

# W jaki sposób pochodne pirydazynonu oddziałują z białkami osocza i kwasem deoksyrybonukleinowym?

Maja Witczak<sup>1</sup>, Julia Żądło<sup>1</sup>, Aleksandra Kotynia<sup>2</sup>, Edward Krzyżak<sup>2</sup>, Łukasz Szczukowski<sup>3</sup>, Piotr Świątek<sup>3</sup> oraz Aleksandra Marciniak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Studenckie Koło Naukowe Biomolekuła, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Borowska 211a, 50-556 Wrocław;

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Podstaw Nauk Chemicznych, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Borowska 211a, 50-556 Wrocław;

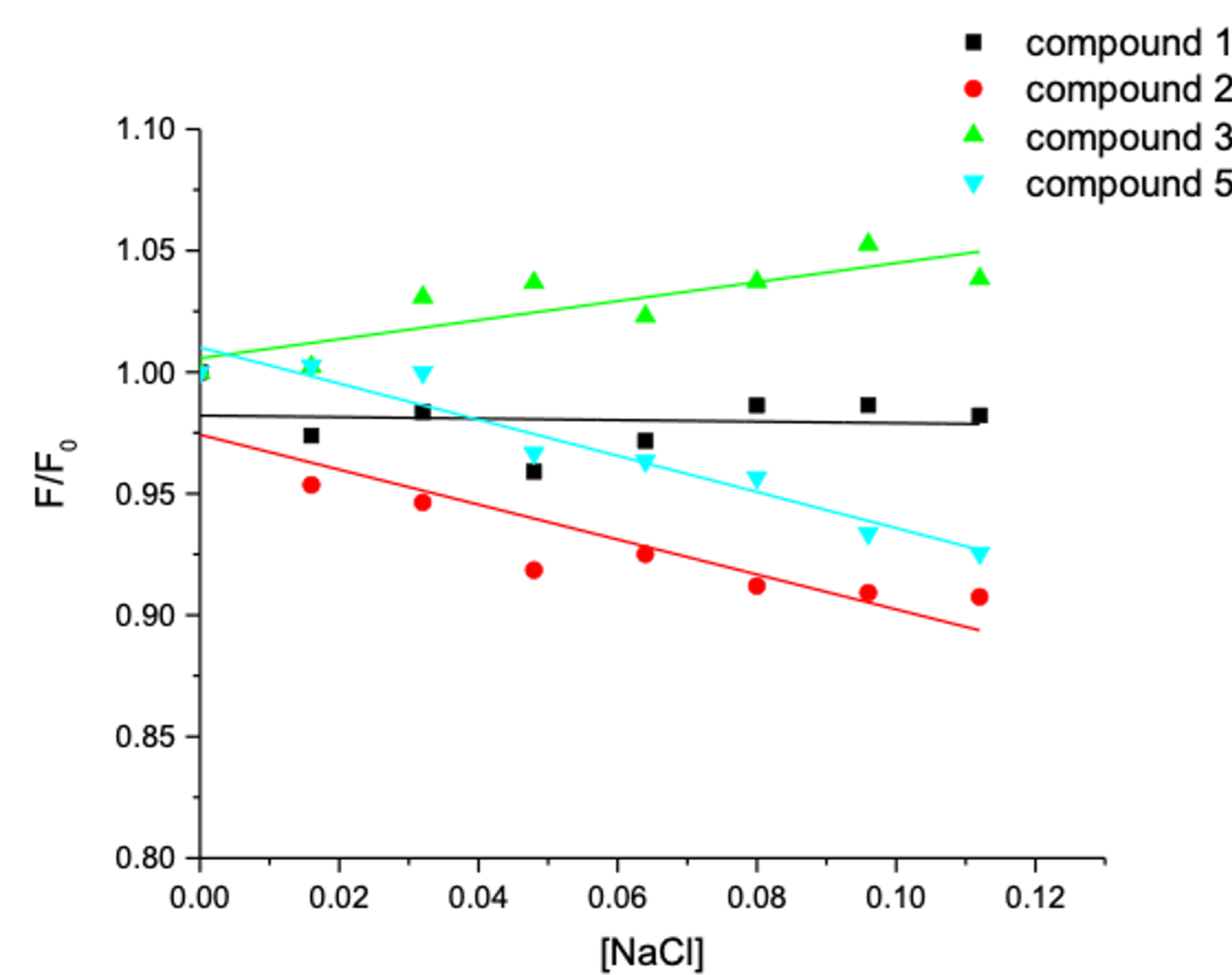
<sup>3</sup>Katedra i Zakład Chemii Leków, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Borowska 211, 50-556 Wrocław

