляции взаимодействия БЭ с ДНК и выявления возможных сайтов связывания был использован метод «слепой способ», описывающий энергетически выгодные точки возможного взаимодействия (Oleg et al., 2010). Полученные результаты показывают, что число мест связывания на 26 пар равно 9. Это означает, что одна молекула БЭ в среднем приходится на 2.9 пар оснований. Были рассчитаны параметры конкретных сайтов связывания и процесса интеркаляции. Надо отметить, что взаимодействие осуществляется как встраиванием БЭ между плоскостью пар оснований, так и с внешней стороны молекулы ДНК. Для более детального изучения процесса интеркаляции нами была проведена серия *in silico* экспериментов. Причем пространственная ориентация БЭ осуществлялась двумя путями: при 0° и при 180° относительно плоскости пар оснований (Рис. 1), для выяснения возможных влияний пространственной ориентации на процесс интеркаляции.

Интеркаляция GC-GC. В результате симуляции были получены пространственные и энергетические параметры процесса интеркаляции. Как предполагалось, молекула БЭ была встроена в плоскость между парами оснований. При этом наблюдались структурные изменения в ДНК. Расстояния между соседними парами оснований увеличивалось от $3.4 \text{ \AA}$ до $6.94 \text{ \AA}$ максимум, при этом уменьшались углы наклона пар оснований (Twist) от 36° до 15.7° , что означает “раскручивание” двойной спирали на 20.3° . Нужно отметить, что полученные результаты сопоставимы с экспериментальными данными (Vologodskii, 1998).

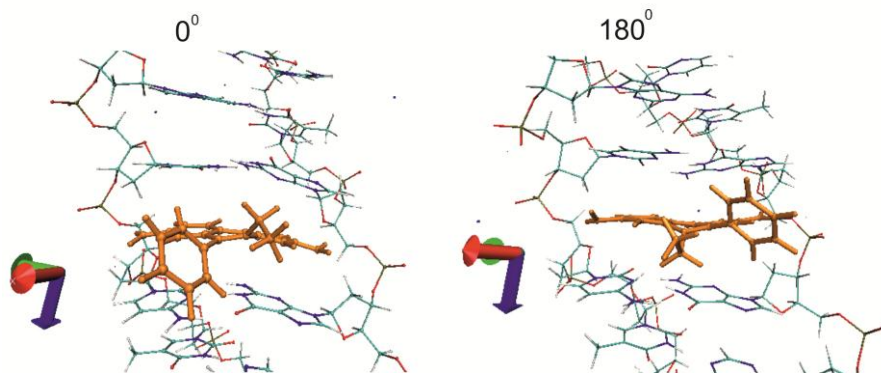


Рисунок 1. Пространственное расположение БЭ при интеркаляции (оранжевым цветом обозначены молекулы БЭ).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при интеркаляции пространственная ориентация молекулы БЭ почти не влияет на основные параметры интеркаляции. Об этом свидетельствуют также полученные энергетические параметры. Отклонение значения в 0,3 Кдж/моль можно отнести к флуктуациям, которые наблюдаются в системе. Используя возможности GROMACS, была рассчитана также totalная энергия взаимодействия, которая составила -6.1 Ккал/моль.

Интеркаляция AT – GC. Анализ литературы показывает, что при интеркаляции БЭ имеет слабо выраженную предпочтительность к GC-последовательностям (Кантор и Шиммель, 1985; Вардеванян и др., 2009). Эти результаты были получены с помощью разных методов исследования, включая спектрофотометрические, ЯМР исследования и др. Для проверки возможностей ММД были проведены *in silico* эксперименты для выявления различий между содержаниями пар оснований при интеркаляции.

При сравнении полученных результатов для AT-GC и GC-GC показано, что они отличаются незначительно. Нужно отметить, что у AT-GC наблюдаются те же пространственные параметры, что и у GC-GC, отличия состоят только в энергетических параметрах. Расчитанная totalная энергия взаимодействия равна - 6.4 Ккал/моль.

Интеркаляция на дефектном участке. Дефектные участки в молекуле ДНК являются потенциальными мишенями для соединений, которые взаимодействуют с ними. В медицинской практике этот подход используется не только как возможность индуцирования летальных процессов, происходящих на клеточном уровне, но и для диагностики состояния клеток в процессе лечения многих онкологических заболеваний (Ghosh et al., 2006). В литературе показано, что при переходе спираль-клубок наблюдаются разные способы связывания БЭ, в том числе и с возможными дефектными участками ДНК (Карапетян и др., 1989).

Исходя из этого, для проверки точности и правильности *in silico* эксперимента нами было рассмотрено взаимодействие БЭ с дефектным участком ДНК. В качестве дефектного участка была выбрана разорванная пара оснований в матрице ДНК (Рис 2.).

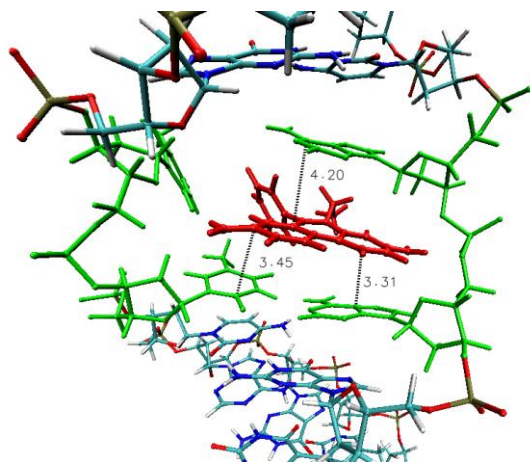


Рисунок 2. Интеркаляция в дефектный участок ДНК, (молекула БЭ обозначена красным цветом).

Как показывают полученные результаты, взаимодействие с дефектным участком несет относительно слабый характер, так как и пространственные параметры и энергетические показатели ниже по сравнению с аналогичными показателями процесса интеркаляции и для GC-GC, и для AT-GC.

При сравнении полученных результатов наблюдается разница, как для Кулоновских (≈ 10 КДж), так и для Ван-дер-Ваальсовых сил (≈ 3 КДж).

Используя возможности ММД, была получена константа связывания БЭ с молекулой ДНК, равная $K = 99.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Надо отметить, что наши результаты хорошо согласуются с известными литературными данными (Вардеванян и Антонян, 2010; Вардеванян и др., 2010; Arakelyan et al., 2008; Lipfert et al., 2008; Vardevanyan et al., 2003; Chitre et al., 1979). Сравнение результатов экспериментальных данных, полученных разными методами и ММД, приведены в табл.1.

Таблица 1.

Сравнительные параметры K_b и n , полученные разными методами.

N	Параметры	Экспериментальные данные			ММД
		Абсорбционная спектроскопия	Флуоресцентная спектроскопия	Метод магнитного пинцета	
1.	Константа связывания (K_b)	112×10^4	130×10^4	130×10^4	99.7×10^4
2.	Число пар оснований (n)	≈ 2.4	≈ 3.0	≈ 1.9	≈ 2.9

Связывание неинтеркаляционным способом (Взаимодействие с малым желобком)

Полученные результаты выявили, что взаимодействие происходит с расчетной дистанцией от ДНК в среднем на 3.49 Å. Расположение молекулы в малом желобке не однотипное. Наши результаты свидетельствуют о том, что подвесное ароматическое кольцо ориентировано по направлению к желобку, а фенантридиновая часть находится с наружной стороны перпендикулярно оси спирали, а другие, наоборот - фенантридиновая часть этих молекул ориентирована по направлению к желобку, при этом ось наклона БЭ совпадает с углом наклона сахара-фосфатного остова. Поэтому создается впечатление, что молекула БЭ как бы садится на желобок, повторяя контуры остова. В обоих случаях взаимодействие приходится на дистанцию в 3 пары основания, с длиной примерно 10 Å. На рис. 3 показано два типа ориентации БЭ, полученные после симуляции для взаимодействия молекулы с малым желобком ДНК неинтеркаляционным типом.

