

На правах рукописи

ОЛЕЙНИКОВ

Владимир Александрович

**Оптическая спектроскопия в исследовании  
молекулярных механизмов действия и создании новых  
противоопухолевых препаратов - ингибиторов ДНК  
топоизомеразы I человека**

03.00.02 - Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора физико-математических наук

Санкт-Петербург

2003 год

**Работа выполнена в Институте биоорганической химии  
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва**

**Официальные оппоненты:**

Бункин Федор Васильевич, академик РАН, доктор физ.-мат. наук, директор  
Научного центра волновых исследований Института общей физики им.  
А.М. Прохорова РАН

Баранов Александр Васильевич, доктор физ.-мат. наук, ФГУП «ВНЦ  
Государственный оптический институт им. С.И. Вавилова», г. Санкт-  
Петербург

Тимковский Андрей Леонидович, доктор физ.-мат. наук, Петербургский  
институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН, Отделение  
молекулярной и радиационной биофизики, лаборатория биополимеров.

**Ведущая организация:**

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, кафедра биофизики.

Защита диссертации состоится " " \_\_\_\_\_ 2003 года в \_\_\_\_\_ часов на  
заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при Санкт-Петербургском  
государственном политехническом университете по адресу:

195251, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д.5, физико-медицинский факультет  
СПбГПУ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Санкт-Петербургского  
государственного политехнического университета.

Автореферат диссертации разослан " " \_\_\_\_\_ 2003 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат физико-математических наук

О.Л. Власова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

ДНК топоизомераза I (топоI) - фермент, катализирующий топологические перестройки ДНК, жизненно необходим для функционирования клеток эукариот. Он играет ключевую роль во всех аспектах топологических изменений структуры ДНК, обеспечивая релаксацию суперскрученной ДНК для ее репликации и транскрипции.

Структурно-функциональные исследования топоI приобрели особое значение, когда стало ясно, что фермент является основной клеточной мишенью для многих известных соединений с противоопухолевой и противомикробной активностью. Это открытие вызвало интенсивный поиск природных и создание новых синтетических соединений, способных специфически взаимодействовать с молекулой ДНК и/или фермента и тем самым влиять на каталитическую активность топоI. Это влияние может проявляться путем либо модулирования узнавания ДНК ферментом (так называемые **супрессоры** топоI), либо одновременного взаимодействия с ферментом и с ДНК, приводящего к образованию долгоживущих ДНК-белковых, так называемых "расщепленных" комплексов, провоцирующих образование разрывов ДНК и гибель раковых клеток (так называемые **яды** топоI).

Изучение молекулярных механизмов действия ДНК-специфичных лигандов на ферментативный катализ с участием топоI необходимо для разработки принципов направленного конструирования селективных ингибиторов топоI как новых противоопухолевых препаратов. Такой подход делает реальным приложение результатов исследования в медицине. Поэтому решение указанной проблемы **актуально** не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения.

Ключом к решению этой задачи является разработка комплексного биофизического подхода к исследованию молекулярных механизмов взаимодействия биологических молекул в условиях, близких к физиологическим, в которых биологические молекулы сохраняют свою активность. Среди физических методов, дающих информацию о структуре сверхмолекулярных комплексов, выделяется оптическая спектроскопия, позволяющая проводить исследования в физиологических условиях. Среди методов оптической спектроскопии наиболее информативным является метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света, позволяющий селективно регистрировать сигналы отдельных молекулярных групп как лигандов, так и их мишеней в составе сверхмолекулярных комплексов. Спектры КР содержат детальную информацию о структуре молекул и позволяют

регистрировать малые структурные изменения, индуцированные межмолекулярными взаимодействиями. Основным недостатком метода спектроскопии КР в его "традиционной" форме является низкая чувствительность, что вызывает необходимость применения спектроскопии резонансного КР и разработки новых методических подходов, основанных на спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). Построение корректных моделей взаимодействия лиганд – мишень требует комбинированного подхода, основанного на использовании методов оптической спектроскопии и сопоставления получаемых результатов с теоретическими данными и данными биохимических исследований.

Экспериментально-методической основой настоящей работы стало развитие комплексного подхода с использованием спектроскопии флуоресценции и поглощения, кругового и линейного дихроизма, а также спектроскопии КР, резонансного КР и ГКР. Совокупность данных, полученных этими методами, позволяет охарактеризовать структурные предпосылки молекулярных механизмов образования комплексов противоопухолевых ингибиторов топоI с ДНК, выработать подход к направленному синтезу новых ингибиторов с улучшенными свойствами, синтезировать ингибиторы нового типа и предложить структурную модель их взаимодействия с ДНК и ферментом. Параллельные эксперименты по анализу цитотоксичности позволяют провести корреляцию структурно-функциональных данных с противораковой активностью новых соединений.

## **Цель и задачи работы**

**Цель настоящей работы** - исследование молекулярных механизмов действия противоопухолевых препаратов - ингибиторов ДНК топоизомеразы I человека, действующих по принципу супрессоров либо ядов фермента, и создание на основе понимания этих механизмов новых агентов, объединяющих достоинства обоих классов соединений.

### **Задачи работы включают:**

- повышение чувствительности анализа методом КР, разработку методик формирования структурированных поверхностей, выявление связей геометрических характеристик и оптических свойств таких поверхностей, создание новых ГКР-активных систем, усиливающих преимущественно по электромагнитному механизму;

- исследование молекулярных механизмов действия ядов фермента (на примере соединения из класса камптотецина - топотекана);
- исследование молекулярных механизмов действия супрессоров фермента топоI (на примере производных нетропсина – бис-нетропсинов различной структуры);
- определение принципов построения соединений, совмещающих достоинства ядов и супрессоров фермента, синтез и исследование таких соединений.

## **Научная новизна**

В настоящей работе впервые

(1) Исследованы нелинейно-оптические свойства нового типа ГКР-активных поверхностей, реализующих усиление сигнала КР по дальнедействующему электромагнитному механизму и позволяющих улучшить предел детекции биологических молекул на 2-3 порядка.

(2) Исследованы молекулярные механизмы действия ингибиторов ДНК топоизомеразы I человека: типичного яда фермента (клинически важного аналога камптотецина – топотекана), а также типичных супрессоров (производных нетропсина - бис-нетропсинов). В частности, определена геометрия взаимодействия топотекана с ДНК и показано, что связывание с ДНК стабилизирует активную форму топотекана; выявлены молекулярные детерминанты, определяющие действие топотекана, предложена молекулярная модель комплекса топотекан–ДНК.

(3) Выявлены основные механизмы ингибирования активности топоI производными нетропсина – бис-нетропсинами разной структуры. Показано, что ключевую роль в ингибировании топоI играют изменения структуры ДНК, индуцированные связыванием производных нетропсина. Показано, что присутствие бис-нетропсинов способно стимулировать формирование тройного комплекса ДНК/топоI/камптотецин, усиливая, таким образом, ингибирующее действие камптотецина.

(4) Предложен новый подход к конструированию противоопухолевых соединений нового типа, обладающих комбинированными свойствами супрессоров топоI и соединений, специфически связывающихся в тройной комплекс. Синтезированы и исследованы свойства гибридного соединения камптотецин–нетропсин.

### **Практическая значимость:**

- разработаны новые методы усиления сигнала КР, повышающие чувствительность анализа биологических объектов при минимальном искажении их структуры;

- разработаны модельные системы для изучения особенностей взаимодействия биологических объектов, основанные на использовании методики ГКР;

- на основе полученных данных о молекулярных механизмах действия ингибиторов топоI из семейства камптотецина и производных бис-нетропсинов сконструировано, синтезировано и исследовано новое соединение, объединяющее достоинства супрессоров и агентов, специфически фиксирующих ДНК-ферментный комплекс на стадии щепления ДНК; на примере клеточной линии аденокарциномы яичников показана перспективность нового соединения.

### **На защиту выносятся следующие положения и результаты**

(1) Комплексный подход к изучению молекулярных механизмов действия ингибиторов ДНК топоизомеразы I человека, основанный на применении комбинации методов оптической спектроскопии, методов расчета структуры, электронных и колебательных состояний биологических молекул в сопоставлении с биохимическими данными.

(2) Модели молекулярных механизмов действия соединений – супрессоров ДНК топоизомеразы I человека

(3) Молекулярная модель взаимодействия производного камптотецина - топотекана, ингибитора ДНК топоизомеразы I человека с ДНК. Методика интерпретации линий в спектрах КР топотекана, основанная на использовании разных ионных состояний топотекана; методика оценки степени димеризации молекулы в растворе и в комплексах с ДНК по данным спектроскопии ГКР и флуоресценции.

(4) Подход к конструированию противоопухолевых соединений нового типа, обладающих комбинированными свойствами супрессоров топоI и соединений - ядов фермента, специфически связывающихся в тройной комплекс.

(5) Методика приготовления структурированных ГКР-активных поверхностей нового типа; выявленные закономерности, связывающие геометрические и электрические характеристики структурированных поверхностей с их оптическими свойствами; механизмы усиления эффекта КР на таких поверхностях; новый класс

ГКР-активных подложек, позволяющих записывать спектры КР пикограммовых количеств биологических молекул.

## **Публикации**

По проблеме, рассмотренной в настоящей диссертации, опубликовано 63 работы. Основные приведены в списке публикаций.

## **Апробация работы**

### ***Результаты настоящей работы представлены:***

- на 8-й Всесоюзной конф. по электронной микроскопии (Москва, 1987);
- на 20-й Всесоюзной конф. по эмиссионной электронике (Киев, 1987);
- на 9-м семинаре "Методы расчета электронно-оптич. систем" (Ташкент, 1988);
- на 12-й Европейской конф. по кристаллографии (Москва, 1989);
- на 3-й Межд. конф. по применению лазеров в науках о жизни (Москва, 1990);
- на Всесоюзной конференции по люминесценции (Москва, 1991);
- на 1-й (1991), 2-й (1992) и 3-й (1993) Межд. конф. "Трековые капиллярные мембраны и их применения" (Польша);
- на 17-й Межд. конф. "Ядерные треки в твердом теле" (Дубна, 1994);
- на Российской конф. по мембранам и мембранным технологиям (Москва, 1995);
- на Межд. конф. "Биология и химия сиаловых кислот" (Москва, 1994);
- на 3-м Международном конгрессе по биоорганической химии (Дагомыс, 1995);
- на Международном конгрессе по аналитической химии (Москва, 1997);
- на 10-м Феофиловском симп. по спектроскопии кристаллов, активированных ионами редкоземельных и переходных элементов (С.-Петербург, 1995);
- на 15-й (Питсбург, США, 1996), 16-й (Кейптаун, ЮАР, 1998) и 17-й (Пекин, Китай, 2000) Международных конференциях по Рамановской спектроскопии;
- на 24-м (Прага, Чехия, 1998), 25-м (Коимбра, Португалия, 2000) и 26-м (Лилль, Франция, 2002) Европейских конгрессах по молекулярной спектроскопии;
- на 5-й (Лоутраки, Греция, 1993), 6-й (Лилль, Франция, 1995), 7-й (Мадрид, Испания, 1997), 8-й (Энсхеде, Нидерланды, 1999) и на 10-й (Зегет, Венгрия, 2003) Европейских конференциях по спектроскопии биологических молекул;
- на 4-м Международном симпозиуме по ионам металлов в биологии и в медицине (Барселона, Испания, 1996);

- на 3-й Международной конференции "Химия высокоорганизованных веществ и научные основы нанотехнологии" (С.-Петербург, Россия, 2001);
- на 12-м Съезде по биомолекулярной стереодинамике (Албани, США, 2001);
- на конф. "Роль топоизомераз в раковых заболеваниях", Международный инст. по противораковым исследованиям (Афины, Греция, 2001);
- на 1-й Межд. конф. по колебательной спектроскопии (Турку, Финляндия, 2001);
- на 2-й (1997), 3-й (1999) и 4-й (2001) конф. по молекулярной биологии (Москва, Ярославль, С.-Петербург);
- на II съезде биофизиков России (Москва, 1999);
- на 3-ем съезде Биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002);
- на Межд. конф. по спектроскопии и применению спектр. методов (Киев, 2003);
- на Межд. конф. по физике лазеров и их применениям (Минск, 2003).

Экспериментальные и теоретические материалы, представленные в диссертации, получены непосредственно автором или под его руководством.

### **Объем и структура работы**

Работа состоит из введения, шести глав и выводов. Работа изложена на 266 страницах, включает в себя 8 таблиц и 59 рисунков. Библиография содержит 247 источников.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Введение**

Во введении сформулированы направления работы, ее цели и задачи, представлен материал, характеризующий актуальность данных исследований.

### **Глава 1. Современное состояние проблемы**

В главе дан обзор современных представлений о структуре и функционированию ДНК топоизомеразы I, описаны известные методы ингибирования фермента, рассмотрены проблемы разработки новых противоопухолевых соединений. Проанализированы известные механизмы усиления эффекта комбинационного рассеяния света молекулами, локализованными вблизи специально подготовленных поверхностей, – эффекта гигантского комбинационного рассеяния. Сформулированы задачи исследования.



