Известия НАН Армении, Физика, т.59, №2, с.248–254 (2024) УДК 577.3;547.963.3 DOI:10.54503/0002-3035-2024-59.2-248

# ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СВЯЗЫВАНИЯ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ С ДНК, ОБЛУЧЕННОЙ НИЗКОИНТЕНСИВНЫМИ МИЛЛИМЕТРОВЫМИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫМИ ВОЛНАМИ

## В.П. КАЛАНТАРЯН<sup>1</sup>, Р.С. КАЗАРЯН<sup>1</sup>, Ю.С. БАБАЯН<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Ереванский государственный университет, Ереван, Армения <sup>2</sup>Национальный университет архитектуры и строительства, Ереван, Армения

\*e-mail: babayanyura@gmail.com

(Поступила в редакцию 30 апреля 2024 г.)

Исследовано взаимодействие биологически активных молекул (БАМ) с выполняющим важнейшие функции в живом организме, биополимером – ДНК, имеющем двойную спиральную структуру, облученным нетепловыми электромагнитными миллиметровыми волнами. Показано, что БАМ (доксорубицин, митоксантрон и нетропсин) образуют наиболее устойчивые комплексы с ДНК, облученной резонансными частотами собственных колебаний молекулярных структур воды (64.5 и 50.3 ГГц). Под воздействием вышеуказанных нетепловых миллиметровых волн происходит дегидратация молекулы ДНК, что приводит к росту константы связывания БАМ с облученной ДНК. Расчёты показывают, что в результате облучения изменяются термодинамические параметры связывания БАМ с ДНК – энтальпия ( $\Delta H$ ) и энтропия ( $\Delta S$ ). Для всех исследованных БАМ  $\Delta H < 0$ , а  $\Delta S > 0$ . Наибольшее изменение энтропии имеет место для связывающегося внешне с ДНК нетропсином.

## 1. Введение

В настоящее время растет применение миллиметровых электромагнитных волн (МЭМВ) в различных областях (в технике, в военных целях и т. д.). Низкоинтенсивные МЭМВ широко внедрились в медицинскую практику. Экспериментальные данные [1–4] свидельствуют о высокой биологической активности электромагнитных полей во всех частотных диапазонах. При относительно низком уровне интенсивности электромагнитного поля (менее 1 мВт/см<sup>2</sup>) принято говорить о нетепловом или информационном характере воздействия на организм. Механизмы действия МЭМВ в таких случаях еще мало изучены. Анализ существующих в литературе экспериментальных данных указывает на то, что в живых организмах первичной мишенью МЭМВ служит вода, которая играет уникальную роль в функционировании органов, а также в организации и стабилизации биомолекул [3, 5, 6]. Известно [3, 7–10], что облучение водных растворов резонансными для колебаний водных молекулярных структур частотами изменяет состояние молекул воды, что в свою очередь может повлиять на физикохимические свойства растворенных в ней солей и биомолекул. Сравнительно недавно нами было показано, что МЭМВ нетепловой интенсивности с резонансными частотами колебаний водных молекулярных структур (50.3 и 64.5 ГГц) не поглощаются поверхностным слоем водных растворов, а проникают в более глубокие слои водных растворов, что приводит к дегидратации присутствующих в растворе ионов и биомолекул, вследствие чего увеличивается плотность водносолевых растворов [7, 8] и термостабильность ДНК, причем увеличение плотности и термостабильности наибольшее при облучении в течение 90 мин частотами 50.3 и 64.5 ГГц [10]. Поэтому целью данной работы было исследование связывания малых молекул (ММ) с дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), предварительно облученной в течение 90 минут резонансными (50.3 и 64.5 ГГц) и нерезонансной (48.3 ГГц) частотами, а также определение изменений термодинамических параметров (энтальпия, энтропия и свободная энергия Гиббса) вследствие связывания.

