



Биолог. журн. Армении, 3 (61), 2009

ВЛИЯНИЕ НЕТЕПЛОВЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ВОЛН МИЛЛИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА НА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ЛИГАНДОВ С ДНК

А.В.ГРИГОРЯН¹, А.П.АНТОНЯН², М.А.ШАГИНЯН²,
Г.А.МАНУКЯН¹, А.Т.КАРАПЕТАН¹

¹Երևանский государственный университет архитектуры и строительства, кафедра физики, E.mail: akapetyan@ysuac.am

²Երևանский госуниверситет, биологический факультет, кафедра биофизики, E.mail: biophys_dep@mail.ru

Исследовано взаимодействие бромистого этидия (БЭ) и Hoechst 33258 (H33258) с ДНК при различных ионных силах раствора под влиянием нетепловых когерентных электромагнитных волн ММ диапазона (ММ ЭМВ). Обнаружено, что параметры плавления облученных образцов комплексов БЭ-ДНК и H33258-ДНК претерпевают значительные изменения по сравнению с необлученными.

ДНК – БЭ - Hoechst 33258 - ММ ЭМВ - температура плавления - ширина интервала плавления

Հետազոտվել է ԴՆԹ-ի հետ էթիդիումի բրոմիդ (ԷԲ) և Hoechst 33258 (H33258) լիգանդների փոխազդեցությունը լուծույթի տարբեր իոնական ուժերի պայմաններում միլիմետրային տիրույթի էլեկտրամագնիսական ալիքների ազդեցության ներքո: Հայտնաբերվել է, որ ԷԲ-ԴՆԹ և H33258-ԴՆԹ կոմպլեքսների ճառագայթված նմուշների հալման պարամետրերը չճառագայթված նմուշների համեմատ զգալիորեն փոփոխվել են:

ԴՆԹ - ԷԲ - Hoechst 33258 - ՄՄ էՄՄ - հալման ջերմաստիճան - հալման միջակայքի լայնություն

The study of ethidium bromide (EtBr) and Hoechst 33258 (H33258) binding to DNA at different ionic strengths of solution under the influence of non-thermal coherent electromagnetic waves of MM range (MM EMW) is carried out. It is revealed that the melting parameters of the irradiated samples of DNA-EtBr as well as DNA-H33258 undergo significant changes as compared to unirradiated samples.

DNA – EtBr - Hoechst 33258 – MM EMW – melting temperature – melting interval

В настоящее время интенсивно изучается воздействие нетепловых электромагнитных волн миллиметрового диапазона (ММ ЭМВ) на биологические объекты. Одним из наиболее важных выводов таких исследований является то, что в этой области частот резонансные спектры воды и тканей организма человека идентичны. Такое подобие резонансных крайне высоких частот (КВЧ) органов человека и воды указывает на единую физическую природу взаимодействия ММ ЭМВ с молекулярной водной структурой в этих объектах [5].

При этом показано, что при малых пороговых уровнях мощности падающих электромагнитных волн существуют узкие полосы частот резонансного взаимодействия, связанные с внутренними естественными волновыми процессами в данных средах. Это указывает на то, что величина резонансных пиков определяется двумя факторами – структурным порядком молекулярной водной среды и уровнем интенсивности осциллирующей водных молекул, или уровнем их возбуждения, который зависит от температуры. Вне этих частот и уровней мощностей глубинные области водных и биологических сред недоступны для волн КВЧ.

Поскольку структурные и функциональные особенности биологических макромолекул связаны со средой, в которой они находятся, ММ ЭМВ в водных средах могут влиять и на молекулярные процессы с участием биологических макромолекул. В частности, степень гидратации ДНК имеет существенное значение при взаимодействии с лигандами, поскольку одним из факторов, стабилизирующих комплексы, является гидрофобный перенос молекул лиганда из свободного состояния в связанное [1, 6, 8]. Изменение структуры гидратной оболочки ДНК, вызванное ММ ЭМВ, может играть значительную роль в процессе комплексообразования классического интеркалятора бромистого этидия (БЭ) и в случае внешне связывающегося соединения Hoechst 33258 (H33258) с ДНК.