## Глава 2. Новые технологии в приготовлении поверхностей с регулируемыми неоднородностями. Разработка новых типов ГКР-активных поверхностей

Несмотря на то что эффект гигантского КР был открыт еще в 1973 году, не прекращаются поиски новых КР усиливающих поверхностей. С одной стороны, привлекательно создание поверхностей для исследования структурных особенностей макромолекул, обеспечивающих усиление сигнала ГКР только определенных веществ или групп атомов, то есть поверхностей с дистанционнозависимым усилением. Для этой цели подходящими являются ГКР-активные поверхности с сильной связью адсорбент-адсорбат, обеспечивающие так называемый "молекулярный" механизм усиления. С другой стороны, существует возможность создания универсальных ГКР-активных поверхностей, усиление КР на которых не зависит от свойств нанесенной пробы, а связано только со свойствами металлической поверхности. Усиление КР молекул, находящихся вблизи поверхности таких подложек, обусловлено электромагнитным механизмом усиления и не зависит от химической природы адсорбента. Такие поверхности представляют значительный интерес в плане создания универсальных систем детектирования и исследования микроколичеств биомолекул с высокой чувствительностью.

Усиление интенсивности излучения молекулой по электромагнитному механизму определяется выражением:

$$G = \langle g \rangle = \left\langle |L'(\omega - \Omega)L(\omega)|^2 \right\rangle \quad (1)$$

где  $L(\omega)$  - фактор локального поля, выражающий отношение напряженности электрического поля в падающей световой волне и поля, модифицированного близостью металлической поверхности,  $L'(\omega - \Omega)$  - фактор локального поля, учитывающий изменение излучения поля молекулой,  $\omega$  - частота падающей световой волны,  $\Omega$  - частота внутримолекулярных колебаний, определяющая комбинационный сдвиг. Угловые скобки означают усреднение по облучаемому участку поверхности. Точный расчет факторов локального поля  $L(\omega)$  и коэффициента усиления  $G$  для реальных шероховатых поверхностей не представляется возможным, поэтому основные закономерности электромагнитных механизмов усиления исследуются на простых моделях. Для экспериментальной проверки могут быть использованы наноструктуры, состоящие из повторяющихся элементов. Повторяющийся характер неоднородностей позволяет создавать

одинаковые условия усиления на каждом из элементов и, таким образом, получать значительное усиление сигнала КР. В настоящей работе для создания таких структур использована оригинальная методика - техника трековых мембран.

Основой приготовления наноструктур являются так называемые трековые мембраны - полимерные пленки, облученные пучком высокоэнергетических ионов (с энергией  $\sim 1 - 2$  МэВ/нуклон) и обработанные затем химическим реагентом, воздействующим на полимер в области треков для получения пор, однородных по форме, размерам и ориентации. Поверхности с выступами заданной формы готовили путем снятия металлических реплик с системы пор трековых мембран. Для приготовления систем металлических нанотрубок на поверхность трековых мембран напыляли металл, причем условия напыления подбирались так, чтобы внутренняя поверхность пор была покрыта слоем металла. Используемая методика позволяла варьировать плотность элементов, их форму, размер и ориентацию, а также металл, из которого они были изготовлены.

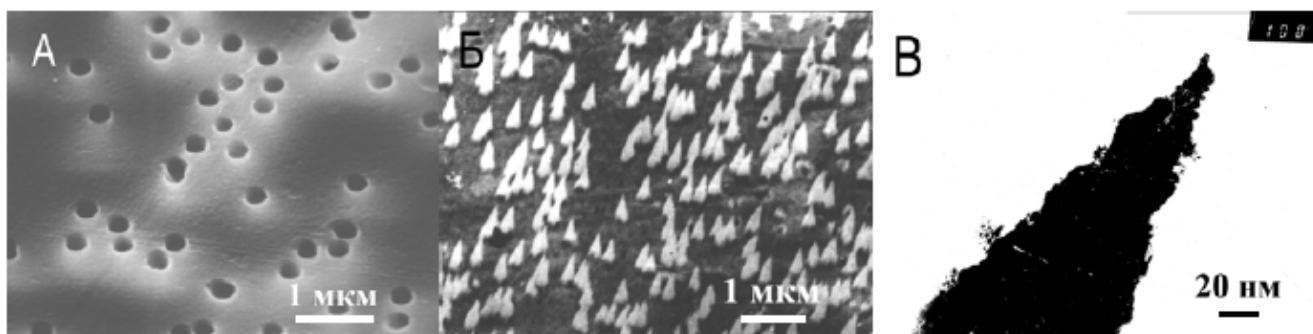


Рис. 1. Микрофотографии металлизированной поверхности трековой мембраны (А) и структурированной металлической поверхности (серебро) с выступами конической формы (Б), полученные на сканирующем электронном микроскопе. Изображение вершины конического выступа (В) получено на просвечивающем электронном микроскопе.

### ***ГКР-активные поверхности на основе острийных структур***

Локальное поле  $E_{loc}$  вблизи неоднородностей на поверхности металла определяется двумя факторами: (1) резонансным возбуждением светом локальных поверхностных плазмонов и (2) "эффектом светящегося острия", связанным с концентрированием силовых линий электрического поля вблизи поверхности высокой кривизны. Резонансные эффекты наблюдаются только в той области частот, где действительная часть диэлектрической проницаемости подложки  $\epsilon = \epsilon' + i\epsilon''$

отрицательна ( $\varepsilon' < 0$ ). Возрастание напряженности локального поля  $E_{loc}$  зависит от затухания в металле, определяемого мнимой частью  $\varepsilon''$ . Для эллипсоида вращения, помещенного во внешнее световое поле  $E_0$ , вектор напряженности которого направлен вдоль его оси, локальное поле вблизи его вершины определяется выражением

$$E_{loc}(\omega) = \frac{\varepsilon(\omega)}{1 + [\varepsilon(\omega) - 1]A} E_0(\omega), \quad (2)$$

где  $A$  - зависящий от геометрических параметров фактор деполяризации. Оценки показывают, что для серебряной сферы резонансная длина волны  $\lambda = 355$  нм. Создание вытянутых структур и возбуждение продольной моды колебаний смещает резонанс в длинноволновую область. Нерезонансный "эффект светящегося острия" определяется радиусом кривизны вершины выступа и значением модуля диэлектрической проницаемости металла  $|\varepsilon|$ . Уменьшение радиуса кривизны вершины такой неоднородности ведет к дополнительному усилению напряженности локального поля, мало влияя на резонансные эффекты усиления. Таким образом, можно ожидать, что максимальный вклад электромагнитного механизма усиления может быть достигнут путем создания вытянутых металлических структур с минимальным радиусом кривизны их вершины.

### *Роль материала острий*

Электромагнитные механизмы приводят к возбуждению отраженной второй гармоники оптического излучения. Эффективная нелинейная поляризация поверхностного слоя на удвоенной частоте  $P_{ef}(2\omega)$  определяется выражением:

$$P_{ef}(2\omega) = L'(2\omega) \cdot [f_m^{(2)} + N \cdot \beta^{(2)}] \cdot L^2(\omega) \cdot E_0^2(\omega), \quad (3)$$

где  $f_m^{(2)}$  - эффективная нелинейная восприимчивость поверхности металла;  $N$  и  $\beta^{(2)}$  - поверхностная плотность и нелинейная поляризуемость адсорбированных молекул соответственно. Нелинейная поляризация  $P_{ef}(2\omega)$  и, следовательно, интенсивность второй гармоники не обращаются в нуль при  $N = 0$ , поэтому этот эффект был использован для изучения свойств собственно подложки.

Как уже отмечалось, техника трековых мембран позволяет формировать геометрически идентичные поверхности из разных металлов. На рис. 1 показаны микрофотографии таких структурированных поверхностей с выступами конической формы и радиусом острия 6,5 нм. Сравнивались характеристики идентичных

**Таблица 1.** Электрические характеристики материала и усиление второй гармоники оптического излучения на поверхности с коническими неоднородностями

Металл	$\lambda = 1064$ нм		$\lambda = 532$ нм		Усиление $G_{2\omega}$
	$\epsilon' + i\epsilon''$	$ \epsilon $	$\epsilon' + i\epsilon''$	$ \epsilon $	
Ag	$-58,1 + i\cdot 0,61$	58	$-11,8 + i\cdot 0,37$	12	$(5-10)\cdot 10^3$
Cu	$-49,1 + i\cdot 4,9$	49	$-5,5 + i\cdot 5,8$	8	$10^2$
Al	$-100 + i\cdot 26$	104	$-36,6 + i\cdot 11,5$	38	$10^3$

Поверхностная плотность острых структур  $10^8$  см<sup>-2</sup>, диаметр оснований 0,2 мкм, отношение высоты к диаметру оснований 2/1. Вторую гармонику возбуждали лазером YAG:Nd,  $\lambda_0 = 1064$  нм, частота повторения 10 Гц, длительность импульса 15 нс, плотность мощности 100 кВт/см<sup>2</sup>.

поверхностей из серебра, меди и алюминия (табл. 1). Наименьшее значение усиления второй гармоники  $G_{2\omega}$  было на подложке из меди  $G_{2\omega}^{Cu} = 10^2$ . Увеличение значения усиления на алюминии определяется нерезонансным механизмом: в обоих случаях  $\epsilon'' > 1$ , следовательно, эффект резонансного усиления мал. Но модуль  $|\epsilon|$  у алюминия существенно больше, чем у меди, что и обусловило большее значение коэффициента  $G_{2\omega}^{Al} = 10^3$ . Значения модуля  $|\epsilon|$  для серебра и меди примерно одинаковы, но значения мнимых частей  $\epsilon''$  существенно отличаются. Таким образом, примерно два порядка усиления  $G_{2\omega}^{Ag} = (5-10)\cdot 10^3$  по сравнению с усилением  $G_{2\omega}^{Cu} = 10^2$ , определяются резонансным эффектом.

***Возбуждение продольных и поперечных мод колебаний в острых структурах***

На рис. 2А и 2Б представлены зависимости отражения *s*- и *p*-поляризованного света от длины волны и угла его падения. При малых углах падения (близких к нормали) *p*-поляризованный свет возбуждает преимущественно поперечную компоненту плазмонных колебаний с длиной волны  $\lambda_{\text{поп}} \approx 350$  нм. Увеличение угла падения ведет к росту продольной компоненты колебаний (то есть колебаний, направленных вдоль главной оси конических выступов), определяемой отношением высоты конуса к его диаметру (фактор деполяризации *A* в выражении (2)). Это обуславливает появление длинноволнового минимума в спектре отражения около  $\lambda_{\text{прод}} \approx 600$  нм. В случае *s*-поляризованного света возможно возбуждение только поперечной компоненты, поэтому в спектре отражения наблюдается только коротковолновый минимум. Возможность преимущественного возбуждения поперечных или продольных резонансов, а также управления резонансной частотой

путем изменения геометрических параметров выступов позволяет направленно создавать подложки с желаемыми резонансными характеристиками и оптимизировать условия получения максимальных сигналов ГКР (рис. 2В и 2Г).

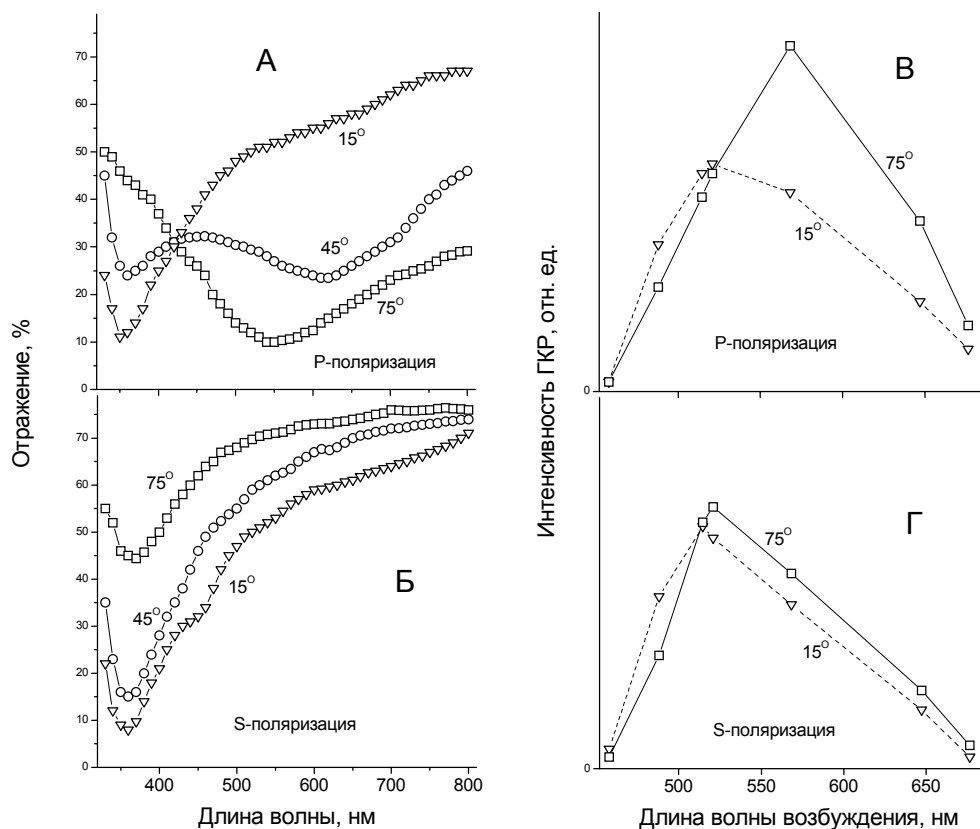


Рис. 2. Спектры отражения серебряных острых наноструктур при *p*- (А) и *s*-поляризации (Б). Диаметр оснований конусов 80 нм, отношение высоты конусов к диаметру их оснований 2/1, поверхностная плотность острий  $8 \cdot 10^8 \text{ см}^{-2}$ .