## 2. Материалы и методы исследования

Облучение растворов проводилось в специальном стеклянном сосуде. Растворы (4 мл) сверху накрывались прозрачной для излучения тонкой хлорвиниловой пленкой. Толщина облученного образца 1 мм. Для облучения использовались высокочастотные генераторы Г4-141 и Г4-142 (Россия). Интервал частот колебаний для Г4-141 составлял 37.5–53.7 ГГц (плотность потока мощности на поверхности объекта составляла 0.6 мВт/см<sup>2</sup>), а для Г4-142 – 53.3–78.33 ГГц (плотность потока мощности составляла 50 мкВт/см<sup>2</sup>), что подробно описано в работе [9]. Растворы ДНК, приготовленные для спектрофотометрических измерений, облучались 90 мин частотами 64.5, 50.3 и 48.3 ГГц. Частота 50.3 ГГц совпадает с резонансной частотой колебаний гексагональных колец молекулярной структуры воды, а частота 64.5 ГГц – с резонансной частотой колебаний триадных структур воды [3]. В работе были использованы ДНК тимуса теленка фирмы Sigma и NaCl фирмы Serva. Растворы ДНК были приготовлены в физиологическом растворе (0.9% NaCl): в этих условиях ДНК образует двойную спираль В-типа. Геометрия двойной спирали ДНК сильно зависит от гидратации мономеров: изменение гидратации приводит к изменению геометрии двойной спирали ДНК. В работе исследовано связывание противоопухолевых соединений (митоксантрона, доксорубицина и нетропсина) с ДНК, предварительно облученной МЭМВ частотами 50.3, 64.5 и 48.3 ГГц. Концентрации ДНК, митоксантрона (МТХ), доксорубицина (DX) и нетропсина (Nt) определялись спектрофотометрически с использованием следующих коэффициентов экстинкции в М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>л. ДНК тимуса теленка ( $\epsilon_{260} = 6550$ ), MTX ( $\epsilon_{659} = 25090$ ) [11], Nt ( $\epsilon_{296} = 21500$ ) [12], DX ( $\epsilon_{480} =$ 11500) [13]. Связывание малых молекул с ДНК исследовалось спектрофотометрически на спектрофотометре Cary-219 (USA). Концентрация МТХ в растворе была 3×10<sup>-6</sup> M, 7×10<sup>-5</sup> M для DX и 2×10<sup>-5</sup> M для Nt: при таких концентрациях исследуемые соединения, в основном, находятся в мономерном состоянии [11, 13-15].

## 2.1. Определение термодинамических параметров, характеризующих связывание малых молекул с ДНК

Изменение термодинамических параметров вследствие связывания малых молекул с ДНК обычно определяют при помощи изотермической микро-

калориметрии, осуществление которой связано с определенными трудностями. Поэтому нами применен более простой способ определения термодинамических параметров связывания при помощи анализа температурной зависимости изотерм адсорбции, полученной спектрофотометрически.

Взаимодействие малых молекул (MM) с ДНК отражается в изменении спектров поглощения в видимой и УФ областях спектра. ДНК не поглощает в дальней УФ (> 320нм) и видимой области спектра. Поэтому по изменению спектров поглощения в указанных областях (при образовании комплексов ДНК с ММ) можно исследовать характер связывания ММ с ДНК, а также определить изменение термодинамических параметров вследствие связывания. Термодинамические параметры связывания определялись из анализа изотерм адсорбции, рассчитанных из спектров поглощения, построенных в координатах Скэтчарда, что подробно описано в работе [16]. В рамках кооперативной модели исключенных соседних мест связывания, изотерма адсорбции описывается следующим уравнением [17, 18]:

$$\frac{r}{c_f} = k(1 - nr) \left[ \frac{(2\omega - 1)(1 - nr) + r - R}{2(\omega - 1)(1 - nr)} \right]^{n-1} \times \left[ \frac{1 - (n+1)r + R}{2(1 - nr)} \right]^2, \tag{1}$$

где  $R = ([1 - (n+1)r]^2 + 4\omega r(1 - nr))^{1/2}.$ 

В формуле (1) k – константа связывания ММ с ДНК, n – число пар оснований ДНК, приходящихся на одно место связывания,  $C_f$  и  $C_b$  – концентрации свободных и связанных ММ, соответственно,  $C_p$  – концентрация ДНК,  $\omega$  – параметр кооперативности и  $r = C_b/C_p$ .