Целью данной работы явилось исследование влияния ММ ЭМВ на термодинамические параметры комплексов ДНК с БЭ и H33258 при разных ионных силах.

Материал и методика. В работе были использованы следующие препараты: ДНК тимуса теленка фирмы “Sigma” (США), H33258 фирмы “Sigma” (США), бромистый этидий – БЭ, “Serva” (Германия), HCl, NaOH (ос.ч.), ЭДТА (этилендиаминтетраацетат). Все препараты использованы без дополнительной очистки. Концентрации использованных препаратов были определены абсорбционным методом с использованием следующих коэффициентов экстинкции: ДНК тимуса теленка - $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, БЭ - $\epsilon_{480}=5850 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Hoechst 33258 - $\epsilon_{343}=42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Исследования проводили при ионных силах $\mu = 0,002; 0,01; 0,02; 0,05$ и $0,1 \text{ M Na}^+$.

Плавление ДНК и ее комплексов с лигандами осуществлялось на спектрофотометре PUE UNICAM-SP8-100 (Англия). Растворы препаратов помещали в 1см кварцевые кюветы с герметически закрытыми тефлоновыми крышками и помещали в термостатируемые ячейки спектрофотометра. Нагрев осуществляли с помощью температурного контролера SPX 876 Series 2 (Англия) с постоянной скоростью 0,25 град./мин. Данные поглощения образцов выводили на программируемый микрокалькулятор Hewlett Packard 97S I/O (США). Измерения каждого образца проводили пятикратно, после чего данные усредняли. Экспериментальная ошибка не превышала 10-15 %. Кривые плавления комплексов получали, как описано в [10].

Облучение проводили в специальном стеклянном сосуде. Толщина облучаемого слоя раствора ≈ 1 мм. Для облучения применяли источник сверхчастотных сигналов Г4-142. Стабильность частоты сигнала генератора составляет $\pm 0,05 \%$, а отклонение частоты выходного сигнала в режиме непрерывной генерации не превышает 6 МГц. Облучение образцов проводили при комнатной температуре, плотность потока мощности в месте нахождения образца при частоте 64,5 ГГц составляла $\approx 50 \text{ мкВт/см}^2$.

Для выявления влияния ММ ЭМВ на комплексообразование ДНК с лигандами водно-солевые растворы с разными ионными силами в течение 90 мин были облучены ММ ЭМВ с частотой 64,5 ГГц, после чего приготавливали комплексы. ДНК-лиганд комплексы в соответствующих растворах также были облучены ММ ЭМВ с той же частотой, после чего проводили плавление.

Во всех опытах одновременно с облученными образцами были получены кривые плавления необлученных образцов. Значения температуры (T_m), ширины интервала плавления (ΔT) ДНК и ее комплексов с лигандами, приготовленных в заранее облученных водно-солевых растворах, в пределах ошибки эксперимента совпадали с аналогичными параметрами образцов, полученных при облучении водно-солевых растворов комплексов ДНК с лигандами.

Результаты и обсуждение. Известно, что в образовании комплексов различных низкомолекулярных веществ с ДНК важную роль играют связанные с функциональными группами ДНК и лиганда молекулы воды [6,8]. Поэтому изменения состояния воды могут играть важную роль при взаимодействии ДНК с различными соединениями. Известно, что облучение воды и водно-солевых растворов ММ ЭМВ резонансными для нее частотами приводит к изменению ее структурированности [2,5], следовательно можно полагать, что эти волны могут влиять на термостабильность комплексов ДНК с лигандами. Для подтверждения этих предположений нами получены кривые плавления комплексов БЭ и Н33258 с ДНК при разных ионных силах раствора и при одном экспериментально выбранном наиболее оптимальном соотношении лиганд/ДНК=0,04.