## WPROWADZENIE

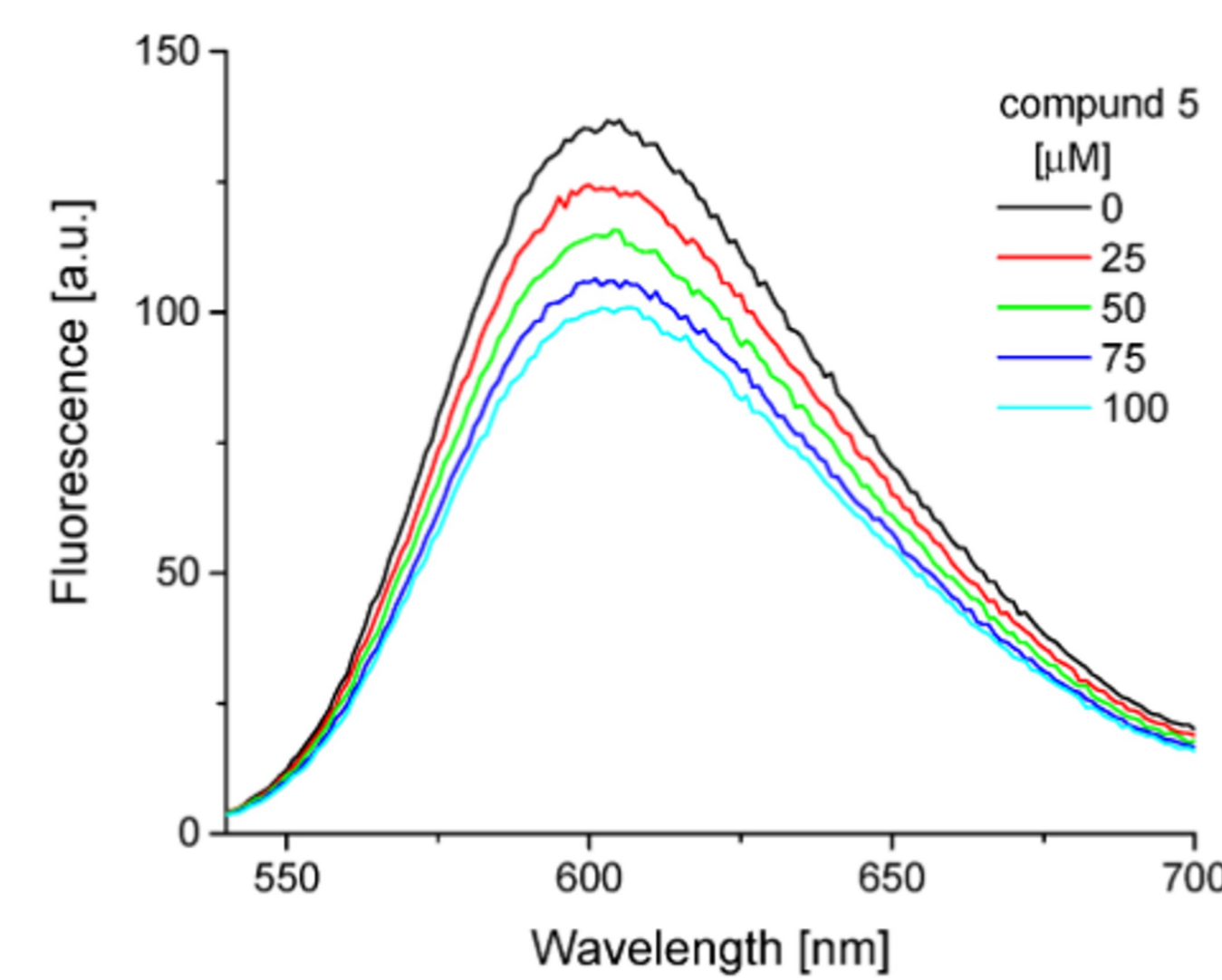
Przedmiotem badań są pochodne pirydazynonu i rodzaj ich interakcji z cząsteczką DNA oraz białkami osocza. Te związki chemiczne wykazują szereg działań min. działanie cytotoksyczne, przeciwbólowe, przeciwzapalne, a w dzisiejszych czasach najbardziej pożądanym jest działanie przeciwnowotworowe. Odpowiedź terapeutyczna takich cząsteczek jest bardzo często związana z ich interakcją z DNA oraz białkami osocza, co sprawia, że badanie mechanizmu interakcji związków z tymi cząsteczkami jest bardzo ważne w projektowaniu nowych leków. Cząsteczki pirydazonu wiążą się z DNA w sposób niekowalencyjny. Istnieją różne rodzaje tego oddziaływania, takie jak: elektrostatyczne, interkalacja, wiązanie w małym lub dużym rowku. Celem badań jest sprawdzenie, jaki typ interakcji zachodzi między nową klasą pochodnych pyrolo[3,4-d] pirydazonów, a białkami osocza i ctDNA oraz ustalenie i porównanie stałych wiązania dla zachodzących reakcji równowagi. Jako metody badawcze zostały wykorzystane spektroskopowe metody analityczne, takie jak spektroskopia fluorescencyjna, UV-Vis i dichroizmu kołowego. Ponadto wszystkie badane interakcje zostały zwizualizowane za pomocą modelowania molekularnego.