Вышеизложенным способом были построены изотермы адсорбции ММ с ДНК. Методом наименьших квадратов через экспериментальные точки проведены теоретические кривые, описываемые формулой (1). В каждом случае из изотерм адсорбции определены величины k, n и  $\omega$  и вычислены значения изменений термодинамических параметров (энтальпии  $\Delta H$ , энтропии  $\Delta S$  и свободной энергии Гиббса  $\Delta G$ ) при связывании ММ с ДНК. Значение  $\Delta G$  вычислялось по формуле

$$\Delta G = -RT \ln k(T), \tag{2}$$

где R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура. Значения  $\Delta H$  и  $\Delta S$  были определены из анализа кривых Вант-Гоффа (при линейной зависимости lnk от 1/T). Так как  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ , то учитывая (2) выражение можно представить в виде

$$nk(T) = -\Delta H/R \times 1/T + \Delta S/R.$$
(3)

Согласно формуле (3), тангенс угла наклона  $\ln k(T)$  от 1/T дает величину  $\Delta H/R$  (если зависимость линейная), а ордината пересечения прямой с осью ординат дает  $\Delta S/R$ .

1

## 3. Результаты и их обсуждение

Исследовалось взаимодействие МТХ, DX и Nt с ДНК по характеру изменения спектров поглощения при образовании комплексов. При постоянной концентрации ММ получены спектры поглощения DX и МТХ в видимой и Nt в дальней УФ-области спектра при образовании комплексов с необлученными и облученными ДНК. Экспериментальные данные свидетельствуют, что характер изменения спектров поглощения при образовании комплексов MM с необлученными и облученными ДНК почти не отличаются: для необлученных и облученных ДНК наблюдается одинаковый ход изменения спектров поглощения MM. Из спектров поглощения определялись концентрации свободных и связанных MM в растворе и были построены изотермы связывания (зависимость  $r/C_f$  or r) [16], которые в дальнейшем описывались формулой (1), и определены параметры k, nи  $\omega$ . Рассчитанные по формуле (1) значения параметров k и n при трех температурах, при которых ДНК находится в двухспиральном состоянии, приведены в табл.1.

Табл.1. Значения константы связывания k и параметра n, характеризующего стехиометрию комплекса при насыщении связывания, для комплексов митоксантрона, доксорубицина и нетропсина с необлученными и облученными ДНК

Тип малых		Необлучен-	Облученный, частота, ГГц					
молекул	<i>1</i> , K	ный	50.3	64.5	48.3	n		
Константа связывания (k, M <sup>-1</sup> )								
Митоксантрон		(5.1±0.1)	(10.0±0.2)	(8.7±0.2)	(5.2±0.1)			
	298.15	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	2.4±0.2		
		$(4.1\pm0.1)$	(7.5±0.1)	(6.9±0.3)	(4.2±0.2)			
	303.15	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	2.5±0.2		
		(3.35±0.05)	(5.1±0.2)	(4,8±0.2)	(3.4±0.1)			
	308.15	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	2.3±0.2		
Доксорубицин		(6.2±0.1)	(64.5±0.3)	(62.0±0.2)	(6.9±0.2)			
	290.15	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	4.0±0.2		
		(5.1±0.1)	(50.2±0.2)	(48.1±0.3)	(5.9±0.2)			
	300.15	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	4.1±0.2		
		(4.5±0.2)	(39.4±0.3)	(38.2±0.2)	(5.1±0.2)			
	310.15	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	×10 <sup>5</sup>	4.1±0.2		
Нетропсин		(5.0±0.2)	(36.1±0.3)	(38.4±0.2)	(6.9±0.2)			
	293.15	×10 <sup>8</sup>	$\times 10^{8}$	$\times 10^{8}$	×10 <sup>8</sup>	5.9±0.2		
		(3.0±0.2)	$(21.1\pm0.2)$ ·	(22.3±0.3)	$(4.1\pm0.2)$			
	303.15	$\times 10^{8}$	×10 <sup>8</sup>	$\times 10^{8}$	×10 <sup>8</sup>	6.0±0.2		
		(2.0±0.1)	$(12.8\pm0.2)$ ·	(13.0±0.2)	(3.8±0.2)			
	313.15	×10 <sup>8</sup>	×10 <sup>8</sup>	×10 <sup>8</sup>	×10 <sup>8</sup>	6.0±0.2		