Из кривых плавления необлученных и облученных ДНК и ее комплексов с лигандами определены температура T_m и ширина интервала плавления ΔT , с помощью которых получены значения δT_m и $\delta \Delta T$ при различных ионных силах μ ($\delta T_m = T_m - T_0$, где T_m – температура плавления комплексов ДНК-лиганд, T_0 – аналогичный параметр чистой ДНК; $\delta \Delta T = \Delta T - \Delta T_0$, где ΔT и ΔT_0 – ширина интервала плавления комплексов и чистой ДНК соответственно). На рис. 1 приведены зависимости δT_m (а) и $\delta \Delta T$ (б) комплексов ДНК с Н33258 от ионной силы раствора - μ . Как видно из приведенного рисунка, ход кривой зависимости δT_m от μ облученных комплексов (кр. 2) не отличается от хода кривой аналогичной зависимости, полученной для необлученных препаратов (кр. 1): они монотонно уменьшаются до $\mu \approx 4 \cdot 10^{-2}$ М Na^+ и дальнейшее увеличение концентрации соли не влияет на значения δT_m . Облучение водно-солевых растворов приводит к возрастанию T_m ДНК и ее комплексов с Н33258 по сравнению с величинами аналогичного параметра необлученных образцов (табл. 1), что является следствием стабилизации образцов под воздействием облучения.

Таблица 1. Значения T_m и ΔT облученных и необлученных ДНК и ее комплексов с Н33258 при различных ионных силах раствора.

μ_{Na^+}	ДНК				ДНК-EtBr			
	Необлученные		Облученные		Необлученные		Облученные	
	T_m	ΔT	T_m	ΔT	T_m	ΔT	T_m	ΔT
0.002	51.5	13.2	58,5	15.7	57.5	23.3	62.5	26
0.01	63	13.5	66.8	14	68.5	12.5	70	15
0.02	69	14.5	70.9	14.8	70	14.8	71.6	16.2
0.05	76.8	14.9	78.2	13.7	78.1	12.6	78.6	12.8
0.1	82.5	13	82.9	13	84	10	85.5	10

Этот факт может быть обусловлен тем, что облучение водно-солевых растворов в отсутствие и присутствии ДНК-лиганд комплексов практически одинаково влияет на структуру воды. Возрастание T_m облученных образцов, по всей вероятности, обусловлено увеличением структурированности воды в локальном окружении ДНК и ее комплексов с Н33258.

Это приводит к увеличению размеров гидратной оболочки макромолекулы, что в свою очередь приводит к возрастанию стабилизирующего влияния Н33258 на двухцепочечную (дц) структуру ДНК. На это указывает и тот факт, что $\delta\Delta T$ становится отрицательным только при ионных силах 0,05 и 0,1 М Na^+ в случае облученных образцов, в то время как для необлученных образцов значения $\delta\Delta T$ отрицательны в интервале изменения $0,01 \leq \mu \leq 0,1$ М Na^+ . Ранее нами было показано, что $\delta\Delta T$ комплексов ДНК с Н33258 имеет отрицательные значения в интервале изменения $0,01 \leq \mu \leq 0,02$ М Na^+ [11]. В этих условиях Н33258 предпочтительнее связывается с АТ последовательностями в малом желобке ДНК, дополнительно стабилизируют АТ-богатые участки, вследствие чего ΔT комплексов уменьшается [11].

