



Биолог. журн. Армении, 4 (71), 2019

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ОБЛУЧЕННЫХ ДНК С МИТОКСАНТРОНОМ ПРИ МАЛЫХ ЗАПОЛНЕНИЯХ ЛИГАНДА

В.П. КАЛАНТАРЯН¹, Р.С.КАЗАРЯН², Г.Л.КАНАРЯН³, Л.Р. СОГОМОНЯН⁴

¹Ереванский госуниверситет, кафедра радиофизики и электроники,

²Ереванский госуниверситет, кафедра молекулярной физики,

³Ванадзорский государственный университет имени Ов. Туманяна

⁴Национальный политехнический университет Армении, кафедра физики,
vkalantaryan@ysu.am

Показано, что при относительно малых концентрациях противоопухолевого препарата митоксантрона (когда одна молекула лиганда приходится примерно на 100 и более пар оснований ДНК) при ионной силе 0,011М NaCl термостабильность ДНК увеличивается приблизительно на 1⁰ С, если растворы облучать миллиметровыми электромагнитными волнами нетепловой интенсивности частотами 64,5 ГГц и 50,3 ГГц, совпадающими с резонансными частотами колебаний водных молекулярных структур. Наблюдаемое явление обусловлено увеличением доступности молекул МТХ связываться электростатически с поверхностью ДНК, вследствие изменения гидратации ДНК облучением.

ДНК-митоксантрон – нетепловые миллиметровые электромагнитные волны

Ցույց է տրվել, որ հակառնոպեային միացություն միտոքսանտրոնի հարաբերական փոքր կոնցենտրացիայի դեպքում, երբ ՂՆԹ-ի 100 և ավելի զույգ հիմքերի հետ կապվում է լիգանդի մեկ մոլեկուլ, 0,011 М NaCl իոնական ուժի դեպքում, ՂՆԹ-ի ջերմակայունությունը մեծանում է մոտավորապես 1⁰С-ով, երբ լուծույթը ճառագայթվում է ջրի մոլեկուլային կառույցների սեփական տատանումների հաճախությունների հետ համընկնող 64,5 GHz և 50,3 GHz ռեզոնանսային հաճախություններ ունեցող ոչ ջերմային ինտենսիվության միլիմետրանոց էլեկտրամագնիսական ալիքներով: Դիտվող երևույթը պայմանավորված է ճառագայթման հետևանքով ՂՆԹ-ի հիդրատացման փոփոխությամբ, որի շնորհիվ միտոքսանտրոնի մոլեկուլների ՂՆԹ-ի մակերևույթի հետ էլեկտրաստատիկ փոխազդեցությունն ավելի նկատելի է դառնում:

ՂՆԹ – միտոքսանտրոն – ոչ ջերմային միլիմետրային էլեկտրամագնիսական ալիքներ

It is shown that at relatively low concentrations of the antitumor drug mitoxantrone (MTX)(when one ligand molecule is in about 100 or more pairsbases of DNA) with an ionic strength of 0.011 M NaCl, the thermal stability of DNA increases approximately by 1⁰С, if the solutions are irradiated with millimeter electromagnetic non-thermal intensity waves with frequencies of 64.5 GHz and 50.3 GHz, coinciding with resonant vibrational frequencies of water molecular structures.The observed phenomenon is due to the increased availability of MTX molecules to bind electrostatically to the DNA surface due to changes in DNA hydration by irradiation.

DNA–mitoxantrone – non-thermal millimeter electromagnetic waves

Биохимические исследования показали, что противоопухолевый препарат митоксантрон (МТХ), проникая в клетку, изменяет структуру хроматина, связываясь с нуклеиновыми кислотами (НК) [10,15]. Обобщая литературные данные, относящиеся механизма связывания МТХ с НК, можно утверждать, что связывание МТХ с двуспиральными НК может осуществляться как при помощи полуинтеркаляции ароматических колец МТХ (рис.1), так и за счет электростатического взаимодействия отрицательно заряженных фосфатных групп НК с NH-группами МТХ, которые при нейтральных pH заряжаются положительно [5-7, 9].

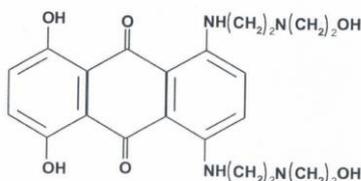


Рис.1 Химическая формула митоксантрона

Известно [5, 16], что при интеркаляционном связывании увеличивается термостабильность ДНК. Однако сравнительно недавно было показано [7], что при малых заполнениях, когда одна молекула МТХ связывается приблизительно с 200 парами оснований ДНК, термостабильность ДНК приблизительно на $1-2^{\circ}\text{C}$ уменьшается, причем величина изменения температуры плавления T_m сильно зависит от ионной силы: уменьшается с увеличением ионной силы. В работах [4, 11] было показано, что облучение растворов ДНК миллиметровыми электромагнитными волнами (МЭМВ) слабой мощности резонансными частотами колебаний водных молекулярных структур (триад и гексогенов) приводит к увеличению термостабильности ДНК, причем увеличение T_m достигает наибольшего значения при облучении 90 мин.