Для необлученных и облученных комплексов была построена зависимость  $\ln k$  от 1/T и по формулам (2) и (3) определены значения  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  и  $\Delta S$ . Значения термодинамических параметров связывания для исследованных комплексов приведены в табл.2.

Исследуемые малые молекулы представляют противоопухолевые соединения, которые по-разному взаимодействуют с двухспиральными ДНК. DX является интеркалирующим соединением, молекулы которого внедряются между параллельно расположенными парами оснований ДНК [19, 20]. МТХ является полуинтеркаляционным соединением, плоская часть которого частично внедряется между парами оснований ДНК [21, 22]. Nt является неинтеркалирующим соединением, взаимодействует с ДНК Ван-дер-Ваальсовыми силами и образует с

Термодинамический	Пааб <i>т</i> танний	Облученный, частота, ГГц							
параметр	пеоолученный	50.3	64.5	48.3					
ДНК – митоксантрон									
$-\Delta G$ , ккал/моль	7.8±0.1	8.0±0.2	8.1±0.2	7.8±0.1					
$-\Delta H$ , ккал/моль	7.6±0.1	8.4±0.2	8.5±0.2	7.7±0.1					
$\Delta S$ , кал/(моль×К)	0.8±0.1	1.2±0.1	1.4±0.2	1.2±0.1					
ДНК – доксорубицин									
$-\Delta G$ , ккал/моль	7.8±0.2	11.3±0.2	10.8±0.2	7.9±0.2					
$-\Delta H$ , ккал/моль	2.8±0.1	4.3±0.2	4.1±0.2	2.9±0.2					
$\Delta S$ , кал/(моль×К)	16.6±0.2	20.0±0.2	18.3±0.2	16.7±0.2					
ДНК – нетропсин									
$-\Delta G$ , ккал/моль	11.8±0.2	12.9±0.2	13.0±0.2	11.9±0.2					
$-\Delta H$ , ккал/моль	9.1±0.2	9.5±0.2	9.6±0.2	9.2±0.2					
$\Delta S$ , кал/(моль×К)	5.9±0.2	11.2±0.2	11.2±0.2	8.9±0.2					

Табл.2. Термодинамические параметры связывания митоксантрона, нетропсина и доксорубицина с необлученными и облученными ДНК

аденин-тимин звеньями ДНК водородные связи [12, 23]. Как следует из табл.1, с облученными (нетепловыми МЭМВ с частотами 50.3 и 64.5 ГГц резонансными для колебаний водных молекулярных структур) ДНК все исследуемые соединения образуют более прочный комплекс: увеличивается константа связывания. Для ДНК, облученных нерезонансной частотой 48.3 ГГц, константа связывания в пределах погрешности эксперимента не меняется при связывании MTX и немного увеличивается для DX и Nt. Из табл.1 также следует, что облучение не влияет на величину *n*: независимо от облучения одна молекула связывается приблизительно с 2.5 парами оснований ДНК для МТХ, 4 – для DX и 6 – для Nt. В работах [7, 8] было показано, что под воздействием нетепловых резонансных МЭМВ меняется структура воды, вследствие чего происходит дегидратация растворенных в воде ионов и биомолекул. Вследствие дегидратации присутствующих в растворе ионов Na должна увеличиваться термостабильность ДНК (что подробно исследовано в работах [10, 24]), а вследствие дегидратации ДНК исследуемые соединения более прочно связываются с ДНК, отчего и увеличивается константа связывания. Как следует из табл.1, для комплексов ДНК-МТХ вследствие облучения k увеличивается приблизительно в 2 раза, а для комплексов ДНК-DX и ДНК-Nt – почти на порядок.