Спектры возбуждения ГКР молекул бипиридина, осажденных на те же поверхности при *p*- (В) и *s*-поляризации (Г). Количество вещества соответствует одному монослою молекул, мощность возбуждения 20 мВт. Спектры возбуждения записаны с использованием спектральной линии бипиридина  $1296 \text{ см}^{-1}$ .

### ***ГКР-активные поверхности на основе полых нанотрубок***

Метод приготовления таких структур - напыление металла на вращающуюся трековую мембрану под углом к ее поверхности.

Запишем в электростатическом приближении выражения для напряженности поля внутри полости нанотрубки, в металле нанотрубки (ориентированной вдоль оси *z*) и вне ее:

$$\mathbf{E}_{\text{loc}}(\mathbf{r}) = \begin{cases} \alpha \cdot \mathbf{E}_0, & r < r_1 \\ \beta \cdot \mathbf{E}_0 + (2 \cdot (\mathbf{d}_1 \mathbf{r}) \mathbf{r} - r^2 \cdot \mathbf{d}_1) / r^4, & r_1 < r < r_2 \\ \mathbf{E}_0 + (2 \cdot (\mathbf{d}_2 \mathbf{r}) \mathbf{r} - r^2 \cdot \mathbf{d}_2) / r^4, & r_2 < r \end{cases} \quad (4)$$

где  $\mathbf{r}$  - проекция радиуса-вектора точки, в которой вычисляется  $\mathbf{E}_{\text{loc}}$  на плоскость, перпендикулярную оси цилиндра;  $r_1$  и  $r_2$  - внутренний и внешний радиусы цилиндра. Отсюда с учетом граничных условий для локального поля внутри нанотрубки получим:

$$\mathbf{E}_{\text{loc}}(\omega) = L(\omega) \mathbf{E}_0(\omega) = \frac{4\varepsilon_2\varepsilon_3}{(\varepsilon_1 + \varepsilon_2)(\varepsilon_2 + \varepsilon_3) - (r_1/r_2)^2(\varepsilon_2 - \varepsilon_1)(\varepsilon_2 - \varepsilon_3)} \mathbf{E}_0(\omega), \quad (5)$$

где  $\varepsilon_1$  и  $\varepsilon_3$  - диэлектрические проницаемости среды в областях внутри и вне металлического цилиндра соответственно, а  $\varepsilon_2 = \varepsilon'_2 + i \cdot \varepsilon''_2$  - диэлектрическая проницаемость металла.

Частотные зависимости для  $\varepsilon_1 = \varepsilon_3 = 1$  и  $\varepsilon_2(\omega) = 1 - \omega_p^2 / \omega(\omega + i\gamma)$  в случае серебра (плазменная частота  $\omega_p = 1,3 \cdot 10^{16} \text{ с}^{-1}$  и декремент затухания  $\gamma = 1,1 \cdot 10^{14} \text{ с}^{-1}$ ) имеют ярко резонансный характер (рис.3). В частности, при  $(r_1/r_2)^2 = 0,7$  фактор локального поля во внутренней полости цилиндра достигает максимального значения  $L(\omega) = 40$  при  $\lambda = 520 \text{ нм}$ . В реальных системах отношение внутреннего и внешнего радиусов увеличивается по направлению в глубь поры, что приводит к уширению резонансной линии и снижению усиления.

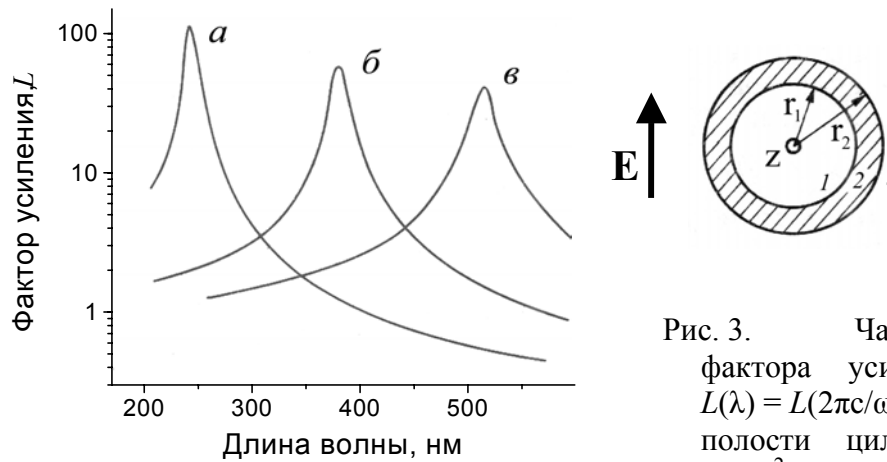


Рис. 3. Частотная зависимость фактора усиления локального поля  $L(\lambda) = L(2\pi c/\omega) = \alpha$  во внутренней полости цилиндра из серебра при  $(r_1/r_2)^2 = 0,1$  (а); 0,5 (б) и 0,7 (в).

Для экспериментальной оценки усиления по электромагнитному механизму был использован эффект генерации второй гармоники (условия даны в разделе, посвященном острейшим структурам). Показано, что суммарная мощность второй

гармоники от структурированной поверхности в  $(5-10) \cdot 10^2$  раз превышает интенсивность зеркальной второй гармоники, полученной на неперфорированном участке (то есть в отсутствии нанотрубок), что соответствует значению усиления сигнала КР по электромагнитному механизму. По сравнению с острыми наноструктурами усиление на нанотрубчатых структурах примерно на два порядка ниже, что обусловлено отсутствием усиления по нерезонансному механизму. С этим же связано ухудшение в 10-100 раз предела детекции сигнала ГКР на нанотрубчатых структурах по сравнению с острыми. Достоинством нанотрубчатых структур является возможность накопления исследуемого вещества в порах при создании проточных аналитических систем [Авт. св. 1673929].

### **Поверхностные наноструктуры в получении спектров ГКР**

Возможности ГКР-активных поверхностей, приготовленных по технологии трековых мембран, исследованы на примерах окрашенных (родамин 6G, тетрапорфирин цинка) и прозрачных в видимой области (фенилаланин, лизоцим, бипиридин, аденин) соединений (рис.4).

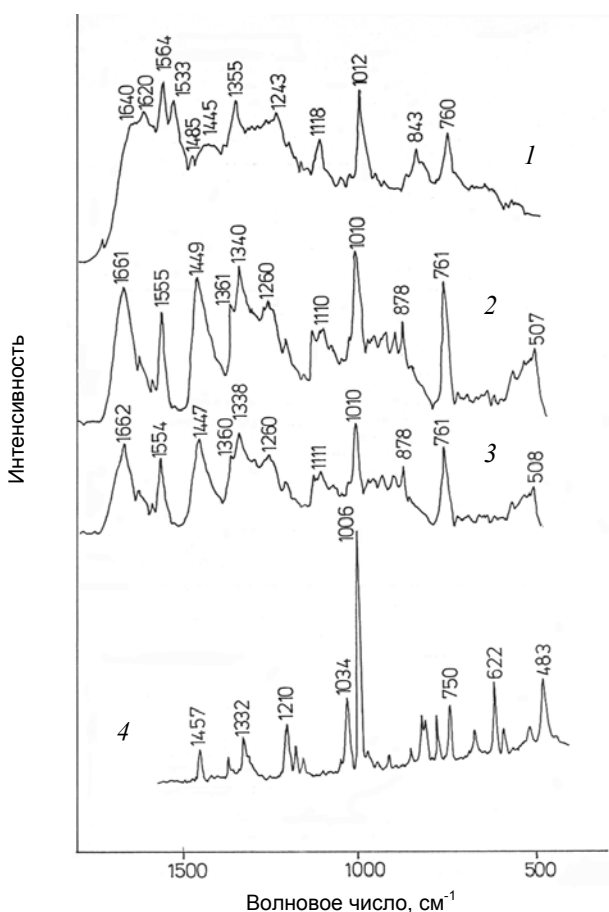


Рис. 4. Спектры ГКР белка лизоцима, записанные с помощью серебряного электрода (1) и острой поверхности (2); спектр КР лизоцима (3). Для сравнения в той же шкале приведен спектр ГКР фенилаланина (4). Содержание лизоцима и фенилаланина на острой поверхности и лизоцима на электроде 1 пг вещества в пробе. Концентрация лизоцима в водном растворе 25 мг/мл.

ГКР-активная острая поверхность приготовлена по технологии трековых мембран (серебро, диаметр выступов  $d = 30$  нм, отношение высоты выступов к их диаметру  $h/d = 2/1$ , поверхностная плотность острий  $10^{11}$  см<sup>-2</sup>).

Длина волны возбуждения 514,5 нм при мощности 20 мВт для спектров ГКР и 250 мВт для спектров КР.

Показано, что уменьшение размера острий при одновременном увеличении их поверхностной плотности приводит к значительному увеличению коэффициента усиления КР. Это позволяет регистрировать спектры пикограммовых количеств веществ. При этом спектры, получаемые с использованием острийных наноструктур, приготовленных по технологии трековых мембран, сходны со спектрами КР тех же соединений, но отличаются от спектров ГКР, записанных на системах, в которых эффект усиления определяется молекулярным близкодействующим механизмом. Этот факт подтверждает превалирующую роль дальнедействующего электромагнитного механизма усиления, реализуемого на поверхностях, приготовленных по технологии трековых мембран.

### **Глава 3. Взаимодействие ДНК топоизомеразы I с ДНК: методы спектроскопии КР, ГКР и кругового дихроизма в исследовании структурных особенностей взаимодействия**

В живых организмах молекулы ДНК, являющиеся носителями наследственной информации, представляют собой очень длинные или замкнутые в кольцо двухцепочечные молекулы. Поэтому любой процесс, связанный с передачей наследственной информации, должен наталкиваться на серьезные топологические проблемы, связанные с возникновением положительной или отрицательной сверхспирализации ДНК. Решение этих проблем обеспечиваются ДНК-топоизомеразы - ферментами, изменяющими топологию ДНК. Они относятся к ключевым ферментам передачи наследственной информации. Клетка, лишенная топоизомераз, не может компенсировать их отсутствие и гибнет. Поэтому, топоизомеразы являются объектом пристального внимания как фундаментальной науки, так и разработчиков антибактериальных и противоопухолевых препаратов.

Действие топоизомераз базируется на формировании временной связи между Туг фермента и одним из концов разрезанной цепи ДНК. За время существования ковалентного промежуточного комплекса ДНК изменяет свою топологию, после чего целостность ДНК восстанавливается. Виды фермента, разрезающие одну цепь ДНК и формирующие связь с 3'-концом фосфатной цепи, относятся к классу IV. ДНК топоизомеразы I человека (топоI) относится к этому классу. ТопоI является основной клеточной мишенью многих противораковых соединений. Поэтому



предметом настоящего исследования является ДНК топоизомераза I человека и механизмы ее ингибирования агентами разных типов.

По принципу действия ингибирующие агенты разделяются на две основные группы: (1) супрессоры, то есть соединения стерически препятствующие взаимодействию топоI с ДНК, и (2) яды фермента - соединения, фиксирующие промежуточный ДНК-ферментный комплекс. Супрессоры, как правило, - агенты, обладающие высоким сродством к ДНК и связывающиеся с ней по малой бороздке, ингибируют действие не только топоизомеразы, но и других белков, взаимодействующих с ДНК. Их применение особенно эффективно, когда концентрация топоI в раковой клетке невелика и наряду с воздействием на топоI необходимо подавить действие других ферментов. Наоборот, яды топоI специфически взаимодействуют с промежуточным ДНК-ферментным комплексом. Их единственной мишенью является топоI, поэтому применение этих агентов целесообразно в тех клеточных линиях, где концентрация и активность этого фермента велика. Это определяет различия в терапевтических действиях двух классов противоопухолевых соединений.

Структура топоI в комплексе с 22-мерным фрагментом ДНК известна. Она определена методом рентгеновской кристаллографии. Чтобы получить кристаллы комплекса, авторы (*Redinbo and Stewart, 1998*) инактивировали фермент путем замены  $\text{Tyr}^{723} \rightarrow \text{Phe}$  (нековалентный комплекс) или введением в разрезаемую фосфодиэфирную цепь фосфотиатной группы, связывающейся с  $\text{Tyr}^{723}$  ковалентно и фиксирующей промежуточный комплекс (ковалентный комплекс). Сформированные таким образом комплексы оказались достаточно устойчивыми для выращивания кристаллов и определения структуры топоI в комплексе с ДНК. Кристаллы свободного фермента до настоящего времени не получены. Как показано в настоящей работе методом атомно-силовой микроскопии, это вероятно, обусловлено высокой относительной подвижностью двух структурных частей фермента в не связанном с ДНК состоянии. То есть детали структурных изменений в процессе взаимодействия топоI с ДНК неясны. Эту информацию можно получить только в условиях, при которых фермент не теряет своей активности. Поэтому для изучения взаимодействия топоI с ДНК в настоящей работе использованы методы спектроскопии КР, ГКР и кругового дихроизма (КД).

