

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ММ ЭМВ НА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ НОЕCHST 33258 С БИОМАКРОМОЛЕКУЛАМИ

Вардеванян П.О., Шагинян М.А., Микаелян М.С., Григорян С.В.

Ереванский государственный университет

ул. А. Манукяна, 1, г. Ереван, 0025, Республика Армения; e-mail: p.vardevanyan@ysu.am

Поступила в редакцию 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0481

Аннотация. В работе исследовано влияние электромагнитных волн миллиметрового диапазона (ММ ЭМВ) на особенности комплексообразования Ноеchst 33258 (Н33258) с биомакромолекулами – ДНК и сывороточным альбумином человека (САЧ) методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопий. Показано, что спектроскопические характеристики комплексов ДНК-Н33258 и САЧ-Н33258 зависят от частоты облучения ММ ЭМВ. Показано также, что при облучении частотой 41,8 ГГц воздействие ММ ЭМВ выражено гораздо слабее, чем при облучении частотой 50,3 ГГц, что подтверждает роль воды во влиянии ММ ЭМВ, поскольку частота 50,3 ГГц является резонансной частотой для воды. С другой стороны, показано, что облучение ММ ЭМВ приводит к понижению сродства Н33258 к биомакромолекулам, поскольку облучение ММ ЭМВ приводит к уменьшению параметров связывания Н33258 с ДНК и САЧ. Кроме того, облучение ММ ЭМВ приводит к тому, что тушение флуоресценции Н33258 с помощью ДНК и САЧ ослабевает. Важным заключением является и то, что облучение ММ ЭМВ с частотой 41,8 ГГц вызывает слабое изменение вышеотмеченных параметров комплексов ДНК-Н33258, в то время как на комплексы САЧ-Н33258 оставляет значительное влияние.

Ключевые слова: Ноеchst 33258, ДНК, сывороточный альбумин человека, комплексообразование, константа связывания, тушение флуоресцентной интенсивности.

В настоящее время актуальными и важными являются исследования, посвященные изучению влияния электромагнитных волн миллиметрового диапазона (ММ ЭМВ) на биологические системы, находящихся на различных уровнях организации [1-5]. ММ ЭМВ являются радиоволнами с частотным диапазоном 30-300 ГГц и длинами волн от 1 мм до 10 мм. Естественный фон ММ ЭМВ на Земле низкий, поэтому биологические системы в ходе эволюции не очень хорошо приспособлены к данному физическому фактору. С другой стороны, в течение последних десятилетий интенсивность ММ ЭМВ стремительно растет в окружающей среде, что связано с научно-техническим прогрессом. Поэтому очень важно иметь представление о том, как эти волны воздействуют на биологические объекты и какими механизмами происходит это влияние. Стоит также отметить, что диапазон миллиметровых волн представляет интерес еще потому что, в этом интервале находятся резонансные частоты воды [6]. В наши дни считается, что ММ ЭМВ воздействуют на биологические системы двумя группами механизмов: непосредственно влияя на биологический объект и второе – воздействуя на биологическую систему опосредовано через воду при облучении частотами, резонансными для воды. Следует также отметить, что иногда ММ ЭМВ могут иметь биологический эффект, влияя одновременно двумя механизмами. В большинстве случаев это зависит от частоты облучения. В данном случае исследовано влияние ММ ЭМВ на биологические системы, находящихся на молекулярном уровне – ДНК и сывороточный альбумин человека (САЧ) и их комплексы с Ноеchst 33258 (Н33258). ДНК в клетке все время находится в окружении различных низкомолекулярных веществ – лигандов, которые так или иначе взаимодействуют с молекулой ДНК, изменяя ее физикохимические характеристики, поэтому имеет смысл изучить ДНК в комплексе с лигандом, тем более, что многие лиганды имеют лекарственное значение и рассматриваются как потенциальное лечебное средство против многих генетических, аутоиммунных и онкологических заболеваний. С другой стороны, сывороточные альбумины, в том числе и САЧ, являются главными транспортными протеинами в кровотоке млекопитающих. Эти белки имеют большое значение как факторы, обеспечивающие осмотическое давление. Альбумины известны как главные белки в плазме крови, переносящие различные эндогенные и экзогенные вещества [7,8]. С другой стороны, Н33258 является ДНК-специфическим лигандом [9], поэтому интересно, как он будет взаимодействовать с САЧ при транспортировке кровотоком. В данной работе исследовано влияние ММ ЭМВ на некоторые характеристики комплексов Н33258 с ДНК и САЧ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использованы ДНК тимуса теленка (ГЦ-содержание почти 42%), сывороточный альбумин человека (1%-ный раствор), Ноеchst 33258 (“Sigma”, США), физиологический раствор. Все препараты использованы без дополнительной очистки. Концентрации ДНК и Н33258 определены спектрофотометрически, по следующим коэффициентам экстинкции: $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для ДНК и $\epsilon_{343}=42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для Н33258.