Изменение термодинамических параметров вследствие связывания ММ с ДНК определены по формулам (2) и (3) и приведены в табл.2. Как следует из табл.2, при образовании комплексов интеркалирующих (МТХ, DХ) и не интеркалирующих (Nt) противоопухолевых соединений с облученными нетепловыми МЭМВ, резонансными для колебаний молекулярных водных структур частотами ДНК, по сравнению с необлученными комплексами наблюдается увеличение абсолютных значений термодинамических параметров связывания. Отметим, что представленные значения для  $\Delta H$  находятся в хорошем соответствии с

результатами, полученными прямым микрокалориметрическим способом [25–27]. Несмотря на то, что при связывании с облученными ДНК  $\Delta H$  и  $\Delta S$  по абсолютному значению увеличиваются, однако, для интеркаляторов (МТХ и DX), вследствие связывания, в основном изменяется  $\Delta H$ , а для неинтеркалятора (Nt)  $-\Delta S$ . Следовательно, при образовании комплексов неинтеркалирующих соединений Nt с облученной ДНК, который взаимодействует с ДНК Ван-дер-Ваальсовыми силами и водородными связами, скелет двойной спирали претерпевает наибольшее изменение, вследствие чего и изменение  $\Delta S$  наибольшее. Более прочное связывание исследованных противоопухолевых соединений с облученными ДНК может приводить к заторможению деления опухолевых клеток, т.е. к увеличению эффективности противоопухолевых соединений. При комбинированном применении МЭМВ с противоопухолевыми соединениями вполне возможно получить желаемый противоопухолевый эффект при меньших концентрациях лекарственных препаратов. Отметим, что все используемые в клинике противоопухолевые препараты токсичны, слабо избирательны (помимо опухолевых клеток они воздействуют на здоровые клетки).

#### 4. Заключение

Обобщая вышеизложенные экспериментальные данные по связыванию противоопухолевых лекарственных соединений с ДНК, заранее облучёнными нетепловыми миллиметровыми электромагнитными волнами, резонансными для колебаний водных молекулярных структур, можно утверждать, что облученная ДНК образует более прочный комплекс с исследуемыми лекарственными соединениями, причем комплексообразование приводит к увеличению энтропии системы, которое наибольшее для соединений, связывающихся с ДНК внешним образом. Следовательно, полученные результаты по связыванию противоопухолевых соединений с облученным ДНК свидетельствуют о перспективности разработки новых оптимальных схем применения противоопухолевых соединений в комбинации с нетепловым миллиметровым облучением. Следует отметить, что почти все противоопухолевые соединения очень токсичны, помимо опухоли, они поражают и здоровые клетки. При комбинированном применении возможно получить тот же противоопухолевый эффект при более низкой концентрации лекарственных соединений, тем самим уменьшая нежелательный токсичный эффект противоопухолевых соединений.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1. O.V. Betskii, S.V. Savelev, L.A. Morozova. Biomedicine Engineering, 4, 42 (2017).
- 2. M.K. Logani, I. Szabo, V.R. Makar, A. Bhanushali, S.I. Alekseev, M.S. Ziskin. Bioelectromagnetics, 27, 258 (2007).
- 3. V.I. Petrosyan, N.I. Sinitsin, V.A. Elkin, N.D. Devyatkov. Biomedicine Engineering, 5, 62 (2001).
- 4. В.Н. Никифоров, А.В. Иванов, Е.К. Иванова, К.П. Тамаров. Биофизика, 61, 255 (2016).
- 5. M. Guran, P. Plataeu, M. Fioche. J. Biophys., 88, 1693 (2005).
- 6. T.V. Chalikian. J. Phys. Chem., 105, 12566 (2001).
- 7. V.P. Kalantaryan, R.S. Ghazaryan, Yu.S. Babayan, A.A. Tadevosyan. J. Contemp.

Phys., 57, 417 (2022).