Время записи спектра КР с достаточно высоким отношением сигнал/шум достигает 40 часов. Отсутствие разрушения образца доказано сопоставлением первого и последнего сканов. Тем не менее столь долгое экспонирование образца

может исказить получаемые результаты. Поэтому значительная часть спектров записана с использованием разработанных в настоящей работе ГКР-активных подложек. Время записи при этом сокращается примерно в 10 раз. Во всех случаях корректность использования ГКР проверялась записью контрольных спектров КР.

Анализ спектров КР проводился разностным методом. Для этого из спектра комплекса вычитался спектр, представляющий собой сумму отдельных компонентов. Такой подход позволяет выявить даже небольшие спектральные изменения, вызванные взаимодействием компонентов. Пример получения разностного спектра показан на рис. 5.

Полученные спектральные данные указывают на то, что в результате взаимодействия вторичная структура фермента заметно изменяется (табл. 2).

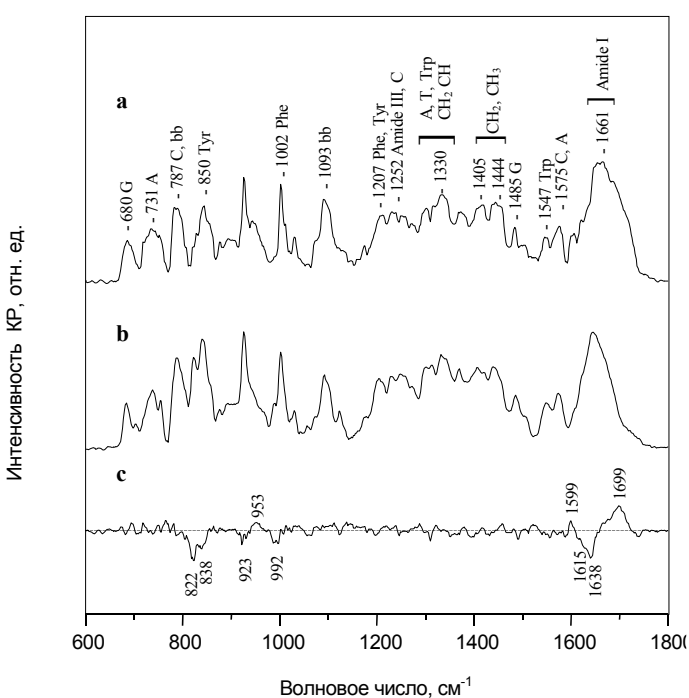
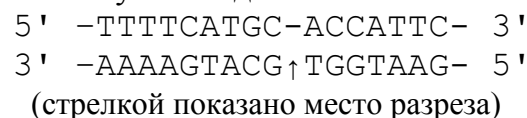


Рис. 5

**а** - Спектр КР 68 кДа комплекса (1:1) ДНК топоизомеразы I человека с олигонуклеотидом:



**б** – Сумма КР спектров компонентов.

**с** – Разностный спектр: "а" минус "б".

Обозначения колебаний атомных групп:  
 - олигонуклеотида: G, T, A, C - нуклеотиды, bb - фосфодиэфирная цепь и  
 - фермента: Phe, Tyr, Trp - остатки аминокислот, Amide I и Amide III - полипептидная цепь.

**Таблица 2.** Вторичная структура рекомбинантной 68 кДа топоI в растворе, в комплексе с олигонуклеотидом и в тройном комплексе топоI/олигонуклеотид/топотекан.

Структура	ТопоI	ТопоI/олиго- нуклеотид	ТопоI/олиго- нуклеотид/топотекан
α-спираль (%)	45±1 (44)	38±1	41±2
β-лист (%)	28±2 (31)	36±2	36±3
Неупорядоченные структуры (%)	27±2 (25)	26±2	23±3

В то же время олигонуклеотид в целом сохраняет В-форму. Существенным структурным изменением ДНК является выход гуанина (основание в положении +1 относительно места разреза) из цепи ДНК в результате атаки фермента. Этот результат представляется важным, поскольку является экспериментальным подтверждением одной из гипотез, выдвинутых для объяснения молекулярного механизма действия камптотецина - ингибитора фермента. Обнаруженные структурные изменения происходят в отсутствие камптотецина, достаточным является лишь наличие гуанина в положении +1 (камптотецин-специфичный сайт). Формирование тройного комплекса с участием производного камптотецина - топотекана не приводит к структурным перестройкам фермента (табл. 2). Таким образом, в физиологических условиях полость, в которую встраивается молекула камптотецина (или его аналога), формируется уже на этапе взаимодействия топоI - ДНК. Но собственно камптотецин-специфичный сайт активизируется лишь в присутствии камптотецина или его аналогов.

#### **Глава 4. Методы оптической спектроскопии в исследовании молекулярных механизмов действия топотекана - типичного яда ДНК топоизомеразы I**

Камптотецин (camptothecin, СРТ) относится к классу соединений, фиксирующих промежуточный ДНК-топоI комплекс и тем самым ингибирующих действие фермента (рис.6). Препятствием на пути клинического использования СРТ является его низкая растворимость, поэтому до сих пор не прекращаются поиски его водорастворимых аналогов. Некоторые из них, в частности топотекан (topotecan, ТРТ), показали хорошие клинические характеристики. В то же время, молекулярные механизмы действия соединений этого класса оставались до последнего времени во многом неясными.

В данной части работы на основе использования спектроскопии КР и ГКР разработан метод определения участия молекулярных групп ТРТ в межмолекулярных взаимодействиях. Соответственно полученным данным предложена модель взаимодействия ТРТ с ДНК. Разработан метод определения степени гидролиза лактонного кольца молекулы как в свободном состоянии, так и в комплексе с ДНК, что является одним из ключевых моментов, так как позволяет оценить содержание активной формы молекулы ТРТ.

Молекула ТРТ представляет собой сопряженную хромофорную систему, в которой  $\pi$ -электроны, обуславливающие длинноволновый переход, распределены по всей системе колец, поэтому основной вклад в спектр КР дают колебания практически всех атомов кольцевой системы (рис. 6В). Боковые группы, не включенные в сопряженную систему хромофора, вклада в спектр КР не дают, что подтверждается сопоставлением спектров ряда аналогов СРТ, различающихся боковыми группами. Однако структура и состояние боковых групп влияют на положение и интенсивность основных спектральных линий. Задача, таким образом, сводится к определению спектральных линий, чувствительных к изменениям в боковых группах, связанных с их участием во взаимодействиях. Для решения этой задачи должны быть определены силовые постоянные молекулы ТРТ, то есть необходимо было решить обратную спектральную задачу.

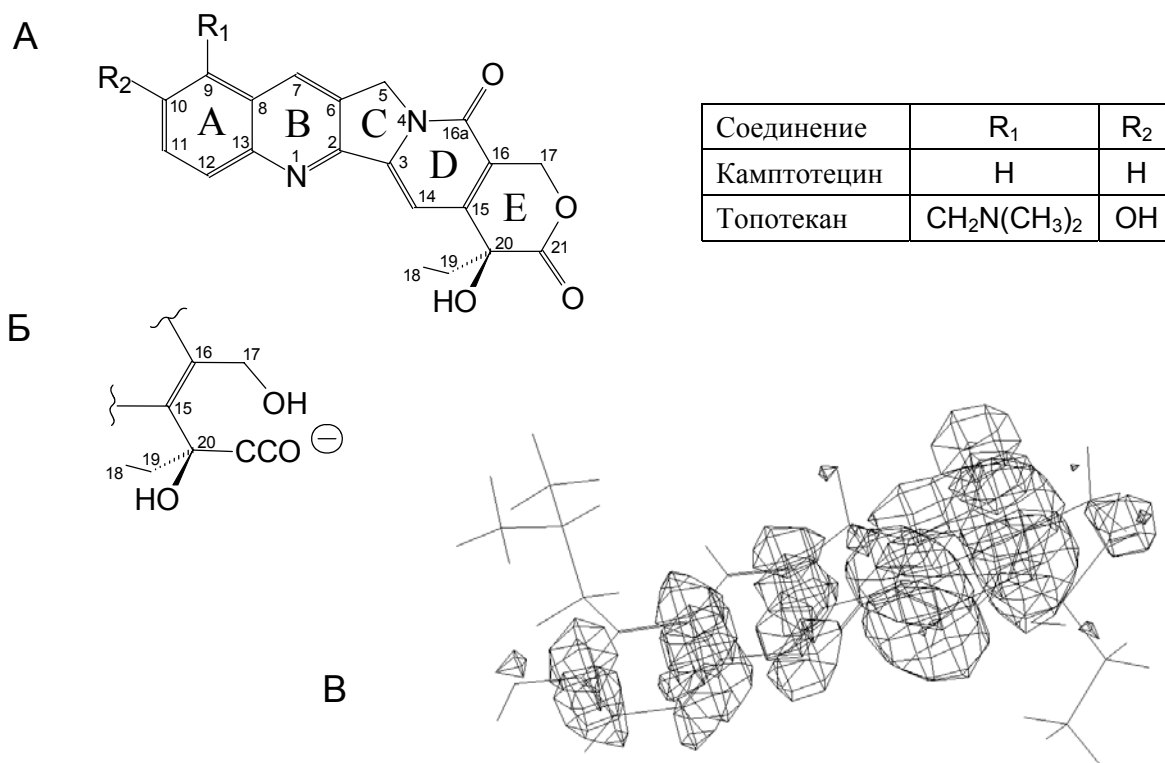


Рис. 6. Химическая структура молекул камптотецина и топотекана в закрытой (А) и в открытой (Б) формах. Пространственная структура и распределение плотности  $\pi$ -электронов верхнего заполненного уровня молекулы ТРТ в лактонной форме (В). Для расчетов использован метод AM1.

Особенность ее решения в данной работе – использование различных ионных состояний ТРТ. Поэтому первым этапом решения было определение структуры ионов ТРТ в разных условиях. Для этого сопоставлены данные спектроскопии поглощения ТРТ при различных рН и результаты расчетов электронных уровней этой молекулы (табл. 3). В итоге получена детальная информация об изменении ионного состояния молекулы ТРТ в зависимости от рН раствора.

**Таблица 3.** Сопоставление расчетных и экспериментальных данных по положению длинноволновых полос поглощения молекулы ТРТ в зависимости от рН раствора.

№	Ионное состояние молекулы ТРТ	Положение длинноволновых полос поглощения, нм	
		Расчет*	Эксперимент**
1	Протонированы атомы азота диметиламинометиленовой группы и N-1*** и атом кислорода при C-16a. Заряд молекулы Q = +3.	388	420
		257	267
2	Протонированы атом азота диметиламинометиленовой группы и атом кислорода при C-16a. Заряд молекулы Q = +2 .	348	380
		313	327
3	Протонирован атом азота диметиламинометиленовой группы. Заряд молекулы Q = +1 .	352	382
		301	327
4	Протонирован атом азота диметиламинометиленовой группы. Депротонирована гидроксильная группа при C-10. Заряд Q = 0.	420	412
		351	340
5	Депротонирована гидроксильная группа при C-10. Молекула находится в карбоксилатной форме. Заряд молекулы Q = -2 .	435	421
		352	345

\*Расчеты выполнены по методу INDO/S без учета влияния растворителя. Рассматривались 19 заполненных и 19 свободных орбиталей. Общее число конфигураций 723.

\*\*Измерения выполнены при концентрации [ТРТ] = 10<sup>-6</sup> М.

\*\*\*Нумерация атомов молекулы ТРТ дана на рис.6.

Спектры КР молекулы, находящейся в различных ионных состояниях, а также спектры дейтерированных и агрегированных форм ТРТ составили массив экспериментальных данных для решения обратной спектральной задачи. Математически ее решением был поиск минимума функционала:

$$F = \frac{1}{N_e} \sum_i^{N_e} \left( \frac{x_e^{(i)} - x_t^{(i)}}{2\delta x_e^{(i)}} \right)^2 + P, \quad (6)$$

Где  $N_e$  число уточняемых параметров, совпадающее с числом экспериментальных данных);  $x_e^{(k)}$  и  $x_t^{(k)}$  сравниваемые характеристики экспериментального и теоретического спектров (положения максимумов полос);  $\delta$  – параметр погрешности вычисления;  $P$  – штрафная функция:

$$P = \sum_i \alpha [(\chi_i - \chi_{i0})/\Delta\chi_i]^2 + \sum_i \beta [(\chi_i - \chi_{i0})/\Delta\chi_i]^{10}, \quad (7)$$

здесь  $\chi_i$  - параметры, варьируемые при решении обратной спектральной задачи (силовые постоянные).

