

Биология

УДК 581.143.6

А. Р. ПЕНЕСЯН, А. П. АНТОНЯН, Г. Р. ВАРДАПЕТЯН

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОЧИЩЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
ГИПЕРИЦИНА С ДНК

Выделен и фракционирован тотальный метанольный экстракт из цветков *Hypericum perforatum L.* гель-хроматографией на колонках с сефадексом LH-20. Методами абсорбционной и флюорисцентной спектроскопии, а также с помощью тонкослойной хроматографии показана высокая степень чистоты полученного препарата гиперидина.

Исследовано взаимодействие гиперидина с ДНК. Показано, что гиперидин избирательно и по-разному взаимодействует с пуриновыми и пиримидиновыми последовательностями ДНК.

Введение. Гиперидин является полициклическим ароматическим дионом, который содержится в растениях рода *Hypericum*. Показано, что он обладает высокой антидепрессивной и антиретровирусной активностью (против нескольких типов вирусов, включая вирус иммунодефицита человека – ВИЧ) [1–4].

Хотя существует много данных об антивирусной активности гиперидина [1, 2, 5, 6], механизм и место его действия на клеточном уровне все еще остаются неясными. Гиперидин, как известно, является липофильной молекулой, способной встраиваться в бислой клеточных мембран [7]. Это подтверждается экспериментами по флюоресцентной микроскопии, показывающими, что гиперидин способен локализоваться в плазматических мембранах [2, 8].

Для оценки внутриклеточного распределения гиперидина среди различных компонентов клетки были проведены микроспектрофлуориметрические исследования на модельных системах, которые показали, что прежде всего гиперидин локализуется в клеточных мембранах и цитоплазме, а после долговременной инкубации (210 мин) фактически достигает ядра клетки и концентрируется в нем [8]. Необходимо отметить, что эти исследования проводились в водных средах, где растворимость гиперидина достаточно низкая. Из полученных результатов следует, что ядро и внутриядерные структуры могут выступать в

качестве мишеней для гиперина, а эффект высокой биологической активности, по крайней мере частично, можно объяснить непосредственным его взаимодействием с ядерной ДНК [8].

Целью настоящей работы являлось выделение гиперина, его хроматографическая очистка и исследование особенностей взаимодействия гиперина с ДНК.

Материалы и методы. Гиперин и его производные выделялись из цветков *H. perforatum L.* экспозиции 2001 года [9]. Цветки, высушенные теплым воздухом при 55 ± 1 ($^{\circ}\text{C}$), последовательно экстрагировали хлороформом или дихлорметаном в течение 3 часов на качалке при комнатной температуре, для освобождения от пигментов и липидных соединений. После этого растительный материал сушили вакуумным роторным испарителем, помещали в аппарат Сокслета и проводили экстракцию 80% метанолом до его полного обесцвечивания. Полученный ярко-красного цвета экстракт центрифугировали, осадок удаляли, супернатант выпаривали вакуумным роторным испарителем, а осадок перерастворяли в 80% метаноле.

Концентрацию гиперина определяли спектрофотометрически, за экстинкцию принимая значение $\varepsilon = 43500 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при 590 нм.

Разделение метанольного экстракта проводили гель-хроматографией на колонке (35 мм × 24 мм) с липофильным сефадексом LH-20 *Pharmacia* (Швеция). В качестве элюента использовали безводный метанол. Детектирование при разных длинах волн проводили посредством проточной кюветы на спектрофотометре *Specord UV-VIS* (Германия). Фракции, соответствующие основным абсорбционным пикам, регистрировали на самописце K-200 (Германия) и собирали на коллекторе E-200 (Венгрия).

Чистоту гиперинового экстракта определяли флюоресцентной и абсорбционной спектроскопией на спектрофотометре *Specord M-400* (Германия).

Для качественного анализа экстракта *H. perforatum L.* использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ) на целлюлозных пластинках *Merck* (Германия). В качестве подвижной фазы использовалась смесь хлороформ-ледяная уксусная кислота-вода (50:45:1). Хроматографическая камера насыщалась парами подвижной фазы около 30 мин, после чего в нее опускались пластинки ТСХ с нанесенными пробами (5–10 мкл). Использовалась восходящая хроматография. Сканирование хроматограмм проводилось под УФ-светом. Относительное содержание гиперина определяли спектральным методом, принимая суммарное содержание вторичных метаболитов в интактном растении за 100%.