Целью данной работы было исследование термостабильности комплексов ДНК. МТХ при сравнительно малых концентрациях МТХ, заранее облученных 90 мин с резонансными (50,3 ГГц и 64,5 ГГц) и нерезонансной (48,3 ГГц) частотами колебаний водных молекулярных структур.

Материал и методика. В работе использовали ДНК тимуса теленка ($\epsilon_{260}=6550 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и МТХ ($\epsilon_{659}=25090 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Все препараты фирмы "Sigma". Исследования проводились в водном растворе, содержащем 0,01M NaCl, 1mM Трис, 0,5mM ЭДТА, pH=7,4. Спектры поглощения и кривые плавления комплексов ДНК.МТХ получены на спектрофотометре SPECORD UV-VIS. Для снятия кривых плавления (зависимость поглощения при 260нм от температуры) обычно использовался непрерывный режим нагрева раствора ДНК со скоростью 0,2-0,3 $^{\circ}\text{C}$ /мин.

Измерения проводили в термостатированных ячейках с использованием 10 мм кварцевых кювет с плотно закрывающимися крышками. Измерения проводились в интервале температуры от 20 $^{\circ}$ до 98 $^{\circ}\text{C}$. Кривые плавления каждого образца снимались по 5-6 раз. Из каждой кривой плавления вычисляли параметры плавления (температура (T_m) и интервал (ΔT), затем эти параметры усреднялись. Облучение растворов проводили в специальном стеклянном сосуде. Растворы сверху закрывались прозрачной для излучения тонкой хлорвиниловой пленкой. Толщина образца приблизительно 1-2мм. Для облучения использовались генераторы Г4-142 и Г4-141(Россия). Частотный диапазон для Г4-141 составляет 37,5-53,7 ГГц (плотность потока в месте нахождения образца составляла 0,6 мВт/см 2), для Г4-142 53,3-78,33ГГц (плотность потока 50 мкВт/см 2).

Результаты и обсуждение. В работах [2,3,11,12] было показано, что под действием МЭМВ физико-химические свойства водных и водно-солевых растворов ДНК претерпевают максимальное изменение при облучении 90 мин. резонансными частотами 64,5 и 50,3 ГГц колебаний водных молекулярных структур. Поэтому в данной работе была исследована термостабильность комплексов ДНК.МТХ, заранее облученных 90 мин резонансными и нерезонансной (48,3ГГц) частотами.

На рис. 2 и 3 приведены кривые плавления необлученных и облученных (64,5 ГГц) ДНК в комплексе с МТХ, а в табл. 1 даны параметры плавления необлученных и облученных комплексов ДНК.МТХ, определенных из кривых плавления. Как следует из рис. 2 и было показано в работе [7], при малых заполнениях (кривая 2) происходит дестабилизация АТ-богатых участков и стабилизация ГЦ-богатых участков, вследствие чего уменьшается T_m ДНК и увеличивается ΔT . Для облученных комплексов (рис.3) эффект дестабилизации АТ-богатых участков ДНК проявляется слабее. Как следует из рис.3 и табл. 1, при облучении растворов ДНК.МТХ комплексов резонансными частотами T_m ДНК при малых заполнениях ($C_0/C_p \leq 0,01$, где C_0 -концентрация МТХ, а C_p -концентрация ДНК в расчете на пар оснований) немного увеличивается, дальнейшее увеличение C_0/C_p приводит к увеличению T_m и ΔT .

Таблица 1. Значение параметров плавления необлученных и облученных ДНК в комплексе с митоксантроном