## WYNIKI

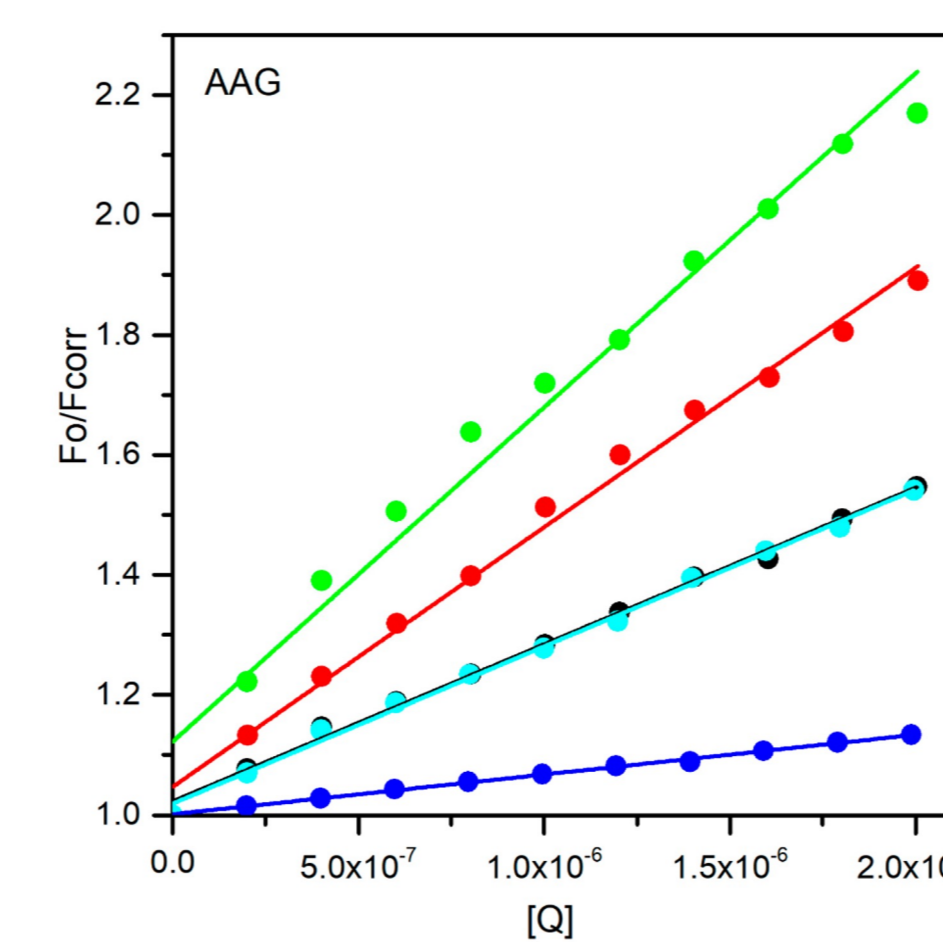
Wszystkie związki mono- i bi-heterocyklicznych pochodnych pirydazynonu mogą tworzyć stabilne kompleksy z ctDNA i dwoma białkami osocza: AAG i GG. Spektroskopia i modelowanie molekularne potwierdziły niekowalencyjny typ wiązania pochodnych pirydazonu z ctDNA, wskazując iż są to procesy spontaniczne. Związki te preferują wiązanie się w małym rowku. Stałe wiązania są podobne i zgodne z literaturą. Interakcje nie niszczą dwuniciowej helisy DNA, choć zauważalne są małe perturbacje. Jeśli chodzi o interakcje z białkami osocza, bardziej stabilne kompleksy powstają z GG niż AAG, z wyjątkiem związku 3. Związek 4 tworzy najsilniejsze połączenia z orozomukoidem, a cząsteczka  $\gamma$ -globuliny oddziałuje najsilniej z pochodną 5. Jednak wszystkie powstające kompleksy są mniej stabilne niż z albuminą. Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi



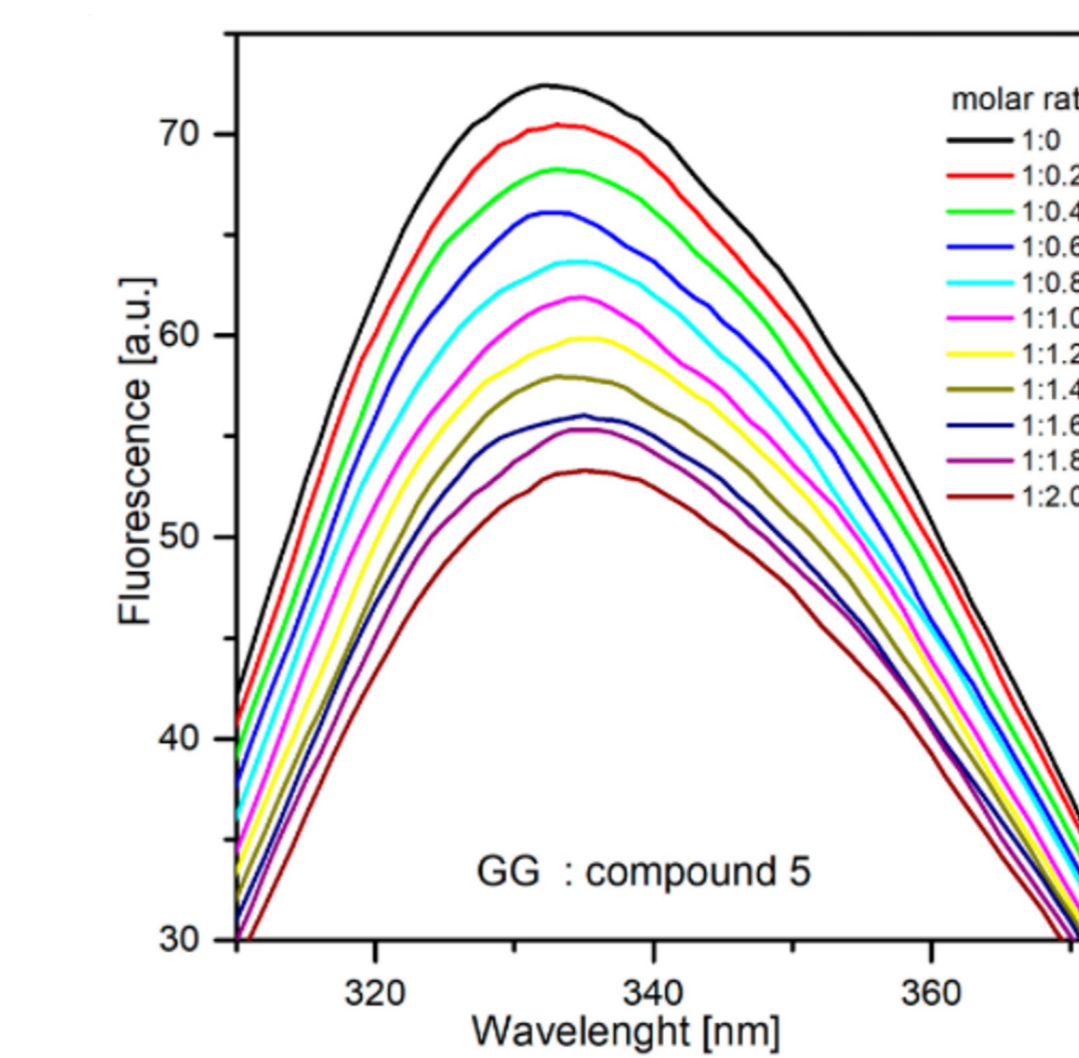
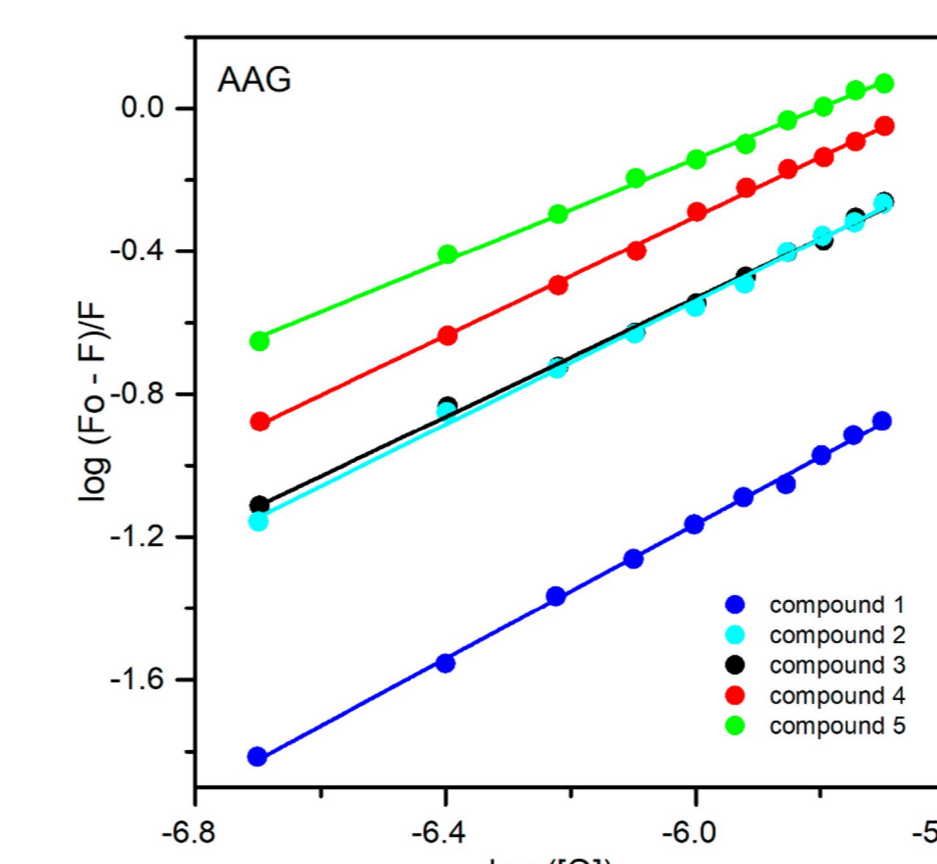
**Rysunek 5.** Wykres zmiany względnej intensywności fluorescencji ( $F/F_0$ ) kompleksów związku/ctDNA w funkcji zwiększania stężenia NaCl od 0,112 M. Cząsteczka 4 nie ma zjawiska fluorescencji. Wyniki tego badania wskazują, że związki 1, 2 i 5 wykazują zmniejszoną intensywność fluorescencji wraz ze wzrostem siły jonowej, dlatego nie wiążą się elektrostatycznie z nicią ctDNA.