Надо отметить, что во внешнем взаимодействии участвует сахара-фосфатный остов ДНК, причем во взаимодействие включены как сахарные остатки, так и фосфатная группа, в частности, связывание приходится на свободную группу фосфата.

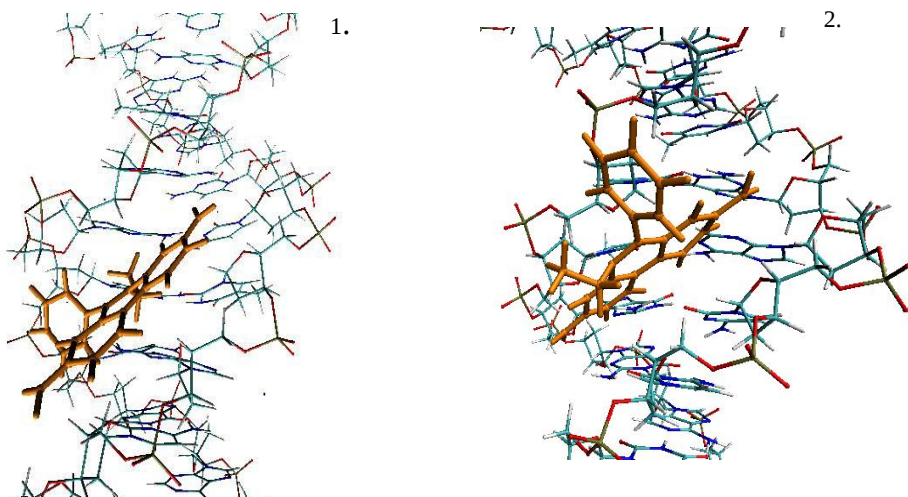


Рисунок 3. Взаимодействие БЭ с малым желобком, расположение фенантридиновой части БЭ по отношению к желобку: 1. с наружной стороны. 2. внутри желобка (оранжевым цветом обозначены молекулы БЭ).

При расчете тотальной энергии неинтеркаляционного взаимодействия было выявлено, что она составляет - 1.54 Ккал. О слабом взаимодействии говорит и полученная константа связывания, равная $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Если сравнить результаты по способам связывания, то очевидно присутствие не однотипного связывания молекулы БЭ с ДНК. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными (Vardevanyan et al., 2003).

При сравнении результатов связывания интеркаляционным способом и результатом внешнего связывания видно, что последний почти в 2 раза слабее интеркаляционного типа связывания (Рис. 4).

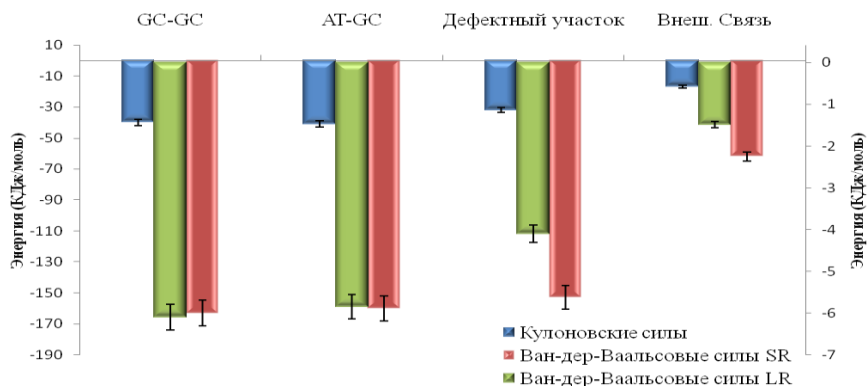


Рисунок 4. Энергетические показатели взаимодействия БЗ с ДНК (SR- короткая дистанция межмолекулярного взаимодействия внутри радиуса, LR- длинная дистанция межмолекулярного взаимодействия вне радиуса).

Взаимодействие гиперидина с ДНК

Пути и механизмы действия Гп на субклеточные структуры недостаточно изучены. Известно, что после 3 часов инкубации Гп практически достигает и накапливается в клеточном ядре. При этом интенсивность флюоресценции в ядре на 85% превышает таковую в плазматической мембране (Пенесян и др., 2004). Внутрядерные компоненты, в частности ДНК, могут рассматриваться, как потенциальные мишени для действия Гп. Проведенные нами эксперименты *in silico* подтверждают наличие прямого взаимодействия Гп с ДНК. Гп взаимодействует с малым желобком ДНК, образуя водородные связи. Связь обеспечивается между гидроксильными группами Гп и фосфатной группой сахара-фосфатного остова ДНК, а также с азотистыми основаниями ДНК, в частности с гуанином (Рис.5).

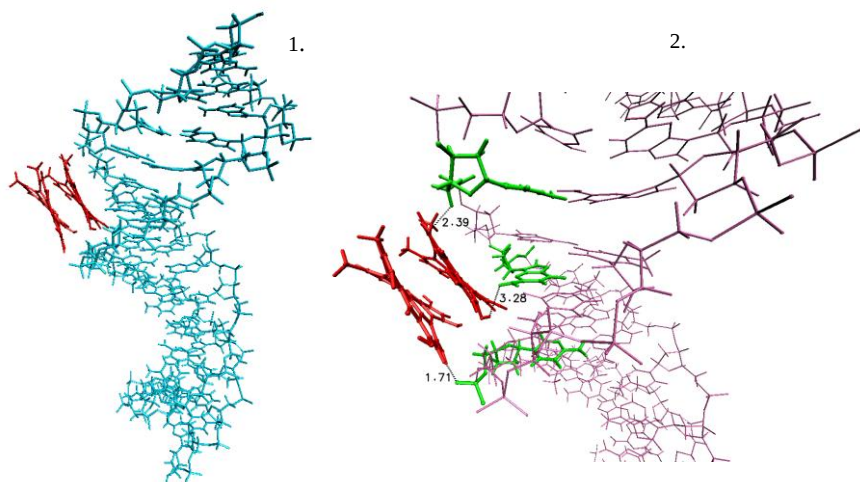


Рисунок 5. Взаимодействие Гп с ДНК, 1. с малым желобком ДНК (красным цветом обозначены молекулы Гп), 2. места связывания (зеленый цвет).

Нами было выявлено, что Гп образует в среднем 2 водородных связей с ДНК, т.е. взаимодействие имеет довольно слабый характер. При этом не наблюдается никаких структурных изменений в ДНК. Были рассчитаны также константа связывания ($K=1.1$) и число пар оснований, приходящихся на одну молекулу Гп ($n=10.3$).

Олигомеризация гиперицина

Исследование процесса олигомеризации, являются важными для молекул, имеющие амфифильные свойства. Интерес заключается в исследованиях характеристик процесса и особенностях типов межмолекулярных взаимодействий. С использованием ММД процессы, проходящие в узких временных рамках, становятся менее трудоемкими и более информативными.

В литературе имеются данные об олигомеризации Гп (Falk & Meyer, 1994). В водной среде при концентрации выше 10^{-3} М, Гп образует олигомерные формы – димеры, тримеры, тетрамеры и гексамеры. Проводимые нами модельные эксперименты подтверждают этот факт. При олигомеризации молекулы «сдаются» друг на друга, как каменная кладка или «этажи дома», образуя разные типы олигомеров (рис.6). После стабилизации системы наблюдалось следующее распределение олигомеров: мономеры 50%; димеры 30%; тримеры 0%; тетрамеры 15 %; гексамеры 5 %.