Далее, путем вариации параметров молекулярных групп - вероятных участников межмолекулярных взаимодействий (варьировались массы атомов боковых групп и/или длины и силовые постоянные некоторых связей в боковых группах), выявлены спектральные линии, положение которых изменяется в результате изменений в боковых группах. То есть определены спектральные признаки участия конкретных фрагментов ТРТ в межмолекулярных взаимодействиях и структурных изменений молекулы, индуцированных этими взаимодействиями.

В результате показано, что лактон-карбоксилатный переход молекулы может быть зарегистрирован по смещению линии  $1437 \text{ см}^{-1}$  к положению  $1424 \text{ см}^{-1}$  (рис. 7). Для наиболее важной лактонной формы молекулы, активной биологически, низкочастотное смещение линий около  $1563$  и  $1623 \text{ см}^{-1}$  указывает на участие во взаимодействии гидроксильной группы при атоме углерода С-20, а смещение положения Ферми-резонансного дублета  $1652/1660 \text{ см}^{-1}$  - на образование

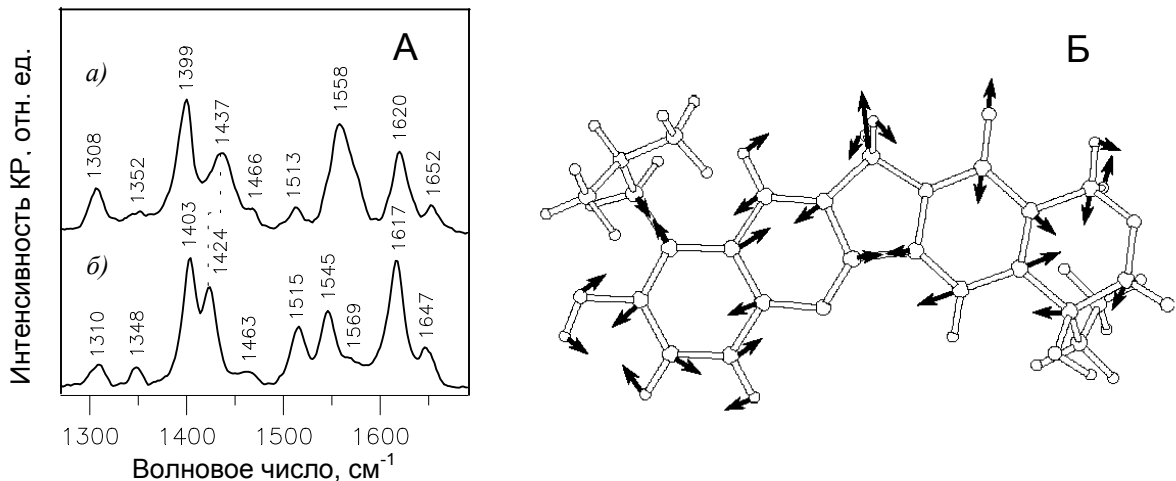


Рис. 7. Спектры КР лактонной и карбоксилатной форм ТРТ (А). Вид нормальных колебаний (Б), соответствующих линии КР, чувствительной к лактон-карбоксилатному переходу ( $1437/1424 \text{ см}^{-1}$ ).

водородной связи с участием карбонильного кислорода лактонного кольца. Изменение положения линии около  $1308 \text{ см}^{-1}$  говорит об участии во взаимодействии

гидроксильных групп как при С-20, так и при С-10. При этом депротонирование гидроксила при С-10 регистрируется по изменению спектра поглощения ТРТ.

Зависимость рК депротонирования гидроксила при С-10 от концентрации ТРТ свидетельствует о формировании димерной формы ТРТ. При этом в формировании димеров участвует атом водорода гидроксильной группы при С-10. Представляется наиболее вероятным, что в формировании водородных связей участвует атом азота N-1, поскольку расчеты показывают, что вблизи этого атома локализована область отрицательного потенциала (рис. 8). Это позволяет предположить, что димеры стабилизируются двумя водородными связями, образующимися между гидроксильной группой при С-10 одной из молекул димера и атомом азота N-1 другой (рис. 8). Структура димера поддерживается также стекингвым взаимодействием колец А молекул ТРТ. Существенно меньшее перекрытие кольцевых систем молекул ТРТ по сравнению с молекулами СРТ (согласно рентгеноструктурным данным при агрегировании СРТ перекрываются кольца А-D) обуславливает существенно меньший сигнал кругового дихроизма ТРТ по сравнению с СРТ.

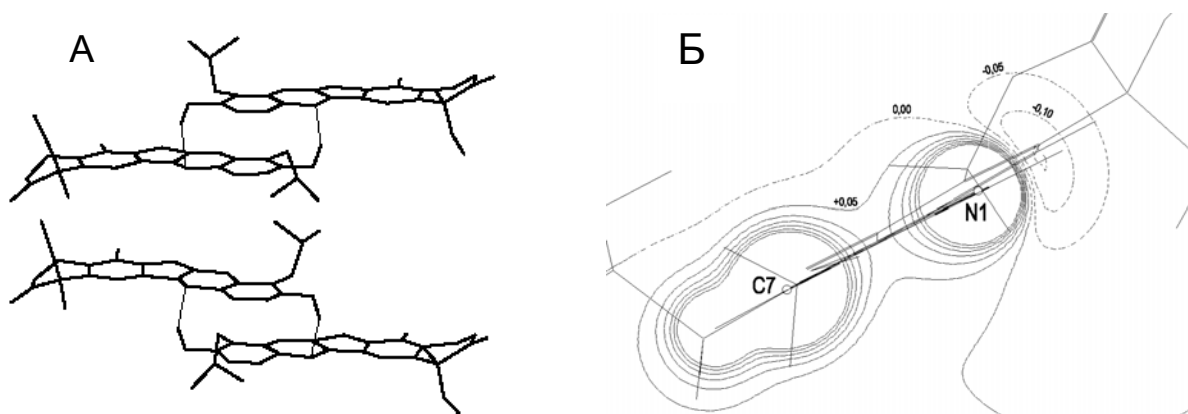


Рис. 8. Структуры двух наиболее вероятных конформаций димеров (А). Тонкими линиями показаны водородные связи между атомами N-1 одной молекулы и гидроксильными группами при С-10 другой.

Распределение электростатического потенциала (Б) в плоскости, перпендикулярной плоскости кольцевой системы молекулы и проходящей через атомы С-7 и N-1. Значения потенциала даны в  $\text{\AA}^{-1}$ .

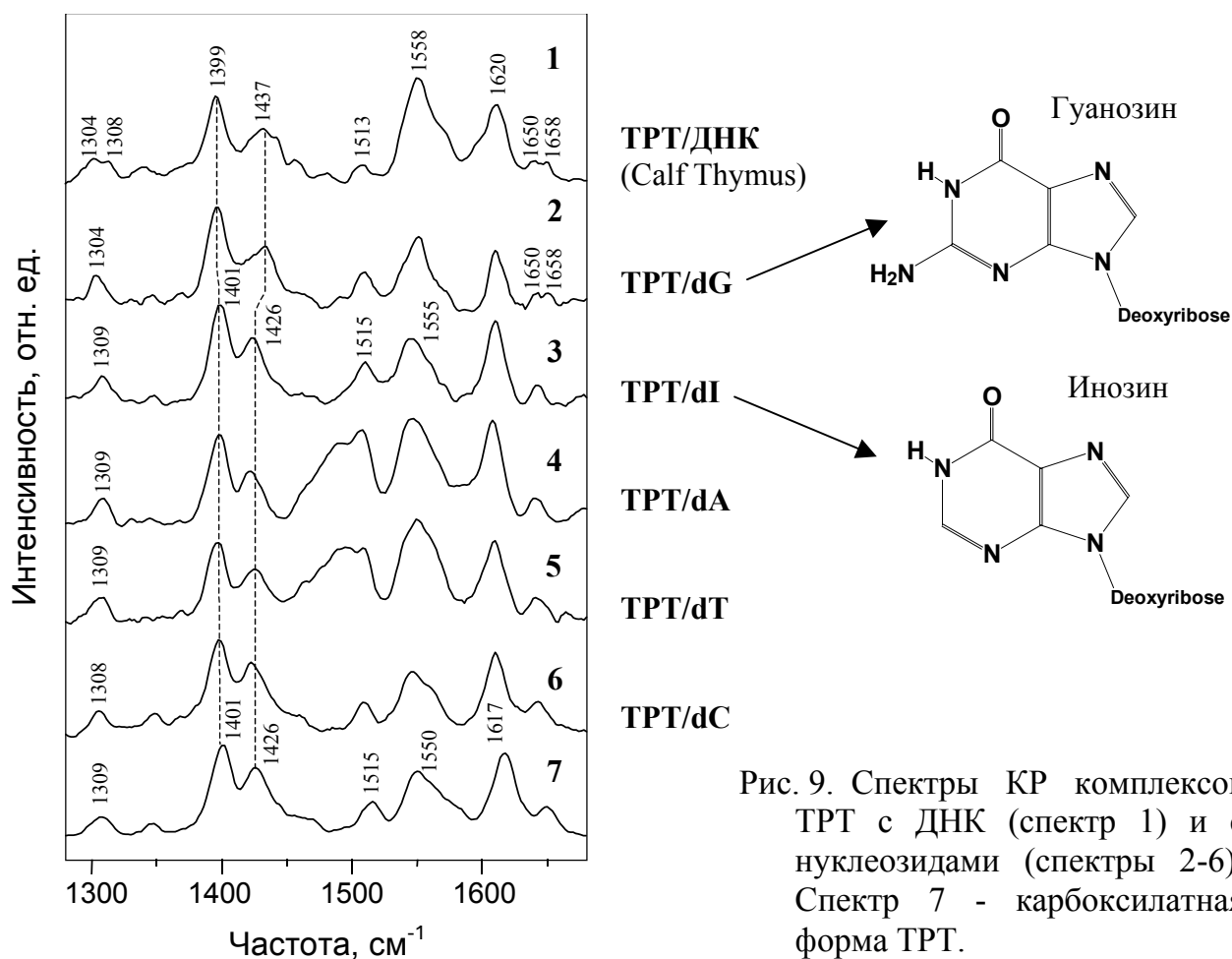


Рис. 9. Спектры КР комплексов ТРТ с ДНК (спектр 1) и с нуклеозидами (спектры 2-6). Спектр 7 - карбоксилатная форма ТРТ.

Использование спектроскопии КР позволило показать, что взаимодействие ТРТ с ДНК стабилизирует лактонную форму молекулы. При сопоставлении спектров КР комплексов ДНК/ТРТ и нуклеозид/ТРТ (исследовались взаимодействия ТРТ с дезоксинуклеозидами dA, dC, dG, dT и dI) обнаружено, что эффект стабилизации лактонной формы наблюдается только при взаимодействии ТРТ с dG (рис.9). Важно, что ближайший аналог гуанина – инозин, отличающийся лишь отсутствием аминогруппы N-2, такого эффекта не дает. То есть можно полагать, что доминирующую роль во взаимодействии ТРТ/ДНК играет гуанин, причем взаимодействие идет с участием аминогруппы N-2 гуанина, локализованной в малой бороздке ДНК. Следовательно, молекулы ТРТ локализуются в малой бороздке ДНК.



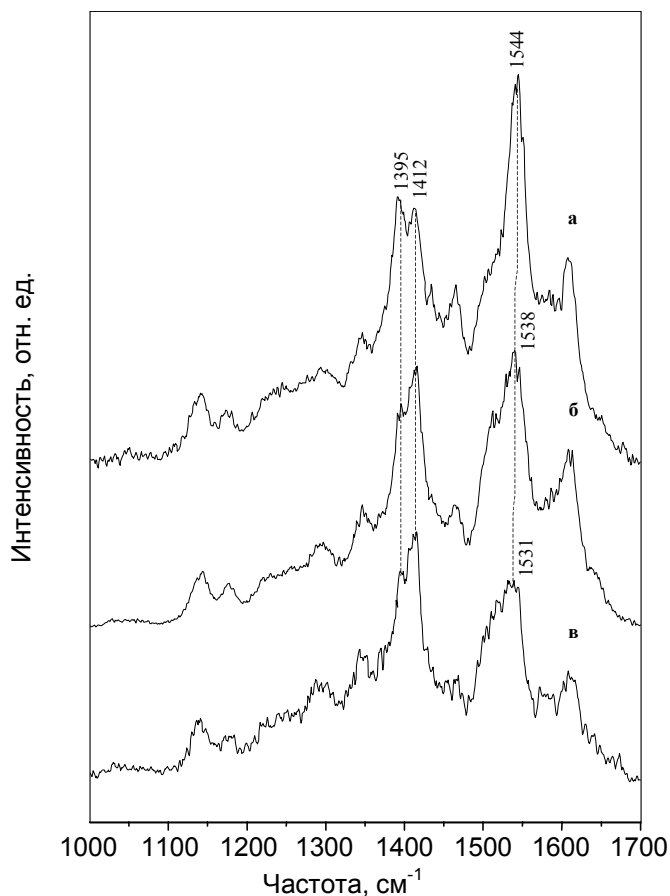
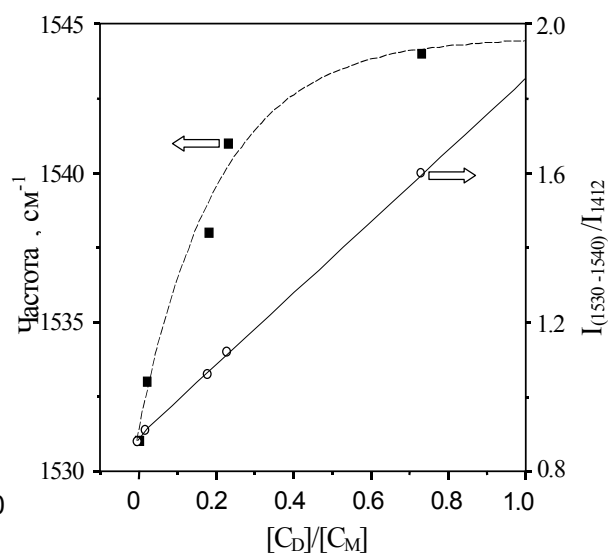


Рис. 10. Спектр ГКР водного раствора ТРТ (слева):  $[ТРТ] = 5 \cdot 10^{-4}$  М (а);  $5 \cdot 10^{-5}$  М (б) и  $5 \cdot 10^{-6}$  М (в);

Отношение интенсивностей полос  $1540$  и  $1412$   $\text{см}^{-1}$  (правая ось) и положение пика около  $1540$   $\text{см}^{-1}$  (левая ось) в зависимости от относительных содержаний в растворе димеров и мономеров  $C_D/C_M$ .