Флюоресценцию измеряли после растворения гиперинового фракции в абсолютном метаноле. Флюоресцентный анализ проводили на автоматическом спектрофлюорометре. Фракции, содержащие гиперин и псевдогиперин, возбуждали при длине волны 254 нм. В качестве гиперинового пика принимали спектральный максимум – 590 нм.

Для приготовления ДНК-гиперинового комплекса использовали водорастворимый препарат гиперина. С целью получения водо-

растворимого препарата растворенный в метаноле гиперин разбавляли в 10-кратном избытке 20ММ фосфатного буфера, рН 7.2. Полученный раствор нагревали до 100°C в течение 30 мин и центрифугировали на центрифуге *Micro-centrifuge type 300* (Польша) при 15000 об./мин в течение 15 мин. Надосадок, содержащий водорастворимый гиперин, использовался для приготовления комплексов с ДНК. Необходимо отметить, что при этом спектральные характеристики водорастворимого гиперина соответствовали аналогичным параметрам метанольного раствора, используемого в качестве стандарта.

ДНК-гиперинные комплексы готовили смешиванием в 20ММ фосфатном буфере при рН 7.2, из расчетной концентрации одна молекула гиперина на 150, 200, 250 пар азотистых оснований ДНК. Растворы смешивали в течение 24 часов при комнатной температуре.

Исследование взаимодействия ДНК с очищенной фракцией гиперина осуществляли методом «плавления». Плавление осуществляли в герметически закрытых кварцевых кюветах, помещаемых в термостатируемую ячейку спектрофотометра *Unicam SP 8-100* (Англия) с автоматической регулировкой температуры и регистрацией оптической плотности. Скорость нагрева 0.25 град./мин, точность измерения температуры $\pm 0.05^\circ\text{C}$, точность измерения оптической плотности $\pm 5 \cdot 10^{-4} \text{OE}$. Кривые плавления каждого образца регистрировались 3 раза.

Кривую плавления рассчитывали по формуле $1-\theta = A_T - A_0 / A_{\text{max}} - A_0$, где A_{max} , A_0 и A_T – равновесные значения оптической плотности полностью клубкообразной, полностью спиральной ДНК и при данной температуре соответственно.

Результаты и обсуждение. В ряде работ (см., напр., [10]) было показано, что фармакологическая активность экстрактов *H. perforatum L.* обусловлена как гиперинном, так и рядом других компонентов. С

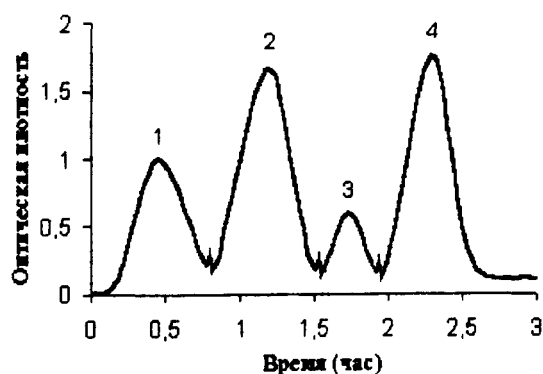


Рис. 1. Гель-хроматография тотального экстракта *H. perforatum L.* на колонке с сефадексом LH-20.

целью дальнейшей очистки препаратов гиперина и исследования их отдельных компонентов проводилось фракционирование тотального экстракта *H. perforatum L.* гель-хроматографией на колонках с липофильным сефадексом LH-20. Результаты этих экспериментов приведены на рис. 1.

В процессе колоночной хроматографии были идентифицированы 4 основные фракции, которые отличались друг от друга цветом и скоростью элюции. Спектры поглощения этих фракций приведены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, полученные фракции существенно отличаются

по своим спектральным характеристикам. Фракции 3 и 4 показывают спектр поглощения, характерный для гиперацинов с максимумом поглощения в области 590нм. Отсутствие поглощения в области 450–500нм указывает на высокую степень очистки препарата гиперацина. Это подтверждается результатами ТСХ. Отдельный интерес вызывает фракция 1, которая имеет максимум поглощения в области 670нм. Предполагается, что данная фракция ответственна за высокую фотосенсибилизационную активность гиперациносодержащего экстракта.