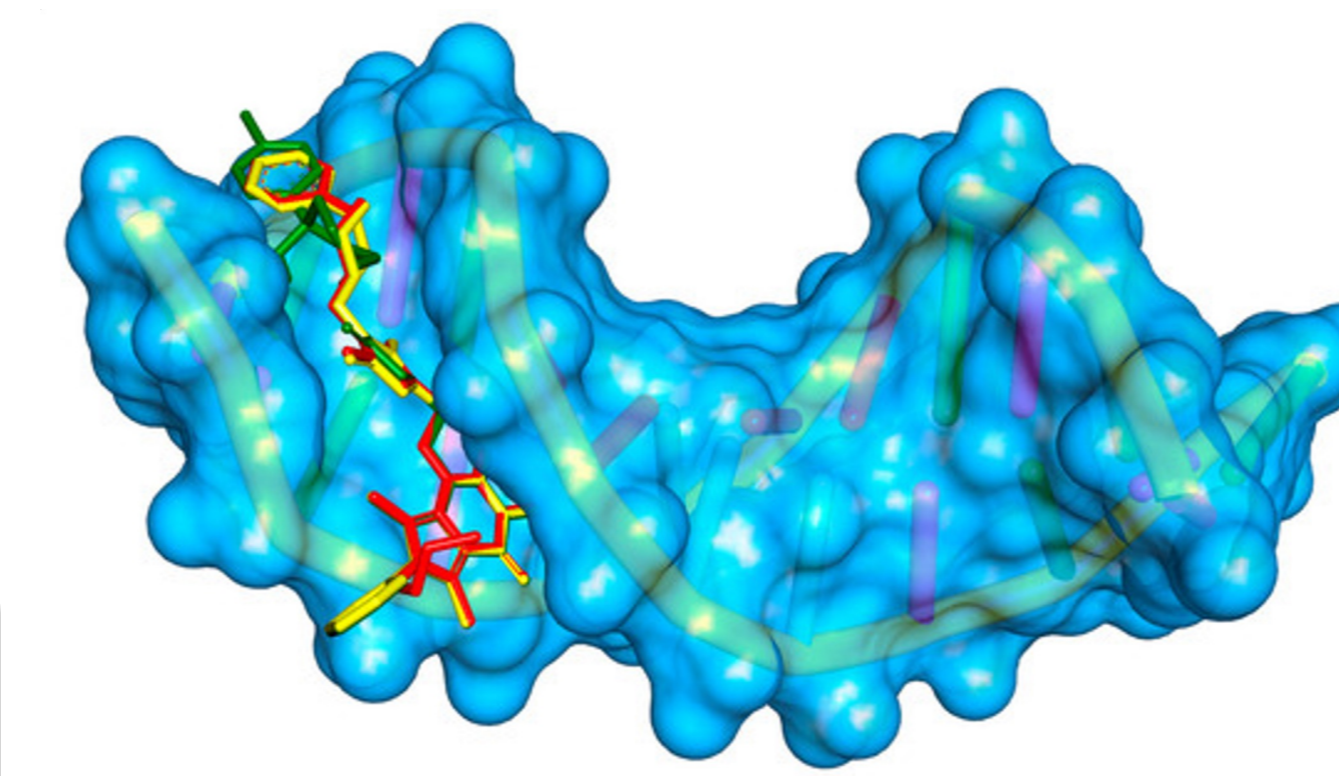
**Rysunek 6.** Widma fluorescencyjne kompetycyjnego wiązania z kompleksem bromku etydyny EB/ctDNA i związkiem 5 przy 298 K,  $c(EB) = 10\text{mM}$ ,  $c(ctDNA) = 50\text{mM}$ ,  $c(\text{związek}) = 0-100\text{mM}$ . Badanie wykazało, że rosnące stężenie związku prowadzi do zmniejszenia intensywności fluorescencji.