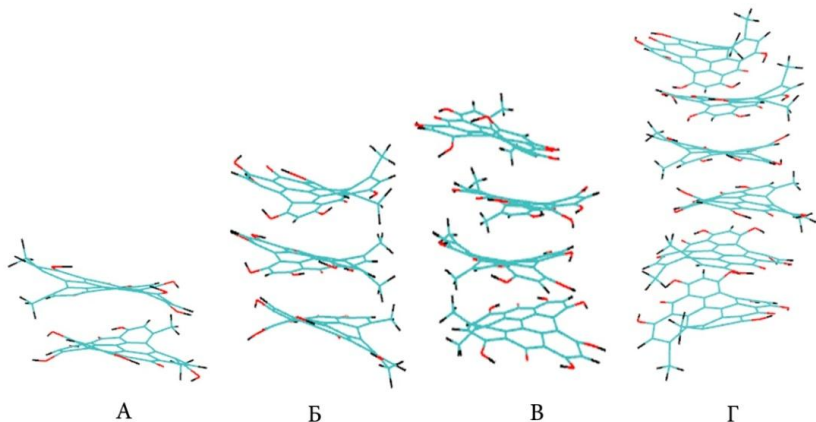


Рисунок 6. Олигомерные формы Гп (А- димер; Б-тример; В-тетрамер; Г-гексамер).

Димерные формы. Димеризация осуществляется между двумя антипараллельно ориентированными мономерами молекулы Гп. Расчеты показывают, что при димеризации молекулы Гп образуются 4 водородные связи. Нужно отметить также, что плоскости молекул при димеризации не параллельны, а имеют отклонения с торсионным углом $\theta = 15,22^\circ$. Торсионный угол взаимодействия был рассчитан между двумя C_2 группами полициклического кольца со стороны карбонильных групп в положении $C_7 - C_{14}$.

Тримерные формы. При тримеризации молекулы Гп образуют вертикальные структуры, торсионные углы взаимодействия молекул компенсируют друг друга и структура имеет линейную форму относительно оси C_2 . Нужно отметить, что тримерная форма нестабильна, она стремится образовать тетра- или гексамерные структуры.

Тетрамерные формы. Тетрамерные структуры образуются из разных вариантов мономер-димер-тримерных структур. Их можно классифицировать в 4 группы: 1)

тример и мономер, 2) образование тетрамеров из двух параллельных димеров, 3) образование тетрамеров из двух антипараллельных димеров, 4) взаимодействие анти димер–димер. С точки зрения энергетической стабильности 4 группы тетрамеров можно расположить по следующему убывающему ряду: 2 группа > 1 группа > 4 группа > 3 группа.

Пента- и гексамерные формы. При моделировании не выявлены пентамерные формы, есть предположение, что это может быть связано с нестабильностью тримерной формы. В результате, из полученных после моделирования возможных олигомеров самым большим был гексамер - это стопка из 6 молекул Гп, сложенных в вертикальном положении друг над другом, имеющая изогнутую форму с наклоном оси 17.19° .

“Тяжелые” агрегативные формы гиперцицина. В концентрациях выше 10^{-3} М молекулы Гп образуют неорганизованные типы агрегатов (Koscakova et al., 2005). Необходимо отметить, что данные агрегаты не изучены, так как такие исследования, по мнению авторов, считаются довольно трудоемкими в лабораторных условиях, принимая во внимание проблемы детекции при спектроскопических исследованиях (Roslanies et al, 2000).

Используя ММД, нами была проведена серия экспериментов для выявления и изучения “тяжелых” агрегатных форм из 13 молекул в концентрации 10^{-2} М. Был получен “тяжелый” агрегат, состоящий из 10 молекул, представленный разными олигомерными формами, которые взаимодействуют друг с другом электростатически (рис. 7).

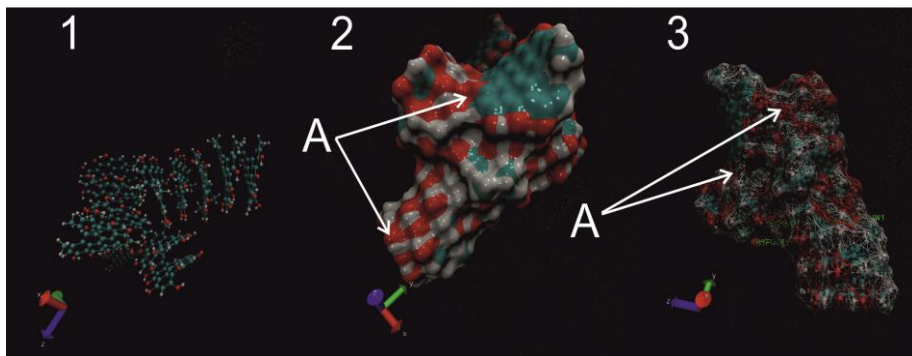


Рисунок 7. Тяжелый агрегат: 1) вид сбоку, 2) поверхностная электростатическая оболочка 3) перекрывающие электростатические поля, А) электростатические взаимодействия обозначены красным цветом.

Как уже было сказано выше, повышение концентрации Гп имеет огромное значение для функционирования данной молекулы, как с точки зрения подвижности так и активности. Вероятно, ограничения концентрации при введении в организм, обусловлены именно склонностью молекул Гп к образованию различных агрегатных форм.

Взаимодействие лигнанов с ДНК

Было показано, что кроме взаимодействия с топоизомеразами лигнаны, в частности, Птокс и Этоп взаимодействуют также непосредственно с ДНК (Bastow et al., 1997). Из литературных данных известно, что при связывании этих соединений с ДНК кривые связывания в координатах Скотчарда имеют не линейную форму, а идут по наклонной траектории. Надо отметить, что интенсивность флюоресценции при возрастании

молярного соотношения Птокс/ДНК сохраняется на постоянном уровне (Вардапетян и Рязанова, 2011). Этот факт указывает на то, что места связывания на ДНК ограничены.

Анализ этих результатов показал, что Птокс и его производные связываются двумя способами, проявляя при первом относительно высокую константу связывания, а при втором - на порядок меньше (Пенесян, 2004).

Исходя из этого нами были проведены исследования *in silico* с использованием ММД для изучения комплексов Птокс/ДНК, Этоп/ДНК, Тен/ДНК.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии прямого взаимодействия Птокс и Этоп с ДНК. Причем, взаимодействие происходит разными типами. При моделировании взаимодействия Тен с ДНК не наблюдается.

Подофиллотоксин –ДНК. Взаимодействие Птокс с ДНК имеет интересный характер, наблюдается связывание с сахаро-фосфатным остовом большого желобка в АТ-богатых участках. Молекулы Птокс садятся и практически блокируют большой желобок ДНК.

Кроме взаимодействия с большим желобком, имеет место также взаимодействие как с дефектными, так и с концевыми участками ДНК. Причем, и в этих, и в тех случаях показатели взаимодействия почти идентичны. Это можно интерпретировать так, что характер взаимодействия идентичен и молекула не имеет предрасположенности к конкретным сайтам взаимодействия (рис. 8).

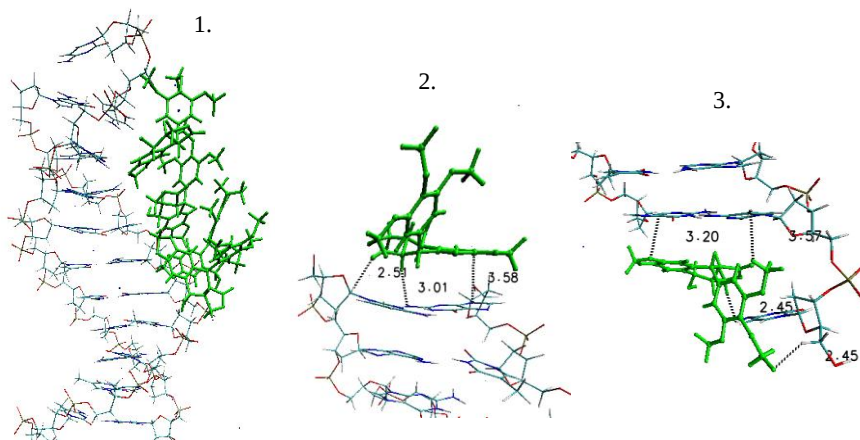


Рисунок 8. Взаимодействие Птокс с ДНК: 1. взаимодействие с большим желобком, 2. взаимодействие с концевым участком, 3. взаимодействие с дефектным участком (зеленым цветом обозначены молекулы Птокс).