Относительная концентрация МТХ (C_0/C_p)	Необлученная ДНК в комплексе с МТХ		Облученная 90 минут ДНК в комплексе с МТХ					
			Частотой 64,5 ГГц		Частотой 50,3 ГГц		Частотой 48,3 ГГц	
	$T_m, ^\circ C$	$\Delta T, ^\circ C$	$T_m, ^\circ C$	$\Delta T, ^\circ C$	$T_m, ^\circ C$	$\Delta T, ^\circ C$	$T_m, ^\circ C$	$\Delta T, ^\circ C$
0	68,6±0.1	9,8±0.1	69,7±0.1	9,9±0.1	69,6±0.1	10,0±0.1	68,5±0.2	9,9±0.1
0,0014	67,0±0.2	11,2±0.1	67,6±0.1	11,3±0.1	67,5±0.1	11,2±0.2	66,9±0.1	11,3±0.1
0,002	66,7±0.1	12,8±0.2	67,3±0.1	13,0±0.2	67,1±0.1	13,1±0.2	66,8±0.2	12,9±0.2
0,005	66,4±0.1	14,0±0.1	66,8±0.1	13,8±0.2	66,7±0.1	14,1±0.2	67,0±0.1	14,1±0.2
0,009	68,4±0.2	15,3±0.2	69,1±0.2	15,2±0.1	69,0±0.2	15,0±0.1	69,0±0.2	15,1±0.2
0,012	70,2±0.2	19,0±0.2	70,8±0.1	19,5±0.2	70,7±0.1	19,1±0.1	70,3±0.2	19,7±0.1
0,02	72,6±0.1	22,1±0.2	73,4±0.1	22,0±0.2	73,3±0.2	21,9±0.2	72,7±0.1	22,0±0.1

Примечание. Интервал плавления ΔT определен как разность температур в точках, где оптическая плотность раствора ДНК изменяется от 17 до 83 %. C_0 - концентрация митоксантрона, а C_p -концентрация ДНК в расчете на пар нуклеотидов.

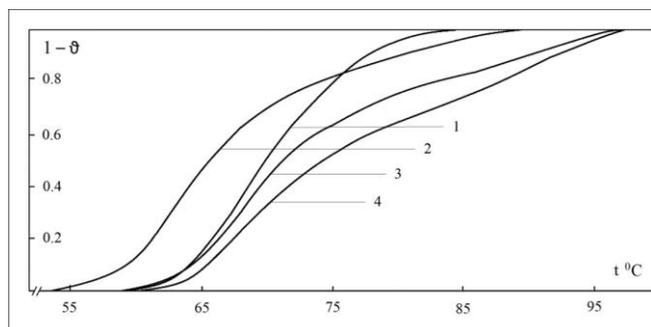


Рис.2 Кривые плавления комплексов ДНК-митоксантрон при некоторых относительных концентрациях митоксантрона: C_0/C_p -0 (1); 0,02 (2); 0,012 (3) и 0,02 (4).
– степень спиральности ДНК.

Известно [5,8], что при малых заполнениях МТХ связывается с АТ и GC-парами по разным механизмам: с GC-парами полуинтеркаляционным, а с АТ-парами параллельно с полуинтеркаляцией наблюдается и внешнее связывание. При облучении же водно-солевых растворов ДНК резонансными частотами происходит изменение гидратации ионов [1-3,12], вследствие чего увеличивается доступность фосфатных групп ДНК электростатически связываться с молекулами МТХ. Вследствие этого, поскольку МТХ при малых концентрациях с АТ богатыми участками связывается и внешним образом в этих участках из-за увеличения плотности положительных зарядов происходит локальная дестабилизация двухцепочной структуры ДНК [7]. Под влиянием МЭМВ этот эффект частично компенсируется, однако дестабилизирующее действие МТХ на АТ богатые участки ДНК больше, чем стабилизирующее влияние МЭМВ, вследствие чего и T_m облученных комплексов ДНК.МТХ уменьшается. При облучении растворов нерезонансной 48,3 ГГц частотой, как следует из табл. 1, параметры плавления ДНК в пределах погрешности эксперимента остаются неизменными.

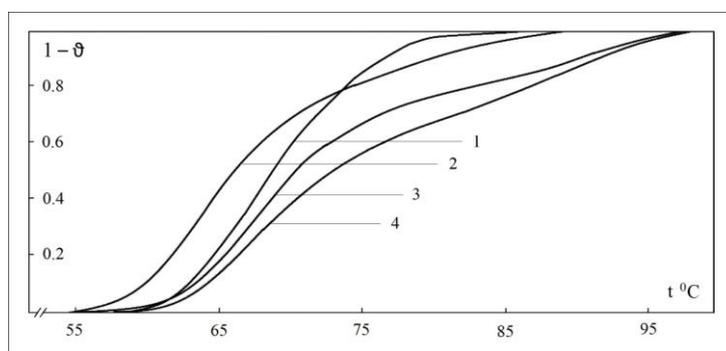


Рис.3 Кривые плавления комплексов ДНК-митоксантрон, облученных 90 мин частотой 64,5 ГГц при некоторых относительных концентрациях митоксантрона: $C_0/C_p=0$ (1), 0,002 (2), 0,012 (3) и 0,02 (4).

Следовательно, *in vitro* экспериментальные данные показывают, что дестабилизация АТ-богатых участков ДНК при малых заполнениях митоксантроном уменьшается, если комплексы облучать резонансными для колебаний водных молекулярных структур частотами. Сравнительно недавно *in vivo* исследовано комбинированное действие противоопухолевых препаратов и облучения на ДНК опухоли [13,14]. Исследования показали, что комбинированное влияние противоопухолевых препаратов и облучения приводит к увеличению противоопухолевой активности препаратов и уменьшению побочных нежелательных эффектов.