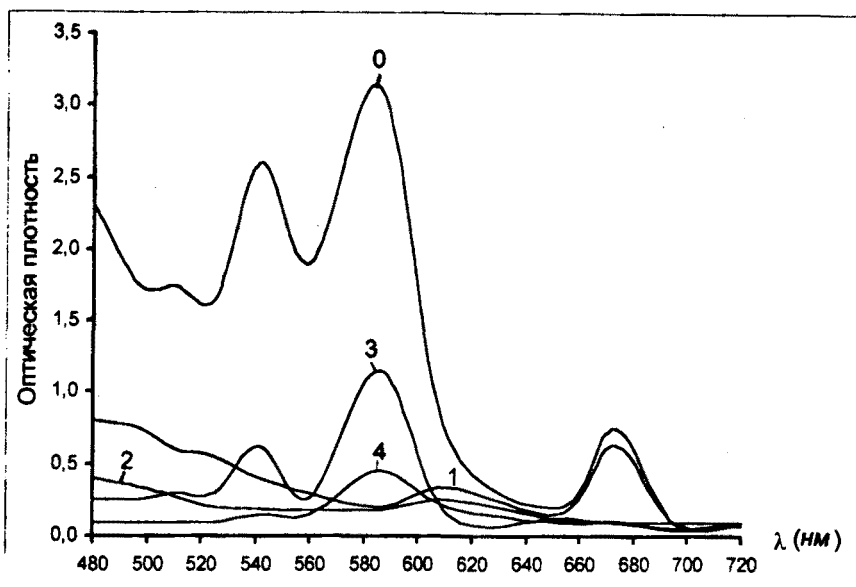


Рис. 2. Спектры поглощения отдельных фракций экстракта *H. perforatum L.* (0 – тотальный экстракт, 1 – 1-ая фракция, 2 – 2-ая фракция, 3, 4 – гиперациносодержащие фракции)

Для лучшего понимания механизмов действия этого лекарственного препарата необходимо исследовать его взаимодействие с основными субклеточными структурами (мембранами, белками и нуклеиновыми кислотами).

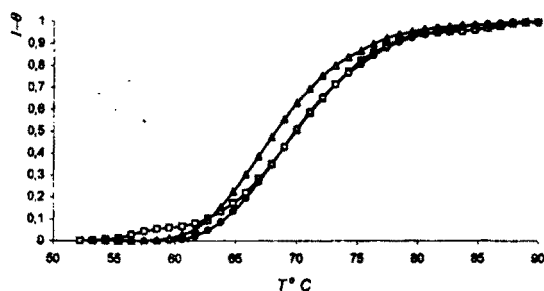


Рис. 3. Кривые плавления ДНК тимуса теленка (Δ) и ее комплексов с гиперацином в мольных соотношениях гиперацина с ДНК – 1:250 (\circ), 1:150 (\square).

Ранее было показано [11], что гиперацин взаимодействует с синтетическими полинуклеотидами – поли-(dG-dC), поли-(dA-dT) и т. д., а также, что он избирательно и по-разному взаимодействует с определенными последовательностями ДНК. Для исследования взаимодействия гиперацина с ДНК были получены кривые плавления ДНК-гиперациновых комп-

лексов, которые приведены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, в зависимости от возрастания концентрации гиперидина в комплексах кривые плавления последних смещаются в область высоких температур. Это может быть связано с более предпочтительным связыванием гиперидина с двухцепочечной ДНК. Появление сателлитного участка в низкотемпературной области кривых плавления (около 55–60°C) обусловлено частичным дестекинггом оснований при взаимодействии гиперидина с А-Т-богатыми участками ДНК [11]. Появление сателлитного участка в высокотемпературной области (выше 80°C) при увеличении соотношения гиперидин–ДНК до 1:150 подтверждает предположение о том, что гиперидин проявляет высокое сродство к G-C-богатым кластерам ДНК, образуя прочные водородные связи с седьмым атомом азота гуанина [11].

Таким образом, изменения в кривых плавления указывают на возможность непосредственного взаимодействия гиперидина с ДНК. Полученные результаты показывают, что фармакологическая активность гиперидина может быть обусловлена его непосредственным взаимодействием с ДНК. Об этом свидетельствуют также целенаправленный транспорт и накопление гиперидина в ядерных структурах при инкубации клеточных культур в среде, содержащей гиперидин [8].