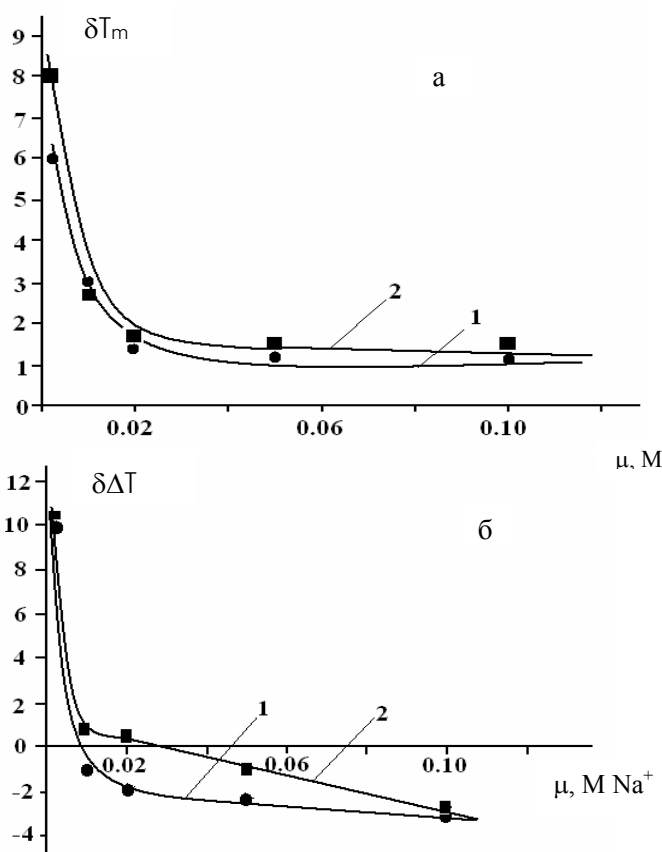


Рис.1. Зависимости δT_m (а) и $\delta\Delta T$ (б) комплексов ДНК с Н33258 от μ .
 Кр. 1 соответствуют необлученным, кр. 2 – облученным образцам.
 Концентрации ДНК- $5 \cdot 10^{-5}$ М. Н33258- $2 \cdot 10^{-6}$ г = (1/25) рН=6.9.

С другой стороны, было показано, что при $\mu \leq 0,002$ М Na^+ специфичность Н33258 к АТ последовательностям не проявляется и возможным способом связывания становится интеркаляция: в ходе плавления лиганд перераспределяется с расплавленных участков на двухспиральные, увеличивая ΔT [7].

Аналогичные исследования проведены и при взаимодействии БЭ с ДНК. На рис. 2 приведены зависимости δT_m (а) и $\delta\Delta T$ (б) комплексов ДНК с БЭ от μ , а соответствующие экспериментальные значения T_m и ΔT представлены в табл. 2.

Сравнение приведенных данных в табл. 1 и 2 показывает, что в случае комплексов ДНК с НЗ3258 при облучении δT_m возрастает, а в случае БЭ - δT_m уменьшается. Этот факт, вероятнее всего, обусловлен тем, что в случае НЗ3258 одним из стабилизирующих дц-структуру ДНК факторов являются водородные связи, образованные между нуклеотидными основаниями и молекулами лиганда [9]. При облучении степень гидратированности ДНК увеличивается и молекулы воды конкурируют с молекулами лиганда при образовании водородных связей с нуклеотидными парами, вследствие чего НЗ3258 предпочтительнее связывается интеркаляционным способом. В случае же связывания БЭ с ДНК увеличение степени гидратированности макромолекулы при облучении приводит к уменьшению энтропии комплексов, поскольку основным способом связывания лиганда с ДНК является интеркаляция. Вследствие этого переход из спирального в клубкообразное состояние облученных комплексов становится более предпочтительным с термодинамической точки зрения, из-за чего и δT_m уменьшается (рис. 1, а). Величина $\delta \Delta T$ при облучении комплексов ДНК с БЭ практически не меняется (кр. 2, рис. 2, б), в то время как в случае чистой ДНК этот параметр резко уменьшается в интервале изменения $0,002 \leq \mu \leq 0,04$ М Na^+ (кр. 1, рис.2, б) и претерпевает небольшое изменение при дальнейшем увеличении ионной силы раствора ($\mu > 0,04$ М Na^+). Ранее было показано, что $\delta \Delta T$ необлученных комплексов ДНК с БЭ уменьшается при увеличении ионной силы раствора [9, 10].