Обобщая наши экспериментальные данные по влиянию облучения на стабильность комплексов ДНК.МТХ при малых заполнениях, можно предположить, что, вероятнее всего, дополнительная стабилизация ДНК.МТХ комплексов, вследствие облучения приводит к тому, что ДНК опухолевых клеток, вовлеченных в митотический цикл, становится менее подверженной бесконтрольному размножению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонян А.П., Шагинян М.А., Пирумян К.В., Вардеванян П.О. Влияние ММ ЭМВ на связывание Hoechst 33258 с ДНК Биолог. журн. Армении, 64, 1, 62-68, 2012.

-
3. *Бабаян Ю.С., Акопян С.Н., Казарян Р.С., Калантарян В.П., Вардеванян П.О.* Некоторые физико-химические свойства ДНК, облученной низкоэнергетическими миллиметровыми когерентными электромагнитными волнами. Биомед. технолог. ирадиоэлектроника. N11, с. 64-68, 2006.
 4. *Бабаян Ю.С., Тадевосян А.А., Канарян Г. Л., Калантарян В.П., Вардеванян П.О.* Влияние когерентного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на некоторые свойства растворов ДНК. Биомед. Радиоэлектроника. N 2, с.52-57, 2009.
 5. *Калантарян В.П., Акопян С.Н., Вардеванян П.О.* Влияние слабых электромагнитных волн на тепловые свойства водных растворов биомакромолекул. Известие НАН РА, Физика, 52, 2, с.1001-1005, 2018.
 6. *Awasthi P., Dogra S., Barthwal R.* Multispectroscopic methods reveal different modes of interaction of anticancer drug mitoxantrone with poly(dG-dC).poly(dG- dC) and poly(dA-dT).poly(dA-dT). J. Photocem. Photobiol. B: Biology, 127, p.78-87, 2013.
 7. *Babayan YU.S., Hakobyan S.N., Ghazaryan R. S., Shahinyan M.A.* Interaction of antitumour agent mitoxantrone with double helical synthetic polyribonucleotides polyG.polyC and polyIpolyC. Biophys. Review and letters, 12, 4, p.165-176, 2017.
 8. *Babayan Y.S., Hakobyan S.N., Ghazaryan R.S., Shahinyan M.A.* Thermostability of DNA complexes with mitoxantrone at small fillings. Biophys. Review and letters, 12, 3, p.141-149, 2017.
 9. *Dogra S., Awasthi P., Barthwal R.* Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA hexamer sequence d-(CTCGAG)₂ by absorption, fluorescence and circular dichroism spectroscopy. J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 123, 5, p.48-54, 2013.
 10. *Hag I.* Thermodynamics of drug-DNA interactions. Arch. Biochem. Biophys., 403, p. 1-15, 2002.
 11. *Hajihassan Z., Rabbani – Chadegani A.* Studies on the binding affinity of anticancer drug mitoxantrone to chromatin, DNA and histone proteins. J. Biomol. Sci., 16, p.31-38, 2009.
 12. *Kalantaryan V.P., Babayan YU.S., Gevorgyan E.S., Hakobyan S.N., Vardevanyan P.O.* Influence of low intensity coherent electromagnetic millimeter radiation (EMR) on aqueous solution of DNA. Prog. Electromag. Res. Letters., 13, p.1-9, 2010.
 13. *Kalantaryan V.P., Hakobyan S.N., Babayan Yu.S.* Influence of millimeter wave electromagnetic radiation of nonthermal intensity on density of aqueous solutions. J. Contemporary phys., 52, 11, p.52-62, 2017.
 14. *Logani M.K., Bhanushali A., Anga A., Majmundar A., Szabo I., Ziskin M.C.* Combined millimeter waves and cyclophosphamide therapy of an experimental murine melanoma. Bioelectromag., 25, p.516-523, 2004.
 15. *Makar V.R., Logani M.K., Bhanushali A., Alekseev S.I., Ziskin M.C.* Effect of cyclophosphamide and 61.22 GHz millimeter waves on T-cell, B-cell and macrophage functions. Bioelectromag., 27, p.456-466, 2006.
 16. *Skłodonowski A., Konopa J.* Mitoxantrone and ametantrone induce interstrand cross-links in DNA of tumour cells. Br. J. Cancer, 82, 7, p.1300-1304, 2000.
 17. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A. Davtyan H.G., Boyajyan Z.R., Karapetyan A.T.* Complex-formation of ethidium bromide with poly(d(A-T)).poly(d(A-T)). J. Biomol. Struct. Dyn. V.22, p. 465-470, 2005

Поступила 10.10.2019