- 8. V.P. Kalantaryan, S.N. Hakobyan, Yu.S. Babayan. J. Contemp. Phys., 52, 58 (2017).
- V. Kalantaryan, R. Martirosyan, Yu. Babayan, V. Petrosyan. Comp. Struct. Biotech. J., 21, 3437 (2023).
- 10. S.N. Hakobyan, M.A. Shahinyan, Yu.S. Babayan. Biophys. Rev. Let., 11, 139 (2016).
- 11. J. Kapuscinski, Z. Darzyankiewicz. Biochem. Pharmacol., 34, 4203 (1985).
- E.A. Levis, M. Munde, S. Wang, M. Rettig, V.Le, V. Machha, W.D. Wilson. Nucl. Acids Res., 39, 9649 (2011).
- M. Airodi, G. Bazone, G. Gennaro, A.M. Giuliani, M. Giustrini. Biochemistry, 53, 2197 (2014).
- 14. M. Enche, E. Volanski. Rev. Roum. Chem., 55, 255 (1988).
- D.B. Davies, D.A. Veselkov, M.P. Evstigneev, A.N. Veselkov. J. Chem. Soc. Percin. Trans., 2, 61 (2001).
- Yu.S. Babayan, S.N. Hakobyan, R.S. Ghazaryan, M.A. Shahinyan. Biophys. Rev. Let., 12, 165 (2017).
- 17. Ч. Кантор, П. Шиммел. Биофизическая Химия: т.3, Москва, Мир, 1985.
- 18. П.О. Вардеванян, М.А. Парсаданян, А.П. Антонян, С.Н. Акопян. Жур. Физ. Химии. 91,1071 (2017).
- 19. C. Perez-Arnaiz, Z. Busto, J.M. Leal, B. Garcia. J. Phys. Chem.B., 118, 1288 (2014).
- 20. J.B. Chaires. Annual Rev. Biophys., 37, 135 (2008).
- 21. Sh.N. Khan, M. Dnishuddin, A. Khan. Biosci. Rep., 30, 331 (2010).
- 22. P. Awashi, S. Dogra, R.J. Barthwal. Photochem. Photobiol. B, Biology, 127, 78 (2013).
- 23. Ю.Д. Нечипуренко. Биофизика, 59, 12 (2014).
- 24. А.А. Тадевосян, Л.Н. Петросян, М.А. Шагинян, Г.Л. Канарян. Биолог. журн. Армении, 70, 90 (2018).
- 25. F. Delben, F. Quadrifoglio, V. Giancotti, V. Crescenzi. Biopolymers, 21, 331 (1981).
- 26. J. Bhattacharya, A. Basu, G.S. Kumar. J. Chem. Thermodyn., 75, 45 (2014).
- 27. A.N. Lane, T.C. Jenkins. Quarterly Rev. Biophysics, 33, 255 (2000).

# THERMODYNAMIC PARAMETERS OF BINDING OF SMALL MOLECULES TO DNA IRRADIATED BY LOW-INTENSITY MILLIMETER ELECTROMAGNETIC WAVES

## V.P. KALANTARYAN, R.S. GHAZARYAN, Yu. S. BABAYAN

The interaction of biologically active molecules (BAM) with the biopolymer DNA, which performs the most important functions in a living organism having a double helical structure, irradiated with non-thermal electromagnetic millimeter waves, has been studied. It has been shown, that BAM (doxorubicin, mitoxantrone and netropsin) form more stable complexes with DNA irradiated with the resonant frequencies of natural vibrations of the molecular structures of water (64.5 GHz and 50.3 GHz). Under the influence of the above non-thermal millimeter waves, dehydration of the DNA molecule occurs, which leads to an increase in the binding constant of BAM to irradiated DNA. Calculations show that as a result of irradiation, the thermodynamic parameters of the binding of BAM to DNA change-enthalpy ( $\Delta H$ ) and entropy ( $\Delta S$ ): For all studied BAM,  $\Delta H$ <0, and  $\Delta S$ >0. The greatest change in entropy occurs for netropsin that binds externally to DNA.