Из вышеотмеченных результатов следует также, что определение транспорта и локализации гиперидина в ядерных структурах важнее, чем это предполагалось до сих пор. Следовательно, дальнейшие исследования взаимодействия гиперидина с ДНК представляют большой интерес для выявления механизмов действия и объяснения биологической активности данного соединения.

Работа выполнена при финансовой поддержке исследовательского гранта ANSEF № NS 82.

Кафедра биофизики

Поступила 25.12.2002

ЛИТЕРАТУРА

1. Muruelo D., Lavie G., Lavie D. – Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1988, v. 85, p. 5230–5234.
2. Lavie G., Valentine F., Levin B., Mazur Y., Gallo G., Lavie D., Weiner D., Meruelo D. – Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1989, v. 86, p. 5963–5967.
3. Lavie G., Mazur Y., Lavie D., Levin B., Ittah Y., Meruelo D. – AIDS: Anti-HIV Agents Ther Vaccines, 1990, v. 616, p. 556–562.
4. Duran N., Song S. – Photochem. Photobiol., 1986, v. 43, p. 677–680.
5. Kraus G.A., Pratt D., Tøsseberg J.S. – Biochem. Biophys. Res. Commun., 1990, v. 172, p. 149–153.
6. Lopez-Bazzocchi I., Hudson B., Towers N. – Photochem. Photobiol., 1991, v. 54, p. 95–98.
7. Sureau F., Khunel J.M., Schwaller M.A., Turpin P.Y. In: Laser Application in Life Sciences, 1994, v. 2370, p. 263–267. SPIE Proceedings of the 5th LALS Int. Conf.
8. Miskovsky P., Sureau F., Chinsky L., Turpin P.Y. – Photochemistry and Photobiology, 1995, v. 62, № 3, p. 546–549.

9. Kirakosyan A.B., Vardapetyan H.R., Charchoglyan A.G. – Russian Journal of Plant Physiology, 2000, v. 47, № 2, p. 302–306.
10. Giese A.C. – Phytochem. Phytobiol. Rev., 1980, v. 5, p. 229–255.
11. Miskovsky P., Chinsky L., Wheeler G. and Turpin P.Y. – J. of Biomolecular Structure & Dynamics, 1995, v. 13, № 3, p. 547–552.

Ա. Ռ. ՓԵՆԵՍՅԱՆ, Ա. Պ. ԱՆՏՈՆՅԱՆ, Հ. Ռ. ՎԱՐԴԱՊԵՏՅԱՆ

ՀԻՊԵՐԻՑԻՆԻ ՄԱԶՐՎԱԾ ՆՍՈՒՇՆԵՐԻ ԵՎ ԴՆԹ-Ի
ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ամփոփում

Կատարվել է *Hypericum perforatum* L.-ի ծաղիկներից ստացված ամբողջական թուրմի մեթանոլային անջատում և ֆրակցիաների բաժանում գել-քրոմատոգրաֆիայի միջոցով սեֆադեքս LH-20 պարունակող աշտարակների վրա: Կլամման և ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի միջոցով, ինչպես նաև նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիայի օգնությամբ ցույց է տրվել հիպերիցինի ստացված մուշների բարձր աստիճանի մաքրությունը:

Ուսումնասիրվել է հիպերիցինի և ԴՆԹ-ի փոխազդեցությունը: Ցույց է տրվել, որ հիպերիցինը ընտրողաբար և տարբեր ձևերով է փոխազդում ԴՆԹ-ի պուրինային և պիրիմիդինային հաջորդականությունների հետ:

A. R. PENESYAN, A. P. ANTONYAN, H. R. VARDAPETYAN

STUDY OF INTERACTION BETWEEN PURIFIED HYPERICIN PREPARATIONS AND DNA

Summary

Isolation and fractionation of total methanol extract, obtained from *Hypericum perforatum* L. flowers, using the method of gel-chromatography on columns, containing sephadex LH-20, were performed. Absorption and fluorescent spectroscopy, as well as the method of TLC have shown the high purity of obtained hypericin preparations.

Interaction between hypericin and DNA was investigated. It was shown that hypericin interacts with purine and pyrimidine sequences of DNA selectively and in different ways.