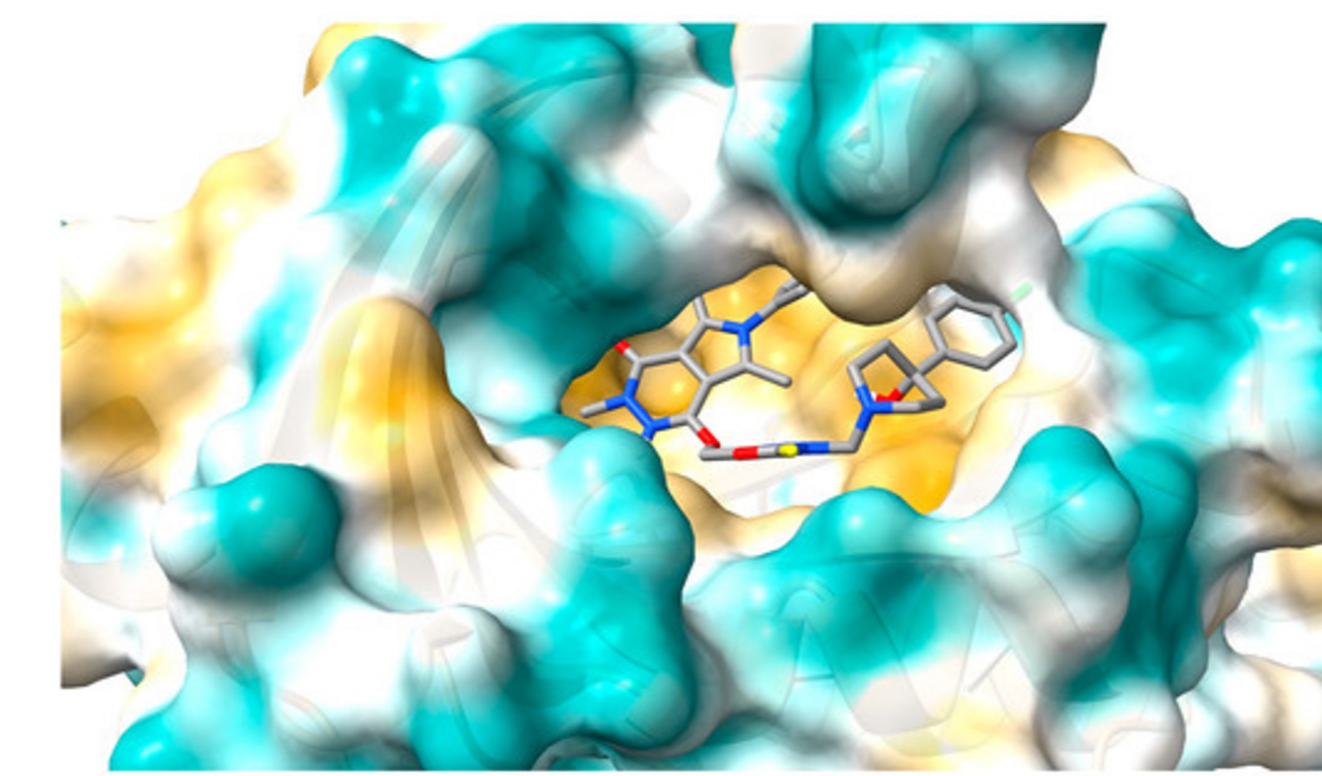
**Rysunek 7** Wykresy regresji Sterna-Volmera (po lewej) i wykresy regresji podwójnego logarytmu (po prawej) dla gaszenia AAG przez związki 1-5.