Этопозид-ДНК При связывании Этоп с ДНК наблюдается иная картина по сравнению с Птокс. Полученные результаты свидетельствуют о том, что взаимодействие с желобками ДНК не имеет места, а осуществляется с концевыми и дефектными участками ДНК. При этом число мест связывания, приходящее на одну молекулу лиганда, меньше.

Полученные параметры взаимодействия Этоп с сахаро-фосфатными группами свидетельствуют, что типы связывания сопоставимы с Птокс. Этот тип связывания у Этоп, как и в случае с Птокс, можно отнести к слабому типу. При этом пространственные параметры взаимодействия с дефектными и концевыми участками отличаются. Этоп не входит в дефектный участок, как Птокс, а связывается с наружной стороны, но это не мешает Этоп иметь стабильный тип связывания (рис.9).

Результаты *in silico* эксперимента показывают, что связь Этоп с концевыми участками

ДНК сильнее по сравнению с Птокс. Это можно объяснить наличием у Этоп дополнительных гидроксильных групп, способных к образованию водородных связей. Сравнительный анализ энергетических показателей взаимодействия Прокс и Этоп как с сахаро-фосфатными участками, так и с дефектными и концевыми участками, показывает, что Этоп сильнее связывается с ДНК чем Птокс (Рис.10)

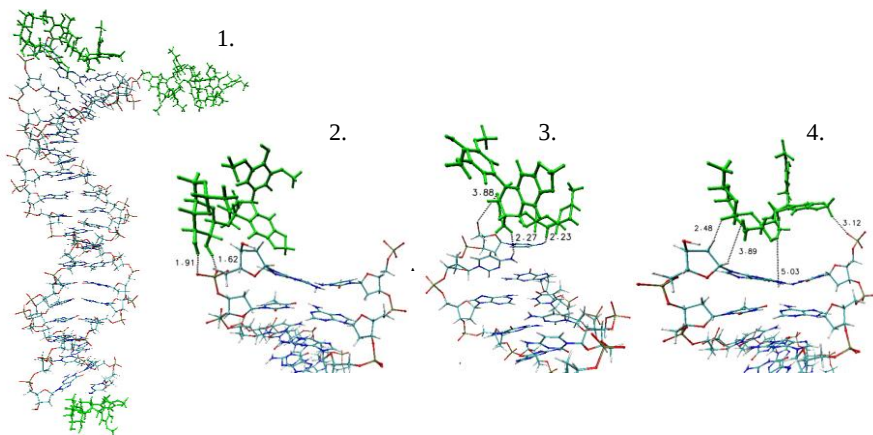


Рисунок 9. Взаимодействие Этоп с ДНК: 1. участки связывания, 2. взаимодействие с сахаро-фосфатным остовом, 3. взаимодействие с дефектным участком, 4. взаимодействие с концевым участком, (зеленым цветом обозначены молекулы Этоп).

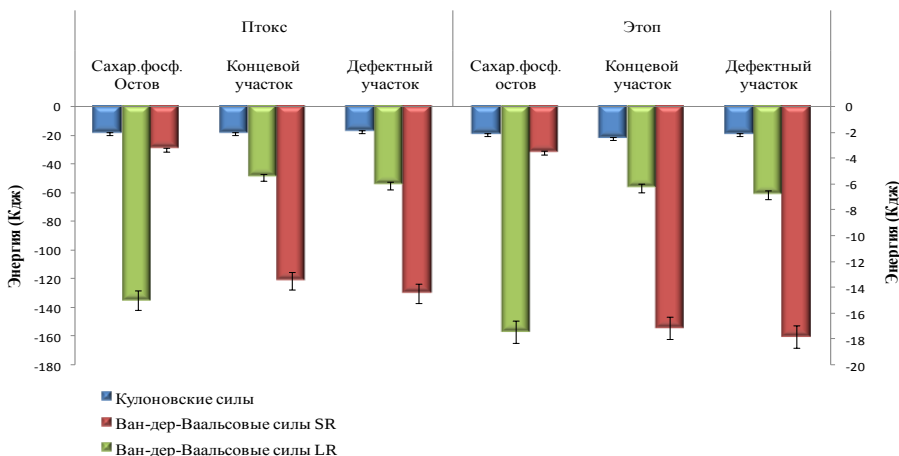


Рисунок 10. Сравнительные энергетические показатели взаимодействия Птокс и Этоп с ДНК (SR- короткая дистанция межмолекулярного взаимодействия внутри радиуса, LR- длинная дистанция межмолекулярного взаимодействия вне радиуса).

Также был проведен сравнительный анализ констант связывания (K_b) и число мест (n), с которым связывается одна молекула лиганда, полученных с помощью ММД и экспериментально выявленных параметров для Птокс, Этоп, с ДНК (Вардапетян и Рязанова, 2011; Пенесян, 2004) (таблица 2.).

Таблица 2.

Значения K_b и p для Птокс, Этоп, Тен с ДНК

	Экспериментально				ММД			
	p		K_b		p		K_b	
	Тип 1	Тип 2	Тип 1	Тип 2	Тип 1	Тип 2	Тип 1	Тип 2
Ptox/ДНК	4.46±0.4	3.26±0.3	64.83±6.4	6.51±0.6	3.22±0.3	2.40±0.2	57.25±5.7	5.47±0.4
Etop/ДНК	18.88±1.7	5.54±0.5	79.31±8.0	0.55±0.05	18.0±1.8	4.22±0.4	62.07±6.2	0.32±0.3
Ten/ДНК	-	-	-	-	-	-	-	-

Таким образом, Птокс и Этоп взаимодействуют с ДНК, причем взаимодействие осуществляется разными типами: сильным, у которого константа связывания выше и слабым, с низкой константой связывания. Этоп сильнее связывается с ДНК по сравнению с Птокс, хотя места связывания у него меньше, чем у Птокс. Что касается Тен, то взаимодействие не наблюдается.

Взаимодействие алкалоидов борвинка с ДНК

Предварительные результаты *in silico* эксперимента показывают, что *ВВ* и *БИ* взаимодействуют с ДНК, причем взаимодействие осуществляется с большим желобком ДНК. Взаимодействия же *БК* с ДНК не наблюдается.

Результаты показывают, что *ВВ* взаимодействует с фосфатными группами сахаро-фосфатного остова в GC-богатых участках. Интересно, что взаимодействие происходит в направлении 5'-CAG-3', в то время как в направлении 3'-CAG-5' оно не наблюдается. Эти данные говорят в пользу того, что явно имеет место селективный тип связывания к определенным участкам пурин - пиримидинового дуплета. По сравнению с *ВВ*, который связывается снаружи, *БИ* входит и практически блокирует большой желобок. При этом наблюдается образование множественных связей по сравнению с *ВВ* (рис. 11).