Обнаружено, что вид спектров ГКР зависит от степени димеризации ТРТ, причем изменяются как положения линий, так и их относительная интенсивность (рис.10). Использование найденных спектральных признаков дает возможность оценивать содержание димеров ТРТ как в растворе, так и в связанном состоянии. В результате по данным спектроскопии ГКР было установлено, что связывание с ДНК индуцирует димеризацию ТРТ. Модель димеров, несущих на противоположных концах молекулярные группы (рис. 8), способные взаимодействовать с ДНК, и обнаруженный эффект димеризации ТРТ, индуцированной связыванием с ДНК, позволили объяснить известные данные по способности ТРТ связывать отдаленные фрагменты ДНК и предложить молекулярную модель комплексов вида ДНК-ТРТ-ТРТ-ДНК.

## **Глава 5. Молекулярные детерминанты, определяющие функции соединений - супрессоров фермента. Производные нетропсина - бис-нетропсины**

Нетропсин (Нт) и его производные являются соединениями, нековалентно связывающимися с ДНК в ее малой бороздке. Эти соединения способны ингибировать целый ряд взаимодействующих с ДНК ферментов, однако противоопухолевый эффект Нт невелик. Это определяет необходимость поиска его новых, более эффективных производных. В настоящей работе методами спектроскопии КР и ГКР и сопоставлением полученных результатов с биохимическими данными исследован ряд производных Нт - бис-нетропсинов (бис-Нт), представляющих собой две молекулы Нт, связанные гибким спейсером (рис. 11). Эти соединения обладают существенно большей специфичностью связывания с ДНК и показывают бóльшую биологическую активность в отношении ингибирования действия топоизомеразы.

Для оценки структурных особенностей комплексов бис-Нт с ДНК была использована спектроскопия ГКР с усиливающей ГКР-активной системой "серебряный цитратный золь". Обнаружено, что спектры ГКР очень сходны со спектрами КР этих соединений. Это означает, что усиление на этой ГКР-активной системе определяется преимущественно электромагнитным механизмом. В то же время относительная интенсивность некоторых спектральных линий заметно больше, чем относительная интенсивность аналогичных линий в спектрах КР. Теоретический анализ колебательной структуры этих соединений показал, что усиленные линии чувствительны к взаимодействиям указанных молекул, в которых участвуют атомы водорода пиррольных колец. Кроме того, все усиленные линии относятся к плоскостным колебаниям молекул. Таким образом, показано, что бис-Нт взаимодействуют с ГКР-активной системой со стороны пиррольных колец, причем плоскость молекулы ориентирована перпендикулярно ГКР-активной поверхности.

Анализ спектральных изменений, вызванных взаимодействием с ДНК, показал, что, как и в случае Нт, молекулы бис-Нт удерживаются в малой бороздке ДНК водородными связями между атомами азота амидных групп бис-Нт и атомами N-3 и O-2 тимина и аденина ДНК соответственно. Наиболее важным для связывания оказалась комплементарность структуры конкретного бис-Нт и соответствующего участка олигонуклеотидной последовательности ДНК. Структурные изменения

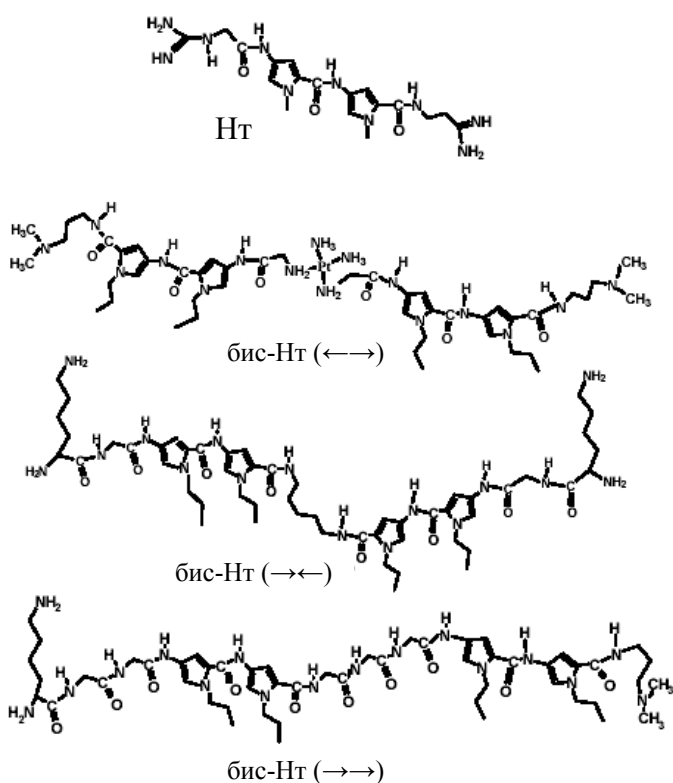
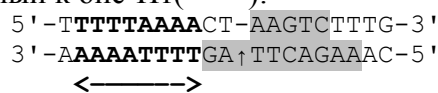


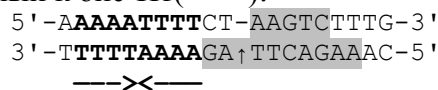
Рис. 11. Структура нетропсина (Ht) и бис-нетропсина (бис-Ht).

Структуры олигонуклеотидов, содержащих сайт связывания с топоI (выделен серым) и участок последовательности, специфичной для каждого из бис-Ht (выделен жирным шрифтом). Идентичные фрагменты были введены в плазмидную ДНК при исследовании ингибирующей активности бис-Ht.

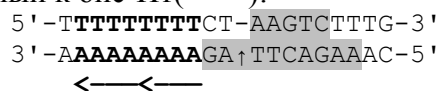
Олигонуклеотид (ОЛИГ-1), специфичный к бис-Ht(←→):



Олигонуклеотид (ОЛИГ-2), специфичный к бис-Ht(→←):



Олигонуклеотид (ОЛИГ-3), специфичный к бис-Ht(→→):



бис-Ht проявляются в основном в изменении торсионных углов амидных групп, связывающих пиррольные элементы бис-Ht (спектральные проявления – изменения положений спектральных линий Amide I и Amide III). Наиболее существенным, с точки зрения изменения структуры ДНК, являются изменения конформации фуранозного кольца фосфодиэфирной цепи, связанного с гуанином: показано, что в результате связывания бис-Ht кольцо реорганизуется от конформации *C2'-endo/anti* к конформации *C1'-exo/anti* (спектральные маркеры – относительные интенсивности линий в дублетах  $I_{680}/I_{670}$  и  $I_{1333}/I_{1340}$ ). В случае специфического связывания искажения структур бис-Ht и ДНК минимальны, но они существенно возрастают в случаях неспецифического связывания (табл. 4).

Сопоставление этих результатов с данными, полученными биохимически (табл. 4), показывает, что степень структурных изменений, индуцированных взаимодействием с бис-Ht, коррелирует с ингибирующей активностью последнего в отношении действия топоI. Следует особо отметить, что искажения структуры ДНК

**Таблица 4.** Сопоставление изменений относительных интенсивностей линий в дублетах 680/670 см<sup>-1</sup> и 1333/1340 см<sup>-1</sup> в КР спектрах комплексов олигонуклеотид/бис-Нт и изменения эффективности щепления ДНК ферментом топоI в результате связывания с бис-Нт.

	бис-Нт(←→)	бис-Нт(→←)	бис-Нт(→→)	В отсутствие бис-Нт
ОЛИГ-1				
<i>I</i> <sub>680</sub> / <i>I</i> <sub>670</sub> *	<b>0,17***</b>	0,33	0,10	0,09
<i>I</i> <sub>1333</sub> / <i>I</i> <sub>1340</sub>	<b>0,20</b>	0,30	0,12	0,09
D/D <sub>0</sub> **	<b>0,56</b>	0,37	0,84	1,00
ОЛИГ-2				
<i>I</i> <sub>680</sub> / <i>I</i> <sub>670</sub>	0,35	<b>0,18</b>	0,11	0,10
<i>I</i> <sub>1333</sub> / <i>I</i> <sub>1340</sub>	0,32	<b>0,19</b>	0,12	0,10
D/D <sub>0</sub>	0,27	<b>0,65</b>	0,89	1,00
ОЛИГ-3				
<i>I</i> <sub>680</sub> / <i>I</i> <sub>670</sub>	0,39	0,32	<b>0,18</b>	0,16
<i>I</i> <sub>1333</sub> / <i>I</i> <sub>1340</sub>	0,40	0,25	<b>0,22</b>	0,20
D/D <sub>0</sub>	0,48	0,75	<b>1,00</b>	1,00

\*Линии 680 и 1333 см<sup>-1</sup> относятся к колебаниям фуранозного кольца в конформации C2'-*endo/anti*, связанного с гуанином; линия 670 см<sup>-1</sup> - колебания фуранозных колец: C1'-*exo/anti* гуанина и C2'-*endo/anti* тимина; линия 1340 см<sup>-1</sup> - колебания фуранозного кольца C1'-*exo/anti* гуанина плюс колебания аденина (1342 см<sup>-1</sup>).

\*\*D/D<sub>0</sub> – величина, обратная эффективности ингибирования действия топоI: D - содержание фрагмента ДНК, расщепленного в сайте с соответствующей последовательностью в присутствии бис-Нт, D<sub>0</sub> - то же в отсутствие бис-Нт.

\*\*\*Жирным выделены специфичные пары.

наблюдаются не только в области связывания бис-Нт с ДНК, но и вблизи нее: гуанин находится вне пределов области, покрываемой бис-Нт (рис. 11). А поскольку эта область является областью взаимодействия фермента с ДНК, полученный результат – прямое доказательство доминирующей роли геометрического фактора в процессе ингибирования топоI.

## Глава 6. Конструирование соединений, сочетающих функции супрессоров и ядов топоизомеразы I. Конъюгат нетропсин-каптотецин: структура и свойства

Две основные причины ограничивают клиническое применение соединений из группы СРТ: (1) в физиологических условиях значительная доля этих соединений находится в неактивной карбоксилатной форме, и (2) нестабильность промежуточного комплекса обуславливает необходимость поддерживать высокую концентрацию лекарства и, следовательно, требует долговременной обработки

опухолевых тканей. В то же время супрессоры образуют прочные комплексы с ДНК. Кроме того, как показано в настоящей работе, присутствие типичного супрессора Нт определенным образом модулирует ингибирующее действие соединений из класса СРТ. Анализ полученных результатов по взаимодействию супрессоров и ядов топоI с ДНК и ферментом позволил сформулировать принципы конструирования гибридных соединений, объединяющих достоинства супрессоров и ядов топоI.

- (1) Геометрия по крайней мере одной из возможных конформаций гибридной молекулы должна позволять ей встраиваться в малую бороздку ДНК на участке с определенной последовательностью и реализовывать таким образом функцию супрессора фермента.
- (2) Фрагменты молекулы должны иметь возможность взаимодействовать между собой, образуя замкнутую форму. При этом активные группы супрессорной части молекулы должны быть экранированы и их взаимодействие с ДНК затруднено.