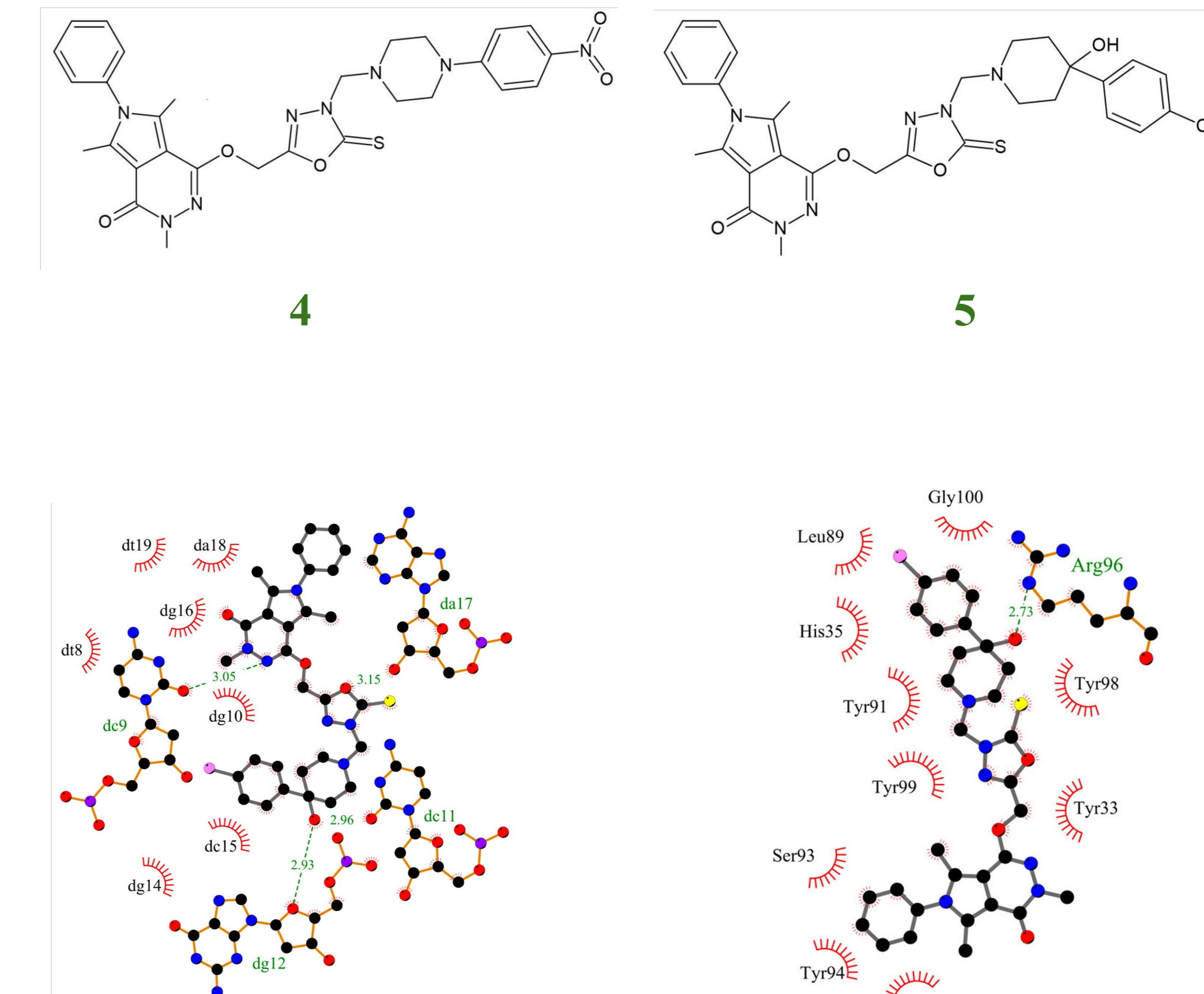
**Rysunek 8.** Fluorescencyjne widma dla GG w obecności różnych stężeń związku 5 odpowiednio,  $T=297\text{K}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$ . Stężenie GG wynosiło  $1,0\text{ }\mu\text{M}$ , a stężenie związku 5, wynosiło:  $0-2,0\text{ }\mu\text{M}$ , w etapie 0. 2.