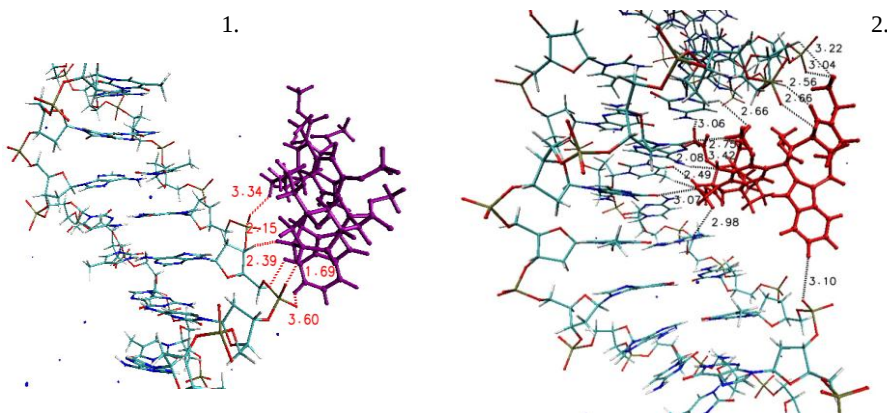


Рисунок 11. Взаимодействие молекул *ВВ* и *БИ* с ДНК: 1- взаимодействие *ВВ* с сахаро-фосфатным остовом, (фиолетовым цветом обозначена молекула *ВВ*), 2- взаимодействие с большим желобком, (красным цветом обозначена молекула *БИ*)

Расчитанные энергетические показатели свидетельствуют о том, что *БИ* проявляет более высокое сродство к ДНК по сравнению с *ВВ*, хотя у *ВВ* электростатическое взаимодействие (за счет Кулоновских сил) выше, чем у *БИ* (рис. 12).

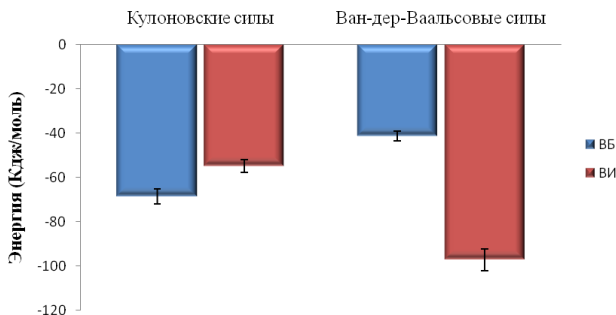


Рис.12. Сравнительные энергетические параметры взаимодействия *BB* и *BI* с ДНК

С точки зрения взаимодействия с ДНК указанные соединения можно расположить в следующей возрастающей последовательности: *BK* < *BB* < *BI*. Из полученных результатов следует, что использование *BK* наиболее предпочтительно, так как он не взаимодействует с ДНК, затем следует *BB*, что же касается *BI*, то это соединение может быть наиболее опасным, т.к. способно полностью перекрывать большой желобок ДНК.

Однако, принимая во внимание факт о том, что *BK* имеет высокую цитотоксичность, то для использования в медицине предпочтительно использовать *BB*, который менее цитотоксичен и имеет среднее сродство с ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные компьютерные ресурсы и программные пакеты позволяют прогнозировать биотрансформацию для многих тысяч химических структур, входящих в состав лекарственных препаратов, в том числе виртуальных, еще не синтезированных (Van Gunsteren & Berendsen, 1990). Молекулярное моделирование, в частности, молекулярный докинг и методы квантовой химии лежат в основе анализа взаимодействия низкомолекулярных лигандов и клеточных мишеней с учетом пространственной структуры. Отличительной чертой ММД является способность описать происходящие процессы в четырех измерениях – в трех пространственных и во времени. В настоящее время ММД позволяет проводить виртуальные эксперименты (*in silico*), которые в реальных условиях или считаются трудоемкими, или их проведение совсем невозможно в лабораторных условиях. Кроме пространственно-временных параметров, получаемых ММД, немаловажными считаются и качественно-количественные данные, в частности энергетические параметры взаимодействия.

Использование ММД для предварительных тестов на возможность взаимодействия тех или иных соединений с разными мишенями, с применением молекулярного докинга или динамических моделей, в настоящее время является довольно актуальным направлением в современной молекулярной биологии, медицине, биофизике и других. направлениях естественной науки. Возможности ММД широко используются в фармацевтической отрасли в целях конструирования новых или улучшения уже существующих ЛС. При любых исследованиях с использованием разных методик важным является получение достоверных результатов, где контрольные параметры считаются стандартом, с которым сравниваются полученные результаты этих методик. В нашем случае, в качестве стандартной модели было выбрано связывание БЭ с ДНК, т.к. взаимодействие БЭ с ДНК очень хорошо изучено экспериментально с использованием разных методик, в зависимости от разных физико-химических параметров. Известно, что

БЭ является классическим интеркалятором с высоким сродством при связывании. Способы связывания БЭ с ДНК известны и разделяются на два типа “сильный” и “слабый” (Варdevanyan и Антонян, 2010).

Проведенные нами исследования *in silico* показывают, что БЭ встраивается в плоскость между парами оснований, связываясь путем интеркаляции. При этом наблюдаются изменения структурных характеристик молекулы ДНК. Используя возможности ММД, нами были рассчитаны как пространственные, так и энергетические параметры процесса интеркаляции. Причем пространственная ориентация БЭ при интеркаляции осуществлялась двумя типами: при 0° и при 180° относительно плоскости пар оснований, для выяснения возможного влияния пространственной ориентации на процесс интеркаляции. На основе полученных результатов можно сказать, что пространственная ориентация молекулы БЭ почти не влияет на основные параметры процесса интеркаляции, о чем свидетельствуют и полученные нами энергетические параметры процесса. Кроме интеркаляционного типа связывания, наблюдалось также связывание с внешней стороны спирали ДНК, в частности с малым желобком. При сравнении результатов связывания интеркаляционным способом и внешнего связывания можно сказать, что последний способ почти в 2 раза слабее интеркаляционного типа связывания.

Т.о. при взаимодействии с ДНК БЭ связывается по крайней мере двумя способами: первый - сильный, второй - слабый. На это указывают также полученные результаты константы связывания при интеркаляции и внешнем связывании. Сильное связывание с константой $K_b = 99,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ происходит за счет вклинивания БЭ между парами оснований, а слабое - взаимодействием с сахаро-фосфатными участками ДНК с константой $2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, соответственно. Надо отметить, что проведенный сравнительный анализ результатов, полученных ММД показывает соответствие с результатами полученными другими методами (Arakelyan et al., 2008; Chitre et al., 1979; Vardevanyan et al., 2003; Lipfert et al., 2008).

Все соединения, которые были изучены нами, используются в современной медицинской практике в том числе и для лечения онкологических заболеваний. Эти препараты имеют растительное происхождение и классифицируются, как цитостатические и цитотоксические соединения. Пути воздействия этих соединений на мишени во многом не однотипные. Такие соединения кроме основных механизмов действия проявляют и альтернативные механизмы, которые играют немаловажную роль в процессе взаимодействия с клеточными мишенями в общем и, в частности, с ДНК. Эти соединения, в той или иной степени, взаимодействуют с ДНК, что может отразиться на ее функционировании, процессах репликации, транскрипции и т.д.

Способы, механизмы и типы взаимодействия исследованных соединений с ДНК разные. ВК и Тен не взаимодействуют с ДНК.

Известно, что Гп имеет антидепрессантный, антибактериальный, антиретровирусный, антиагерогенный, антинеопластический и другие активности (Brockmann et al., 1939; Lavie et al., 1989; Meruelo, 1988; Anker, 1995). Он также является очень сильным природным фотодинамическим агентом и используется при лечении канцерогенных заболеваний, СПИД-а и т.д. Амфифильная природа молекулы Гп способствует образованию разнотипных агрегатных форм в водной среде, что приводит к некоторым трудностям при исследовании в лабораторных условиях. При высоких концентрациях молекулы Гп образуют “тяжелые” агрегаты, которые почти не фиксируются спектрофотометрическими методами.

Использованный нами ММД позволил исследовать вышеперечисленные агрегатные формы и получить как пространственные, так и энергетические параметры процесса олигомеризации. Нами были получены также константы диссоциации этих олигомерных форм, где самой нестабильной является димерная форма, константа диссоциации

которой в 4 раза превышает таковые параметры остальных форм. На основе полученных результатов для “тяжелых” агрегатов можно заключить, что взаимодействие происходит за счет электростатических сил.