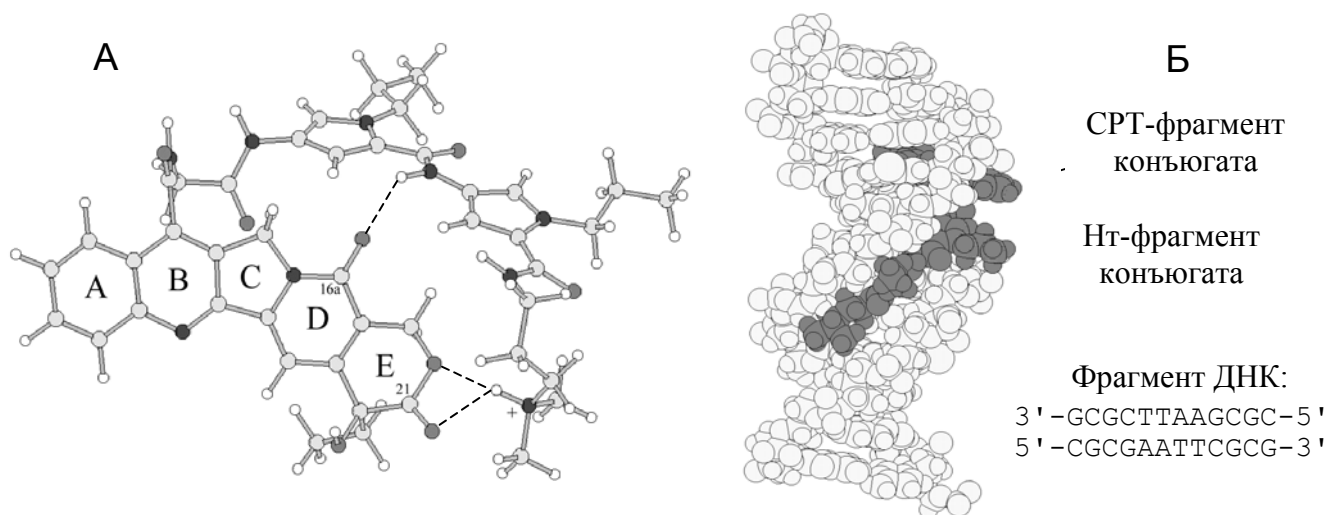


Рис. 12. Структура молекулы конъюгата СРТ-Нт (А). Пунктиром показаны водородные связи. Расчет по методу АМ1.

Структура комплекса конъюгата СРТ-Нт с ДНК (Б). Конъюгат (показан темным) встраивается в малую бороздку ДНК (показана светлым) на участке: 3'-ТТААГ-5'.

(3) В формировании замкнутой формы должно участвовать лактонное кольцо СРТ-фрагмента гибридной молекулы так, чтобы за счет изменения физико-химических свойств время сохранения биологически активной лактонной формы гибридного соединения было увеличено.

(4) Так как встраивание производных СРТ в ДНК-ферментный комплекс опосредуется через лактонную часть молекулы, супрессорный фрагмент должен быть присоединен к хинолиновой части СРТ-фрагмента.

Пример соединения, в котором реализованы сформулированные принципы, представлен на рис. 12.

Изменение концентрации закрытой (лактонной) формы соединения определяется уравнением:

$$\frac{dc_{close}(t)}{dt} = k_{close} \cdot c_{open}(t) - k_{open} \cdot c_{close}(t) \quad (8)$$

где  $k_{open}$  и  $k_{close}$  - скорости прямой (открытие лактонного кольца) и обратной (его закрытие) реакций;  $c_{open}$  и  $c_{close}$  - концентрации открытой и закрытой форм соединения. Решая уравнение (8) получим зависимость концентрации закрытой (лактонной) формы соединения от времени определяется выражением:

$$c_{close}(t) = \frac{1}{K_{eq} + 1} (K_{eq} e^{-kt} + 1), \quad (9)$$

здесь  $k = k_{open} + k_{close}$ , сумма скоростей прямой и обратной реакций, а  $K_{eq} = k_{open}/k_{close}$  - отношение этих скоростей. Значение  $K_{eq}$  отражает соотношение концентраций закрытой и открытой форм соединения в равновесном состоянии, а  $k$  - скорость прихода к этому состоянию.

Экспериментально для определения отношения концентраций закрытой и открытой форм использовалась флуоресцентная спектроскопия. Было обнаружено, что спектры флуоресценции двух форм нового соединения существенно отличаются между собой. Это позволило определить отношение  $c_{close}/c$  (или  $c_{open}/c$ ) разложением зависимости интенсивности флуоресценции от длины волны  $F(\lambda)$  на функции  $F_{close}(\lambda)$  и  $F_{open}(\lambda)$ , соответствующие спектрам флуоресценции закрытой и открытой формам конъюгата:

$$F(\lambda) = c_{close} \cdot F_{close}(\lambda) + c_{open} \cdot F_{open}(\lambda), \quad (10)$$

где  $c = c_{close} + c_{open}$ .

В результате показано, что значение  $K_{eq}$  для конъюгата мало отличается от  $K_{eq}$  для других производных СРТ. Однако, с прикладной точки зрения, более важным является параметр  $k$ . В результате внутримолекулярных взаимодействий гидролиз конъюгата идет существенно медленнее (рис.13) по сравнению с другими производными СРТ (для конъюгата  $t_{1/2} \approx 10$  часов, против  $t_{1/2} = 20-40$  минут для других производных СРТ). Таким образом, новое соединение существенно дольше сохраняет биологически активную форму.

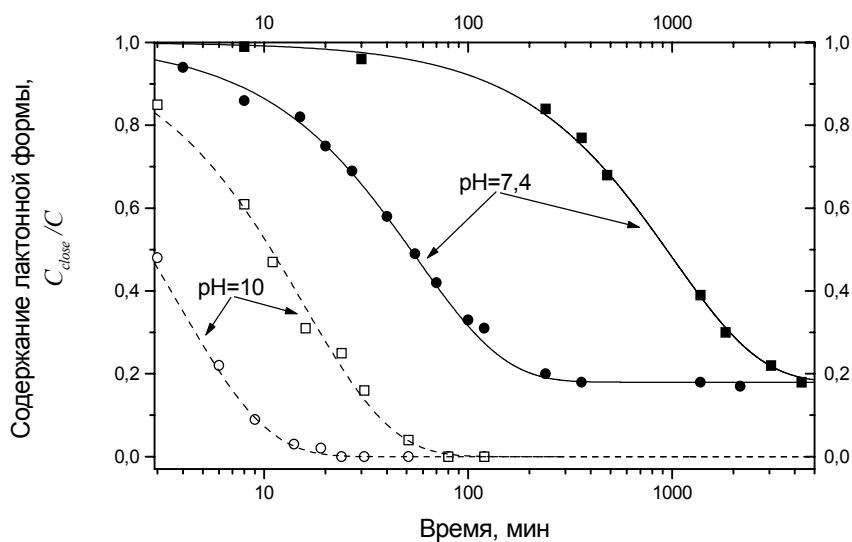


Рис. 13. Изменение во времени содержания лактонной формы СРТ (○ и ●) и конъюгата СРТ-Нт (□ и ■) в физиологических условиях (фосфатно-солевой буфер, PBS, pH=7,4) - сплошная линия (● и ■) и в щелочных условиях при pH=10 - пунктир (○ и □).

### ***Влияние конъюгата СРТ-Нт на каталитическую активность топоI***

Использовались модельные ДНК-субстраты, содержащие сайты, узнаваемые ферментом (СРТ-независимые сайты), последовательности специфического связывания производных нетропсина и СРТ-зависимые сайты (щепление в которых индуцируется присутствием СРТ).

Показано, что конъюгат в случае его высокой концентрации подавляет щепление в СРТ-независимых сайтах, но дает эффект усиления щепления в СРТ-зависимых. Уменьшение концентрации конъюгата ведет к исчезновению эффекта усиления щепления в СРТ-зависимых сайтах. Но щепление в СРТ-независимых сайтах

продолжает подавляться. Эти результаты показывают, что СРТ- и Нт-фрагменты гибридной молекулы сохраняют свои функциональные способности модулировать щепление ДНК ферментом.

### ***Цитотоксичность конъюгата СРТ-Нт***

Цитотоксичность СРТ-Нт определялась по шести линиям опухолевых клеток. По четырем из них конъюгат показал значения  $IC_{50}$ , сопоставимые со значениями  $IC_{50}$ , определенными по СРТ. Значение  $IC_{50}$  конъюгата против клеток CaOV3 (аденокарцинома яичников) оказалось ниже, чем у СРТ, что демонстрирует более высокую активность конъюгата (примерно в 5 раз по сравнению с СРТ). Это означает, что новое соединение обладает потенциальными возможностями противоопухолевого лекарственного соединения.

## **Выводы**

(1) Разработан комплексный подход к изучению молекулярных механизмов действия ингибиторов человеческой ДНК топоизомеразы I, основанный на совместном применении спектроскопии поглощения, флуоресценции, кругового и линейного дихроизма, КР и ГКР в сопоставлении с методами расчета структуры, электронных и колебательных параметров биологических молекул и с биохимическими данными. Возможности подхода продемонстрированы на примерах типичных супрессоров топоI (бис-нетропсина) и яда топоI - клинически важного соединения из семейства камптотецина - топотекана (ТРТ).

(2) Исследованы молекулярные механизмы действия супрессоров топоI. Обнаружено, что взаимодействие с бис-нетропсинами индуцирует структурные изменения ДНК вне участка взаимодействия лиганд-ДНК, но на участке связывания ДНК-фермент. Показано, что структурные изменения, индуцируемые связыванием лиганда на участке ДНК-белкового взаимодействия, коррелируют с биологической активностью лиганда.



(3) На примере производного камптотецина - топотекана исследованы молекулярные механизмы действия соединений - ядов топоI. Предложена методика отнесения полос в спектрах КР, основанная на использовании разных ионных состояний молекулы ТРТ и расчетных данных. Выявлены спектральные признаки участия во взаимодействиях отдельных фрагментов молекулы ТРТ, определена структура димеров ТРТ в растворе и комплексов ТРТ с ДНК. Предложена методика оценки степени димеризации ТРТ, основанная на сопоставлении данных флуоресценции и ГКР. Показано, что связывание с ДНК индуцирует димеризацию лиганда. На основе данных оптической спектроскопии предложена молекулярная модель взаимодействия ТРТ с ДНК, согласно которой, димеры ТРТ связывают две и более молекулы ДНК.

(4) Предложен подход к конструированию соединений, объединяющих достоинства супрессоров и ядов топоI. Синтезировано новое соединение - конъюгат нетропсина с камптотецином, обладающее высокой стабильностью лактонной формы. Показано, что соединение обладает свойствами как супрессора, так и яда топоI и эффективно в клеточной линии CaOV3 (аденокарцинома яичников).

(5) Исследованы нелинейно-оптические свойства нового класса ГКР-активных поверхностей, формируемых по технологии трековых мембран (острый структуры и системы полых микротрубок). На основе данных, полученных методами генерации гигантской второй гармоники оптического излучения, комбинационного рассеяния и определения линейных оптических свойств этих новых структурированных поверхностей, выявлены основные закономерности, связывающие оптические свойства данных поверхностей, геометрические характеристики поверхностных неоднородностей и параметры материала поверхностей. Показана возможность формирования структур с заданными оптическими свойствами. Показано, что основную роль в усилении эффекта КР на этих поверхностях играет дальнедействующий электромагнитный механизм. Использование разработанных ГКР-активных систем позволяет записывать спектры ГКР пикограммовых количеств биологических макромолекул.

## Список основных публикаций автора по теме диссертации

1. Апель П.Ю., Мchedlishvili Б.В., Петухов А.В., **Олейников В.А.**, Покровская З.Д. Применение мембран в качестве матриц для изготовления поверхности специальной формы термическим распылением металлов.- Тезисы докл. **XIII Всесоюзной конф. по электронной микроскопии**. М., с.548-549, 1987.
2. Куделина И.А., Мурзина Т.В., Мchedlishvili Б.В., **Олейников В.А.**, Петухов А.В., Соколов К.В. Резонансы локализованных плазмонов полых металлических цилиндров в гигантском комбинационном рассеянии и генерации гигантской второй гармоники.- **Поверхность. Физика, химия, механика**. No. 10, с.75-80, 1991.
3. Мchedlishvili Б.В., Березкин В.В., Васильев А.Б., **Олейников В.А.** Ядерные фильтры и структуры на их основе.- В кн.: "**Физическая кристаллография**", М., Наука, с.43-58, 366 С, 1992.
4. Виленский А.И., **Олейников В.А.**, Мchedlishvili Б.В., Васильев А.Б., Апель П.Ю. Структурные изменения в полиэтилентерефталате при производстве ядерных мембран.- **Химия высоких энергий**. Т.26, No.1, с.59-62, 1992.
5. Виленский А.И., **Олейников В.А.**, Мchedlishvili Б.В. Исследование структуры треков ионов Хе в полиэтилентерефталате.- **Химия высоких энергий**. Т.26, No.4, с.12-16, 1992.
6. Ермушев А.В., Мchedlishvili Б.В., **Олейников В.А.**, Петухов А.В. Поверхностное усиление локальных световых полей и эффект "громоотвода". - **Квантовая электроника**. Т. 20, № 5, с. 503-509, 1993.
7. Mchedlishvili B.V., Beryozkin V.V., **Oleinikov V.A.**, Vilensky A.I., Vasilyev A.B. Structure, physical and chemical properties and applications of nuclear filters as new class of membranes.- **Journal of Membrane Science**. V. 79, p. 285-304, 1993.
8. **Олейников В.А.**, Соколов К.В., Набиев И.Р. Микроанализ веществ методом спектроскопии ГКР с использованием технологии трековых мембран. - **Журн. прикл. спектроскопии**. Т. 59, № 5-6, с. 458-464, 1993.
9. **Oleinikov V.A.**, Nabiev I.R., Sokolov K.V., Ozga P., Manfait M. Practical substrates and techniques for analytical testing, identification and structural studies of biological, biomedical and related organic molecules by surface-enhanced Raman spectroscopy.- **In: Spectroscopy of Biological Molecules**, ed. by T.Theophanides, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 393-394, 1994.
10. Виленский А.И., **Олейников В.А.**, Купцова И.В., Марков Н.Г., Мchedlishvili Б.В., Гусинский Г.М. Треки высокоэнергетичных ионов в полиимиде: I. Свойства полиимида, облученного высокоэнергетичными ионами .- **Химия высоких энергий**. Т. 28, № 4, с. 285-289, 1994.
11. Виленский А.И., Марков Н.Г., **Олейников В.А.**, Купцова И.В., Кушин В.В., Блинов В.Ф., Загорский Д.Л., Донцова Э.П., Мchedlishvili Б.В. Треки высокоэнергетичных ионов в полиимиде: II. Травление треков. Изготовление