**Rysunek 1.** Pozycja dokowania związków 1 (czerwony), 3 (żółty) i 5 (zielony) w małym rowku DNA (1vzk).

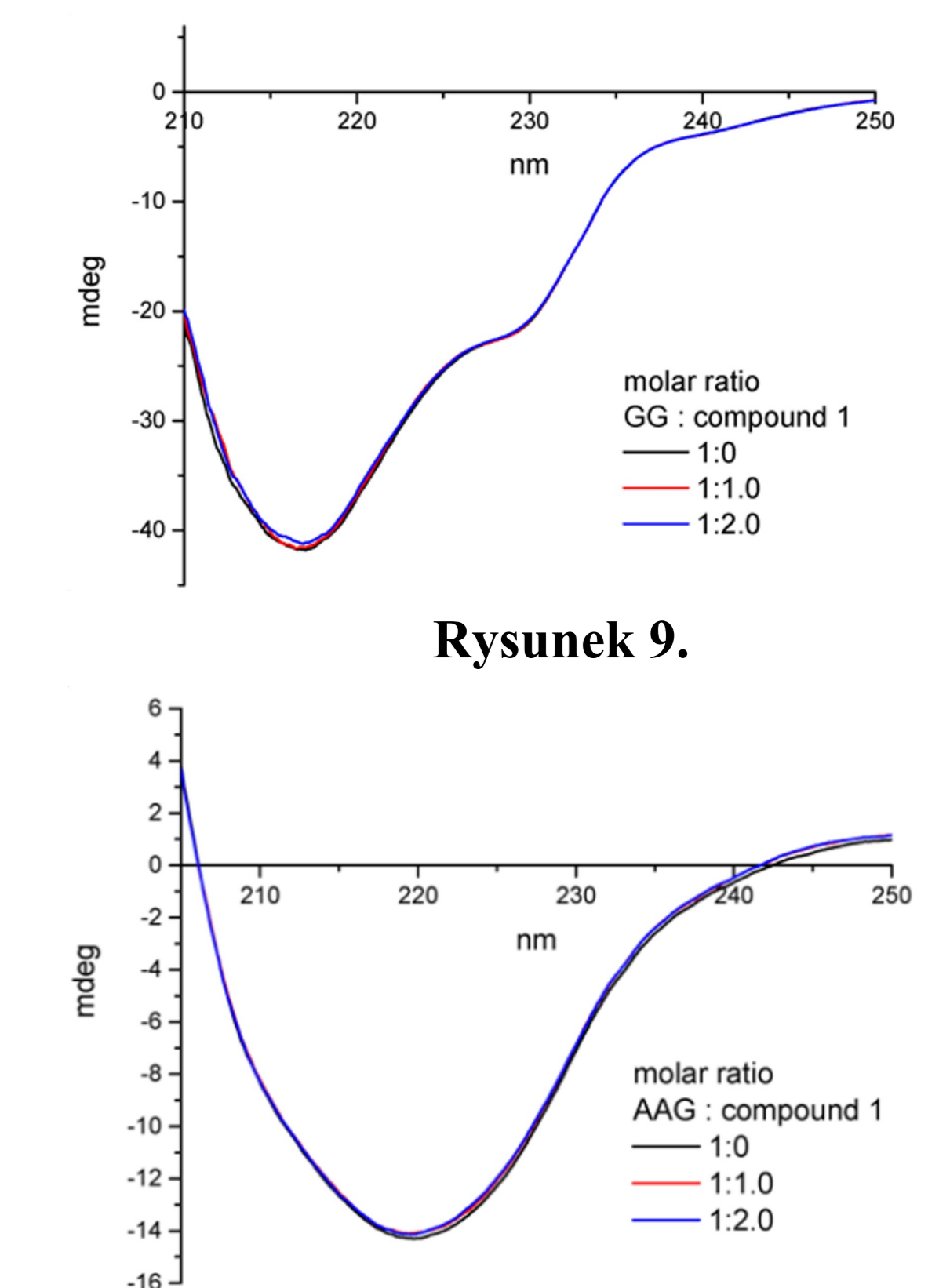


**Rysunek 2.** Pozycja cząsteczki 5 w kieszeni  $\alpha 1$ -kwasnej glikoproteiny.



**Rysunek 3.** Wykres 2D interakcji między molekułą 5 i B-DNA.

**Rysunek 4.** Interakcje między związkiem 5 a gamma globuliną.



**Rysunek 10.** Widma CD AAG i GG ( $1 \times 10^{-6}\text{ M}$ ) w 0,01 M buforze fosforanowym (pH 7,4) z dodatkiem zmiennego stosunku molowego (0, 1,0, 2,0) dla związku 1.

## WNIOSKI

Wyniki prowadzą do następującego wniosku: związki ze szkieletem pirydazonu oddziałują z ctDNA i dwoma białkami osocza: AAG i GG, co oznacza, że mogą one być obiecującymi substancjami przeciwnowotworowymi, jednak wymagana jest dalsza ocena biologiczna.