Гп связывается с ДНК. При этом связывание осуществляется как водородными, так и электростатическими силами взаимодействия. Выявлены места связывания Гп на молекуле ДНК. Молекула Гп связывается как с фосфатными группами сахаро-фосфатного остова, так и с парами оснований, в частности, с гуанином. Надо отметить, что взаимодействие имеет слабый характер ($K_b = 1.1$). Расчеты показали, что в среднем одна молекула Гп связывается с 10 парами оснований ДНК. Эти результаты согласуются с литературными данными (Miskovsky et al., 1995).

Из полученных нами результатов следует, что ограничения дозировки Гп при приеме могут быть обусловлены возможностью молекулы образовывать агрегатные формы, которые могут привести к нежелательным побочным эффектам. Что касается прямого действия на ДНК, то оно не может считаться основным путем, так как параметры связывания свидетельствуют о слабом взаимодействии. Надо предполагать, что основное действие Гп на клетку имеет иной, возможно, мультиплетный характер.

Лигнаны - природные соединения фенольной природы, относящиеся ко вторичным метаболитам ряда растений, и имеющие широкий спектр действия (Canel et al., 2000). Наиболее важным является цитотоксическое действие (Srivastava et al., 2005). Было показано, что кроме взаимодействия с топоизомеразами Птокс и его полусинтетические производные взаимодействуют непосредственно с ДНК (Bastow et al., 1997). При этом наблюдаются два типа связывания: первый тип проявляет относительно высокую константу связывания, а второй на порядок меньше. При этом число мест связывания, приходящих на одну молекулу, и в первом, и во втором варианте схожи (Пенесян, 2004). Проведенные нами исследования *in silico* доказывают, что непосредственное взаимодействие с ДНК осуществляется обоими типами. Первый тип связывания происходит с фосфатными группами сахаро-фосфатного остова ДНК. Также наблюдается взаимодействие с концевыми и дефектными участками ДНК, что соответствует второму типу взаимодействия. Наши результаты показывают, что Птокс взаимодействует с сахаро-фосфатным остовом в АТ-богатых участках ДНК. При этом наблюдается блокирование большого желобка. Нужно отметить, что связывание осуществляется как образованием водородных связей, так и электростатическими силами взаимодействия. Кроме этого наблюдается также взаимодействие с дефектными и концевыми участками, причем молекула Птокс садится на дефектный участок параллельно парам оснований и создает впечатление дополнительной пары. Аналогичные результаты наблюдаются и при взаимодействии с концевым участком.

На основе полученных нами энергетических параметров связывания для концевых и дефектных участков можно предположить, что взаимодействие имеет одинаковый характер. Это означает, что при взаимодействии молекула Птокс не имеет предрасположенности к конкретным сайтам. Полученные параметры взаимодействия Этоп с сахаро-фосфатными группами показывают, что типы связывания сопоставимы с таковыми Птокс. Как у Этоп, так и в случае с Птокс, этот тип можно отнести к слабому типу связывания. При этом пространственные параметры Этоп при взаимодействии с дефектными и концевыми участками ДНК отличаются. Этоп не входит в дефектный участок, как Птокс, а связывается с наружной стороны, причем взаимодействие несет более сильный характер, чем у Птокс. На это указывают и расчет количества водородных связей, которых у Этоп в 3 раза больше, чем у Птокс.

Таким образом, Птокс и Этоп взаимодействуют с ДНК, причем взаимодействие осуществляется двумя типами: сильным и слабым. По сравнению с Птокс, Этоп сильнее связывается с ДНК, хотя количество мест связывания у него меньше, чем у Птокс. Надо отметить, что взаимодействия Тен с ДНК не наблюдается.

Проведенный сравнительный анализ результатов с использованием ММД сопоставим с аналогичными результатами, полученные другими методами (Пенесян, 2004; Вардапетян и Рязанова, 2011).

Ярким примером противоопухолевых препаратов, используемых в современной медицине, можно считать алкалоиды барвинка, в частности *ВБ*, *БК*, *ВИ*, получаемые из растений рода *Аросупасеае* (Seam et al., 2009). Эти соединения имеют схожую структуру и механизм действия на клеточном уровне, при этом воздействие этих соединений имеет неселективный характер. Они действуют как на нормальные, так и на патологические клетки, нарушая процессы жизнедеятельности. Принимая во внимание прогнозирующий фактор ММД, нами были проведены *in silico* эксперименты на возможность прямого связывания этих соединений с ДНК.

Как показывают наши результаты, *ВБ* и *ВИ* взаимодействуют с ДНК. Причем взаимодействие приходится на большой желобок ДНК. Надо отметить, что взаимодействие *БК* с ДНК не наблюдается. Из полученных результатов следует, что *ВБ* взаимодействует с фосфатными группами сахара-фосфатного остова GC-богатых участков. При этом наблюдается селективный тип связывания. Наши результаты показывают, что взаимодействие происходит в направлении 5'-CAG-3' и не наблюдается в направлении 3'-CAG-5'.

Надо отметить, что связывание в основном происходит за счет электростатических сил. На это указывают и рассчитанные энергетические параметры связывания.

Полученные результаты по пространственным параметрам для *ВИ* указывают на то, что они существенно отличаются от *ВБ*. Как и в случае с *ВБ* взаимодействие с *ВИ* приходится на большой желобок ДНК, но при этом они сильно отличаются. При симуляции было выявлено, что молекула *ВИ* садится на большой желобок, полностью блокируя его. На основе результатов энергетических параметров связывания можно констатировать, что *ВИ* сильнее связывается с ДНК, по сравнению с *ВБ*.

С точки зрения силы взаимодействия с ДНК, эти соединения можно расположить в следующем возрастающем ряду: $БК < ВБ < ВИ$. Принимая во внимание тот факт, что *БК* имеет высокую цитотоксичность, а *ВИ* сильнее связывается с ДНК, практически блокируя большой желобок, то для использования в медицине можно рекомендовать *ВБ*, который менее цитотоксичен и имеет среднее сродство с ДНК по сравнению с остальными.

Обобщая вышесказанное, можно констатировать, что ММД имеет все возможности для того, чтобы стать удобным инструментом при исследованиях как с точки зрения конструирования или модификации новых лекарственных соединений (*drug-design*), так и для изучения взаимодействий разных соединений с клеточными структурами. Получение таких ценных данных, как пространственные и энергетические параметры взаимодействия и сопоставление этих данных с результатами исследований общеизвестными экспериментальными методами, может стать основой для более детального изучения процессов, происходящих в клетке.