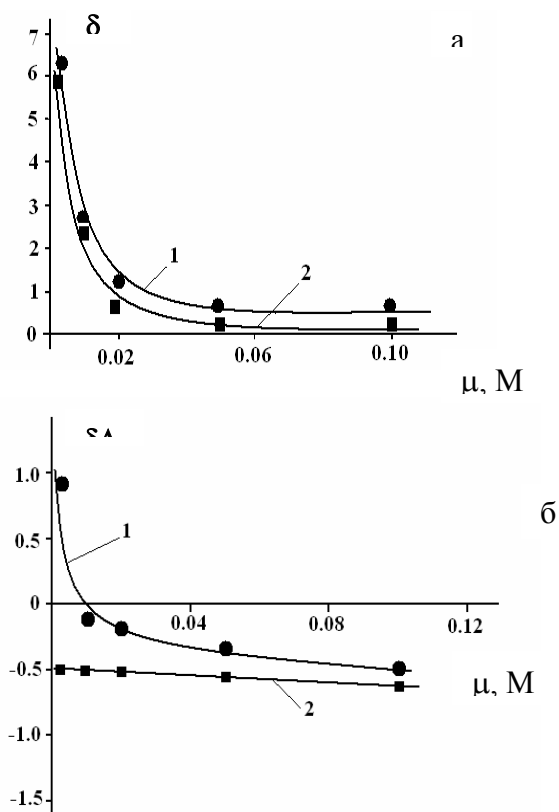


Рис. 2. Зависимости δT_m (а) и $\delta \Delta T$ (б) комплексов ДНК с БЭ от μ . Кр.1 соответствует необлученным, кр. 2 – облученным образцам.

Этот факт обусловлен тем, что при низких ионных силах спираль ДНК более раскручена и расстояние между плоскостями пар оснований больше, чем при высоких ионных силах [3,4].

Вследствие этого лиганд стабилизирует дц-структуру, вклиниваясь между парами оснований двухспиральной ДНК. При облучении в указанном интервале изменения ионной силы раствора степень гидратированности молекулы ДНК увеличивается, что и приводит к независимости интервала плавления комплексов от изменения ионной силы раствора.

Таблица 2. Значения T_m и ΔT облученных и необлученных ДНК и ее комплексов с БЭ при различных ионных силах раствора.

μ_{Na^+}	ДНК				ДНК-EtBr			
	Необлученные		Облученные		Необлученные		Облученные	
	T_m	ΔT	T_m	ΔT	T_m	ΔT	T_m	ΔT
0.002	52.1	13.2	58,5	13.1	55.3	25.1	61.2	24.6
0.01	63.9	13.5	66.8	13.3	65.2	24.8	67.6	24.3
0.02	69.8	14.5	70.9	14.3	72.2	18.5	73.0	18.0
0.05	77.1	14.9	78.2	14.6	79.1	12.9	79.3	12.3
0.1	81.9	13	82.9	12.6	82.6	12.2	83.7	11.6

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что облучение водно-солевых растворов комплексов ДНК с лигандами приводит к существенным изменениям структуры воды, что в свою очередь приводит к значительным изменениям термодинамических характеристик ДНК-лиганд комплексов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабаян Ю.С., Акоюн С.Н., Казарян Р.С., Калантарян В.П., Симонян Г.С., Хачатрян А.Б., Антонян А.П., Вардеванян П.О.* Биомедицинские технологии и радиоэлектроника, 11, с. 64-68, 2006.
2. *Бецкий О.В., Девятков Н.Д., Киселев В.В.* Биомедицина и радиоэлектроника, 4, с.13-29, 1998.
3. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. "Мир": М., 584, 1987.
4. *Кантор Ч., Шиммель П.* Биофизическая химия, 3, М., "Мир", 1985.
5. *Петросян В.И., Сеницин Н.И., Елкин В.А., Девятков Н.Д., Гуляев Ю.В.* Биомедицинская радиоэлектроника, N5-6, с. 62-114, 2001.
6. *Chaires J.V.* Biopolymers, 44, 201-215, 1998.
7. *Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Antonian A.P., Borisova O.F., Frank-Kamenetskii M.D.* J.Biomol. Struct. Dyn., 14, 2, 275-283, 1996.
8. *Lane A.N., Jenkins T.C.* Q. Rev. Biophys., 33, 3, 255-306, 2000.
9. *Parkinson J.A., Barber J., Douglas K., Rosamond J., Sharples D.* Biochemistry, 29, 0181-10190, 1990.
10. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetyan A.T.* Exp. And Mol. Med., 33, 4. 205-208, 2001.
11. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetyan A.T.* J.Biomol. Struct. Dyn., 25, 6, 641-646, 2008.

Поступила 29.06.2009.