- трековых мембран из полиимида. - **Химия высоких энергий**. Т. 28, № 5, с. 359-363, 1994.
12. Виленский А.И., Марков Н.Г., **Олейников В.А.**, Загорский Д.Л., Мchedlishvili Б.В. Треки высокоэнергетичных ионов в полиимиде: III. Исследование процесса травления, структуры треков и формы пор в трековых мембранах из полиимида. - **Химия высоких энергий**. Т. 28, № 6, с. 449-453, 1994.
  13. **Oleinikov V.A.**, Tolmarchyova Yu.V., Berezkin V.V., Vilensky A.I., Mchedlishvili B.V. Polyethyleneterephthalate track membranes with conical pores: etching by water-alcohol alkali solutions. - **Radiation Measurements**, V. 25, No. 1-4, pp. 713-714, 1995.
  14. Денисенко Г.А., Малашкевич Г.Е., **Олейников В.А.**, Войтович А.П., Базылев А.Г., Мchedlishvili Б.В., Стренк В. Влияние металлической поверхности на люминесценцию физсорбированных соединений европия. - **Журн. прикл. спектроскопии**. Т. 62, № 6, с. 130-134, 1995.
  15. Маскевич С.А., Свекло И.Ф., Феофанов А.В., Януль А.И., **Олейников В.А.**, Громов С.П., Федорова О.А., Алфимов М.В., Набиев И.Р., Кивач Л.Н. ГКР-активные субстраты на основе тонких серебряных пленок отожженных при высоких температурах: сравнительное изучение методами атомно-силовой микроскопии и спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния. - **Оптика и спектроскопия**. Т. 81, вып. 1, с. 95-102, 1996.
  16. Feofanov A., Ianoul A., **Oleinikov V.**, Gromov S., Fedorova O., Alfimov M., Nabiev I. Surface-enhanced resonance Raman spectra of photochromic crown ether styryl dyes, their model chromophores and their complexes with Mg<sup>2+</sup>. - **Journ. of Physical Chemistry**. V. 100, No. 6, p. 2154-2160, 1996.
  17. Крюков Е.Ю., Феофанов А. В., **Олейников В. А.**, Верещетин В.В., Зайцев С.Ю., Громов С.П., Федорова О.А., Маскевич С.А., Кивач Л.Н., Зубов В.П., Набиев И. Р., Алфимов М.В. Агрегация и фотоизомеризация амфифильного краун-содержащего стирилового красителя в монослоях на границе раздела фаз. - **Известия АН. Серия химическая.**, № 10, с. 2490-2496, 1996.
  18. Феофанов А.В., **Олейников В.А.**, Тузиков А.Б., Януль А.И., Крюков Е.Ю., Соколов К.В., Бовин Н.В., Набиев И.Р. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния силиконов и их производных. - **Биоорганическая химия**. Т. 22, № 9, с. 706-716, 1996.
  19. Denisenko G., Malashkevich G.E., Tziganova T.V., Galstyan V.G., Voitovich A.P., Pershukovich P.P., Kalosha I.I., Basilev A.G., Mchedlishvili B.V., Streck W. and **Oleinikov V.A.** Influence of Silver Surface Structure on Luminescence Characteristics of Europium Doped Polymer Films. - **Acta Physica Polonica A**. V. 90, No.1, p. 121-126, 1996.
  20. Феофанов А.В., **Олейников В.А.**, Тузиков А.Б., Януль А.И., Крюков Е.Ю., Бовин Н.В., Набиев И.Р. Исследование силирированных неогликоконъюгатов

- методом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния. - **Биоорганическая химия**. Т. 23, № 11, с. 910-918, 1997.
21. **Oleinikov V.**, Feofanov A., Ianoul A., Kryukov E., Shiyani S., Bovin N., Nabiev I. The structure of carbohydrate chains of alpha1-acid glycoprotein. Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy study. - **European Biophys. Journ.**. V. 26. No. 1. p. 30, 1997.
  22. **Oleinikov V.A.**, Kovner M.A., Feofanov A.V., Tarabara V.V., Kryukov E.Yu., Nabiev I. Interpretation of Raman and SERS spectra of alpha-methyl glycoside N-acetylneuraminic acid. - **In the book: Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends**. Eds. P. Carmona, R. Navarro and A. Hernanz. Kluger Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London, p. 281-282, 1997.
  23. **Олейников В.А.**, Феофанов А.В., Шиян С.Д., Тузиков А.Б., Крюков Е.Ю., Януль А.И., Бовин Н.В., Набиев И.Р. Особенности структурной организации углеводных цепей в  $\alpha_1$ -кислом гликопротеине и псевдогликопротеинах по данным спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния, - **Биоорганическая химия**. Т. 24, № 6, с. 412-421, 1998.
  24. **Oleinikov V.**, Kryukov E., Kovner M., Ermishov M., Tuzikov A., Shiyani S., Bovin N., and Nabiev I. Sialylation sensitive bands in the Raman spectra of oligosaccharides and glycoproteins. - **Journ. Molecular Structure**. V. 480-481, p. 475-480, 1999.
  25. **Oleinikov V.A.**, Kovner M.A., Kryukov E.Yu., Kudelina I.A., Shiyani S.D., Bovin N.V., Nabiev I.R. Effect of carbohydrate moiety on the secondary structure of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein. Raman scattering and circular dichroic spectroscopy study. - **In: Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions**, Eds. J. Greve, G.J. Puppels, C. Otto, Kluwer Academic Publisher, p. 335-336, 1999.
  26. Ermishov M., Sukhanova A., Kryukov E., Grokhovsky S., Zhuze A., **Oleinikov V.**, Jardillier J.-C., Nabiev I. Raman and Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy of Bis-Netropsins and Their DNA Complexes. - **Biopolymers: Biospectroscopy**. V. 57, No. 5, p. 272-281, 2000.
  27. **Oleinikov V.**, Mochalov K., Sukhanova A., Ermishev M., Grokhovskiy S., Zhuze A.L., Jardillier J.-C., Nabiev I. Raman Spectroscopy of DNA-Topotecan Complexes. - **Proc. XVIIth Int. Conf. on Raman Spectroscopy**, Beijing, China, p. 1012-1013, 2000.
  28. Streltsov S., Sukhanova A., Mikheikin A., Grokhovsky S., Zhuze A., Kudelina I., Mochalov K., **Oleinikov V.**, Jardillier J.-C. and Nabiev I. Structural basis of topotecan-DNA recognition probed by flow linear dichroism, circular dichroism and Raman spectroscopy. - **Journ. Phys. Chem. B**. V. 105, p. 9643-9652, 2001.
  29. Стрельцов С.А., Гроховский С.Л., Куделина И.А., **Олейников В.А.**, Жузе А.Л. Взаимодействие топотекана - ингибитора ДНК-топоизомеразы I с двунитевыми полидезоксирибонуклеотидами. I. Димеризация топотекана в растворе. - **Молекулярная биология**. Т. 35, № 3, с. 432-441, 2001.

30. Streltsov S.A., Grokhovskii S.L., Kudelina I.A., **Oleinikov V.A.**, Zhuze A.L. The Behavior of the DNA Topoisomerase I Inhibitor in Aqueous Solution. - **Journ. Biomolecular Structure and Dynamics**. V. 18, No. 6, p. 913-914, 2001.
31. Nabiev I., Mochalov K., Ustinova O., Sukhanova A., Jardillier J.-C., **Oleinikov V.** The structure of cleavable ternary complexes of human DNA topoisomerase I, DNA and topotecan in solution probed by Raman and CD spectroscopy. - **Anticancer Research**. V. 21, No. 3A, p. 1551-1552, 2001.
32. Мочалов К. Е., Устинова О. А., Стрельцов С. А., Гроховский С. Л., Жузе А. Л., Набиев И. Р., Суханова А. В., **Олейников В. А.** Спектроскопия комбинационного рассеяния топотекана, ингибитора ДНК топоизомеразы I. – **Оптика и спектроскопия**. Т. 93, № 4, с. 537-545, 2002.
33. Мочалов К.Е., Стрельцов С.А., Ермишов М.А., Гроховский С.Л., Устинова О.А., Суханова А.В., Жузе А.Л., Набиев И.Р., **Олейников В.А.** Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния комплексов топотекана с ДНК: связывание с ДНК индуцирует димеризацию топотекана. - **Оптика и спектроскопия**. Т. 93, № 3, с. 454-462, 2002.
34. **Oleinikov V.**, Sukhanova A., Mochalov K., Ustinova O., Kudelina I., Bronstein I., Nabiev I. DNA binding induces conformational transition within the humane DNA topoisomerase I in solution. – **Biopolymers: Biospectroscopy**. V. 67, No. 6, p. 369-375, 2002.
35. Стрельцов С.А., Михейкин А.Л., Гроховский С.Л., **Олейников В.А.**, Жузе А.Л. Взаимодействие топотекана - ингибитора ДНК-топоизомеразы I с двунитевыми полидезоксирибонуклеотидами. III. Узкая бороздка - место связывания топотекана с ДНК. – **Молекулярная биология**. Т. 36, № 3, с. 511-524, 2002.
36. Стрельцов С.А., Михейкин А.Л., Гроховский С.Л., **Олейников В.А.**, Куделина И.А., Жузе А.Л. Взаимодействие топотекана - ингибитора ДНК-топоизомеразы I с двунитевыми полидезоксирибонуклеотидами. IV. Топотекан связывается преимущественно с GC-парами оснований ДНК. – **Молекулярная биология**. Т. 36, № 5, с.912-930, 2002.
37. Зайцев С. Ю., Волченкова Т. А., Устинова О.А., Коштиго Т.В., Баггетто Л. Г., Флэри Ф., Мадулет К., Набиев И.Р., **Олейников В. А.** Исследование методом Лэнгмюра-Блоджетт влияния Р-гликопротеина на свойства липидных монослоев. – **Биофизика**. Т. 47, вып. 6, с. 1073-1079, 2002.
38. Sukhanova A., Grokhovsky S., Ermishov M., Mochalov K., Zhuze A., **Oleinikov V.**, Nabiev I. DNA structural alterations induced by bis-Netropsins modulate human DNA topoisomerase I cleavage activity and poisoning by camptothecin. - **Biochem. Pharmacology**. V. 64, No. 1, p. 87-98, 2002.
39. Sukhanova A., Venteo L., Devy J., Artemyev M., **Oleinikov V.**, Pluot M., Nabiev I. Highly Stable Fluorescent Nanocrystals as a Novel Class of Labels for Immunohistochemical Analysis of Paraffin-Embedded Tissue Sections. - **Laboratory Investigations / Brief Methods**. V. 82, No. 9, p. 1259-1261, 2002.

40. Tuzikov A.B., Chinarev A.A., Gambaryan A.S., **Oleinikov V.A.**, Klinov D.V., Matsko N.B., Kadykov V.A., Ermishov M.A., Demin I.V., Demin V.V., Rye P.D., Bovin N.V. Polyglycine II Nanosheets: Supramolecular Antivirals? - **ChemBioChem**. V. 4, p. 147-154, 2003.
41. **Олейников В.А.**, Устинова О.А., Мочалов К.Е., Ермишов М.А., Гроховский С.Л., Жузе А.Л., Суханова А.В., Набиев И.Р. Кинетика лактон/карбоксилатного перехода гибридной молекулы камптотецин-нетропсин. – Биофизика. Т. 48, № 3, с. 436-442, 2003.

#### **Авторские свидетельства и патенты**

1. Куделина И.А., Кузнецов В.И., Мчедлишвили Б.В., Набиев И.Р., **Олейников В.А.**, Соколов К.В., Шестаков В.Д. Способ распознавания структуры и ингредиентов вещества. **Авт.св.** No.1673929, 1991.
2. Марков Н.Г., Виленский А.И., **Олейников В.А.**, Мчедлишвили Б.В., Донцова Э.П. Способ изготовления трековых мембран из полиимида. **Патент РФ** № 2036204, приоритет 30.10.1992.