ВЫВОДЫ

1. Подофиллотоксин и этопозид взаимодействуют с ДНК двумя типами: сильным и слабым. По сравнению с подофиллотоксином, этопозид сильнее связывается с ДНК, хотя число мест связывания у него меньше, чем у подофиллотоксина.
2. Взаимодействие тенипозид с ДНК не наблюдается. Этопозид взаимодействует с концевыми и дефектными участками ДНК, не взаимодействуя с желобками ДНК. Параметры взаимодействия этопозид с сахаро-фосфатными группами сопоставимы с таковыми подофиллотоксина.
3. Гиперицин связывается как с фосфатными группами сахаро-фосфатного остова ДНК, так и с парами оснований, в частности, с гуанином. Взаимодействие осуществляется как образованием водородных связей, так и электростатическими силами.
4. Винбластин и винорелбин взаимодействуют с фосфатными группами сахаро-фосфатного остова в GC-богатых участках ДНК, в случае винкристина взаимодействие не наблюдается.
5. Метод молекулярной динамики, наряду с другими методами, может стать удобным инструментом при исследованиях, как с точки зрения конструирования или модификации новых лекарственных соединений (*drug - design*), так и для изучения взаимодействия разных соединений с субклеточными структурами, в частности с ДНК.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Vardapetyan H.R., Tiratsuyan S.G., Hovhannisyan A.A., Hunanyan L., Study of Photostability of hypericin// Int. Conf. "Biotechnology and Health" – 2 & DAAD Alumni Seminar, April 21-25, p.163-164, 2008.
2. Vardapetyan H.R., Hunanyan L.S. Heymann S., Tautomer forms of Hypericin and its biological activity// Int. Conf. "Biotechnology and Health - 4", October 28-30, Yerevan, p. 86-91, 2010.
3. Вардапетян Г.Р., Аракелян В.Б., Унанян Л.С., Исследование особенностей взаимодействия Гиперицина с ДНК// 6-ая годовичная научная конференция РАУ 5-9 декабря стр. 286-293, 2011.
4. Унанян Л.С., Молекулярное моделирование взаимодействия подофиллотоксина и его полусинтетических производных с ДНК// Вестник РАУ N 1, с. 67-75, 2013.
5. Вардапетян Г.Р., Унанян Л.С., Метод молекулярной динамики в исследовании взаимодействия бромистого этидия с ДНК// Биол. Журн. Арм. 3, 65, стр.37-41, 2013.
6. Унанян Л.С., Вардапетян Г.Р., Взаимодействие подофиллотоксина и его полусинтетических производных с ДНК - метод молекулярной динамики// сб.статей. VI международная заочная научно-практическая конференция "Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии" Москва с.86-90, 2013
7. Унанян Л.С., Взаимодействие гиперидина с ДНК *in silico*: метод молекулярной динамики// сб.статей. Международная научно-практическая конференция «Инновационная наука и современное общество», 21-22 август, УФА РИЦ БашГУ, с.24-26, 2013.
8. Унанян Л.С., Вардапетян Г.Р., Грабски О.В., Исследование олигомеризации Гиперицина в водной среде методом молекулярной динамики// Вестник РАУ N.2 с. 67-72, 2013.
9. Вардапетян Г.Р., Унанян Л.С., Исследование особенностей взаимодействия Гиперицина с ДНК *in silico*// II Международная научная Интернет – конференция: «Физико-химическая биология», 26–28 ноября, Ставрополь, Россия, с. 24-26, 2013.
10. Vardapetyan H., Hunanyan L, Grabski H., Characteristics of the interaction of podophyllotoxin derivatives with DNA *in silico*// V international scientific-practical

conference "High Technologies, Basic and Applied Researches in Physiology and Medicine" (PhysioMedi 5) 14-15th Nov., St. Petersburg, Russia p.112-114, 2013.

11. Унанян Л.С., Вардапетян Г.Р., Грабский О.В., Метод молекулярной динамики в исследовании взаимодействия винбластина и его производных с ДНК// Научно-практический журнал «ФАРМА», N 8, с. 70-73, 2014.

ՀՈՒՆԱՆՅԱՆ ԼԵՌՆԻԿ ՍՈՒՐԴԻԿԻ

ԴՆԹ-ի ՀԵՏ ՀԵՊԵՐԻՑԻՆԻ ԵՎ ՊՈԴՆՖԻԼՈՏՈՔՍԻՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՅՈՒԹՅԱՆ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԴԻՆԱՄԻԿԱՅԻ ՄԵԹՈԴԻ
ՕԳՆՈՒԹՅԱՄԲ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր: բրոմացված էթիդիում, ԴՆԹ, կապման հաստատում, կոմպլեքսագոյացման էներգիա, հիպերիցին, մոլեկուլային դինամիկայի մեթոդ (ՄԴՄ), պոդոֆիլոտոքսին, վինբլաստին:

Ներկայումս դեղագործական ընկերությունները նոր դեղամիջոցների ստեղծման և փորձարկման վրա ծախսում են ավելի քան տասն տարի և տասնյակ միլիոնավոր դոլարներ: Չնայած դրան ստացված դեղամիջոցները ոչ միշտ են անվնաս և հաճախ առաջացնում են լուրջ բարդություններ օրինակ, պայմանավորված ժառանգական նյութի հետ դեղամիջոցների անմիջական փոխազդեցությամբ:

Հաշվի առնելով տվյալ փաստը, խիստ արդիական է համարվում արագ գնահատման մեթոդների ստեղծումը՝ հնարավոր հավանական ռիսկերի և կողմնակի բարդությունների առաջացման ուսումնասիրության ժամանակ: Այդ մեթոդների թվին է պատկանում մոլեկուլային դինամիկայի մեթոդը, որն իրենից ներկայացնում է համակարգչային փորձ, որտեղ ժամանակի ընթացքում մոդելավորվում է մոլեկուլային համակարգերի վարքը՝ օգտագործելով շարժումը բնութագրող թվայնացված հավասարումներ: Հետազոտությունների նպատակն է եղել օգտագործելով մոլեկուլային դինամիկայի մեթոդը, բացահայտել բժշկության մեջ որպես հակառուցքային դեղամիջոցներ օգտագործվող հիպերցինի և պոդոֆիլոտոքսինների ԴՆԹ-ի հետ փոխազդեցության հնարավոր մեխանիզմները, տարածաչափական տվյալները, ինչպես նաև փոխազդեցության թերմոդինամիկական պատկերը: Որպես չափանիշ օգտագործվել է բրոմացված էթիդիումի ԴՆԹ-ի հետ փոխազդեցության մոդելը: Ուսումնասիրվել են հիպերիցինի, պոդոֆիլոտոքսինի և նրա ածանցյալների (էտոպոզիդի և տենիպոզիդի), ինչպես նաև վինբլաստինի և նրա ածանցյալների (վինկրիստինի և վինորելբինի) ԴՆԹ-ի հետ փոխազդեցության մեխանիզմները, հաշվարկվել են տվյալ միացությունների փոխազդեցության էներգետիկ, տարածաչափական տվյալները, կապման հաստատումները և կապման տեղերը: Կատարվել է մոլեկուլային դինամիկայի մեթոդի և այլ մեթոդներով ստացված տվյալների համեմատական վերլուծություն:

Համակարգչային փորձերը ցույց են տվել, որ բացի տենոպոզիդից և վինկրիստինից բոլոր ուսումնասիրված միացությունները փոխազդում են ԴՆԹ-ի հետ, ընդ որում փոխազդեցության մեխանիզմները և տիպերը, տարբեր են:

Կատարված հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ հիպերցինը փոխազդում

Է ԴԼԹ-ի հետ ինչպես ԷԼԵԿՏՐԱՍՏԱՏՐԻԿ ԵՂԱՆԱԿՈՎ, այնպես էլ առաջացնում ջրածնական կապեր: Փոխազդեցությունը տեղի է ունենում հիպերցինի հիդրոքսիլային խմբերի և ԴԼԹ-ի շաքարաֆոսֆատային կիմախքի, մասնավորապես ֆոսֆորական խմբի հետ, ինչպես նաև գույզ հիմքերից, մասնավորապես գուանինի հետ: Փորձերի արդյունքում ստացված փոխազդեցության մոդելը ցույց է տալիս, որ հիպերցինը փոխազդում է ԴԼԹ-ի հետ, ոչ թե որպես մոնոմեր այլ դիմերային ձևով: Հաշվի առնելով ստացված տվյալները, կատարվել են հիպերցինի միջմոլեկուլային փոխազդեցության ուսումնասիրություն՝ բացահայտելու տվյալ մոլեկուլի պահվածքը ջրային միջավայրում: Բացահայտվել է, որ ջրային միջավայրում հիպերցինը գտնվում է օլիգոմեր ձևերով, որտեղ առկա են՝ մոնոմեր (50%), դիմեր (30%), տետրամեր (15%), հեքսամեր (5%), օլիգոմերներ: Հաշվարկված են տվյալ օլիգոմերային ձևերի տարածաչափական, էներգետիկ պարամետրերը: Կատարված փորձերի արդյունքները վկայում են, որ բացի ստացված օլիգոմերային ձևերի հիպերցինի բարձր կոնցենտրացիայի դեպքում ($>10^{-3}$ Մոլ) առաջանում են նաև “ծանր” ագրեգատներ որոնք բացի ջրածնական կապերից փոխազդում են միմյանց հետ նաև ԷԼԵԿՏՐՈՍՏԱՏՐԻԿ ուժերի միջոցով:

Կատարված ուսումնասիրությունները վկայում են, որ պոդոֆիլոտոքսինը փոխազդում է ԴԼԹ-ի մեծ ակոսի հետ ԱԹ-հարուստ հատվածներում, ամբողջովին ծածկելով մեծ ակոսը: Բացի դրանից առկա է նաև փոխազդեցություն ԴԼԹ-ի ծայրային և դեֆեկտային հատվածների հետ, ընդ որում փոխազդեցության բյուրեղ միանման է և պոդոֆիլոտոքսինի մոլեկուլները հակված չեն փոխազդեցության կոնկրետ հատվածների: Ինչ վերաբերվում է Էտոպոզիդին, ապա *in silico* փորձերը ցույց են տալիս, որ ի տարբերություն պոդոֆիլոտոքսինի Էտոպոզիդի մոլեկուլները չեն փոխազդում ԴԼԹ-ի ակոսների հետ: Փոխազդեցությունը տեղի է ունենում ծայրային և դեֆեկտային հատվածների հետ, ընդ որում Էտոպոզիդը ավելի ուժեղ է կապվում քան պոդոֆիլոտոքսինը, սակայն կապման տեղերի թիվը ավելի քիչ է:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ վինկրիստինը և վինորելբինը փոխազդում են ԴԼԹ-ի մեծ ակոսի շաքարաֆոսֆատային կիմախքի հետ ԷԼԵԿՏՐՈՍՏԱՏՐԻԿ ուժերի շնորհիվ: Ընդ որում վինբլաստինի փոխազդեցությունը ունի ընտրողական բնույթ: Նա փոխազդում է շաքարաֆոսֆատային կիմախքի ԳՑ-հարուստ հատվածների 5'-ՑԱԳ-3' հաջորդականությունների հետ, այն դեպքում, երբ 3'-ՑԱԳ-5' հաջորդականությունների հետ փոխազդեցություն չի նկատվում: Ի տարբերություն վինբլաստինի, վինորելբինը փոխազդում է ԴԼԹ-ի մեծ ակոսի հետ գործնականորեն փակելով այն: Ստացված էներգետիկ տվյալները վկայում են, որ վինորելբինը ավելի ուժեղ է փոխազդում ԴԼԹ-ի հետ քան վինբլաստինը:

Ստացված արդյունքների հիման վրա, կարել է եզրակացնել, որ մոլեկուլային դինամիկայի մեթոդը կարող է հանդիսանալ տարբեր տիպի միացությունների և մոլեկուլային համակարգերի ուսումնասիրության հարմար գործիք, ինչպես արդեն հայտի դեղամիջոցների մոդիֆիկացիաների և նոր դեղամիջոցների ստեղծմանը (*drug design*), այնպես էլ տարբեր տիպի միացությունների փոխազդեցության ուսումնասիրությանը բջջային կառուցվածքների հետ:

THE INVESTIGATION OF HYPERICIN AND PODOPHYLLOTOXINS INTERACTION WITH DNA BY THE METHOD OF MOLECULAR DYNAMICS

SUMMARY

Key words: binding constant, complexation energy, DNA, ethidium bromide, hypericin, method of molecular dynamics (MMD), podophyllotoxin, vinblastine.

Currently, pharmaceutical companies spend more than ten years and tens of millions of dollars to create and test new drugs. Despite the waste of time and resources, the received drugs are not always harmless and often lead to serious complications. The most dangerous of the possible side effects are those caused by the interaction of drugs with the hereditary material. In this regard, it is extremely important to develop methods of rapid assessment of potential and possible real risks and to forecast the probable side effects. One of the modern techniques is the method of molecular dynamics (MMD). MMD is a computer experiment on simulation of molecular system behavior in time period by numerical integration of equations of motion. The aim of this work is to study the interaction of anticancer drugs lignans and diantrons with DNA by the method of molecular dynamics. It should be noted that the model of ethidium bromide interaction with DNA was used as a standard. The interaction of hypericin (Hy), podophyllotoxin (Ptox) and its semi-synthetic derivatives etoposide (Eto) and teniposide (Ten), and also vinblastine (VB) and its semi-synthetic derivatives vincristine (VC) and vinorelbine (VIN) with DNA was studied to identify possible interactions, mechanisms, spatial and energy parameters of the process. We calculated the constants, the number of binding sites, spatial and energy parameters of interaction. The results of computer experiment show that except to Ten and VC all other compounds interact with DNA, in fact that the mechanisms and types of interaction are different. *In silico* experiments show that Hy binds to DNA. This binding is performed both by hydrogen bonds formation and by electrostatic interaction forces. It was identified the binding sites of Hy on the DNA molecule. The Hy molecule binds both to the phosphate groups of sugar-phosphate backbone, and with the base pairs, in particular with guanine. It should be noted that the interaction is weak character $K_b = 1.1$. It was calculated that in average one Hy molecule binds to 10 base pairs of DNA and the Hy molecules are not in monomeric, but in dimeric forms. The used MMD allowed us to investigate the oligomeric forms and to get both spatial and energy parameters of oligomerization process. The distribution of oligomers was as follows: 50% monomers; 30 % dimers; 15 % tetramers ; 5 % hexamers. From our results it follows that the limit of Hy dosage at accepting may be due to the possibility of the molecule to form the aggregates, which can lead to undesirable side effects. With regard to direct interaction on the DNA molecule, it is not the main way of impact, as the parameters at binding are of weak character. We must assume that the action on the cell has another, perhaps multiplet character. The carried out *in silico* investigations prove that Ptox interact with DNA in two types. The first type of binding is with phosphate groups of the sugar- phosphate backbone of DNA. Also, there is interaction with the end and defective DNA sites, which corresponds to the second type of interaction. Our results show that Ptox interacts with sugar-phosphate backbone in the AT- rich parts of DNA. Thus there is a block of the groove. It should be noted that the binding sites are both hydrogen bonds formation, and electrostatic types of interactions. There is also interaction with defective and end portions while the Ptox molecule has no predisposition to specific sites. The obtained parameters of interaction Eto with sugar- phosphate groups show that the types of binding comparable to Ptox. Spatial parameters of interaction Eto with defective and end parts are different. Eto is not included in defective part like Ptox, but binds with the outside; and this interaction is stronger. Thus, Ptox and Eto interact with DNA, and this interaction is realized by two types: strong and

weak. Eto binds to DNA stronger compared with Ptox, though it has less binding sites than Ptox. As our results show interaction of VB and VI with DNA. Moreover, the interaction is on a big groove of DNA. Our results imply that the VB interacts with the phosphate groups of the sugar-phosphate backbone in GC -rich parts. This is accompanied by the selective binding type. Our results indicate that the interaction occurs in the direction 5'-CAG-3', and is not observed in the direction of 3'-CAG-5'. On the basis of binding energy parameters, we can say that Vi has a stronger bind to DNA, compared with WB. Taking into account the fact that the VC has a high cytotoxicity, and the VIN has a stronger bind to DNA, practically blocking the big groove, it is more preferable to use in medicine the VB, which is less cytotoxic and has an average affinity with DNA as compared with the others.

To summarize, we can say that the MMD has every opportunity to become a convenient tool for studies both in terms of design or modification of new drug compounds (*drug-design*), and for studying the interaction of different compounds with cellular structures. The obtaining of such valuable data, such as spatial and energy interaction parameters and comparing these data with the results of well-known experimental techniques, can become the basis for a more detailed study of processes in the cell.