Облучение растворов ДНК и САЧ проведено с помощью генератора Г4-141 (“Исток”, Фриазино, РФ) с рабочим интервалом частот 37,5–53,5 ГГц и плотностью потока мощности $\approx 0,1 \text{ мВт/см}^2$ при мощности 8 мВт на выходе. Значение плотности потока мощности было зафиксировано на месте образца. Выходная мощность генератора измерялась с помощью головки термистра М5-49 и ваттметром М3-10А (“Исток”, Фриазино, РФ).

Частота выходного сигнала контролировалась волнометром СН2-25 (“Исток”, Фрязино, РФ). Стабильность частоты генератора в постоянном режиме работы считалась ± 15 МГц. Облучение растворов ДНК и САЧ проведено в дальней зоне конусообразной антенны с апертурой 32×32 мм на расстоянии 250 мм от излучающей плоскости антенны. Растворы ДНК и САЧ облучались сверху стеклянной чашки с диаметром 6 см, где толщина раствора составляла 1 мм, что, в свою очередь, позволило лучам проникать в объем раствора. Образцы облучались в течение 1 часа, частотами 41,8 ГГц и 50,3 ГГц. Специфическая скорость абсорбции (ССА) составляла ~ 20 мкВт/кг, что меньше для того, чтобы индуцировать термический эффект. Значение ССА рассчитано согласно описанному методу [10]. Электромагнитное поле было однородным. Контрольные образцы были выбраны следующим образом. Растворы ДНК и САЧ в течение 1 часа были расположены в экспозиционной зоне, при том, что выходная мощность генератора была приравнена к нулю. Затем этими растворами титрировали растворы Н33258.

Изучение комплексов ДНК и САЧ с Н33258 проведено спектроскопическими методами абсорбции и флуоресценции. Спектры поглощения получены на спектрофотометре PerkinElmer UV-VIS Lambda 365 (США) в интервале длин волн $300 \leq \lambda \leq 700$ нм. После получения спектра поглощения чистого лиганда, раствор лиганда титрировали необлученным и облученным растворами САЧ и ДНК. Концентрационное соотношение лиганд/биомолекула менялось от 1/2 до 1/10. Из полученных спектров поглощения были рассчитаны значения констант связывания по методу описанному в [11].

Спектры флуоресценции Н33258 и его комплексов с необлученными и облученными ДНК и САЧ были получены на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Австралия). Возбуждение образцов было осуществлено при длине волны 343 нм, а спектры флуоресценции были сняты в интервале $400 \leq \lambda \leq 600$ нм. После получения спектра флуоресценции чистого лиганда, лиганд раствора титрировали необлученными и облученными растворами ДНК и САЧ. Концентрационное соотношение лиганд/биомолекула менялось от 1/2 до 1/10. Из спектров флуоресценции получили кривые Штерна-Вольмера.

Ошибка измерений не превышала 4%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После получения спектров поглощения были рассчитаны значения констант связывания Н33258 с ДНК и САЧ. Значения констант связывания приводятся в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, облучение растворов ДНК и САЧ ММ ЭМВ частотой 50,3 ГГц приводит к уменьшению констант связывания во всех случаях. Почти в два раза уменьшение константы связывания свидетельствует о том, что облучение ММ ЭМВ с частотой 50,3 ГГц влияет на конформацию ДНК и САЧ таким образом, что понижается сродство лиганда к этим макромолекулам. Скорее всего, вокруг макромолекулы вода структурируется, повышается упорядоченность молекул воды, вследствие чего связывание Н33258 с макромолекулой затрудняется. При сильном способе взаимодействия Н33258 с ДНК в ее малом желобке, затрудняется доступ молекул лиганда к АТ-последовательностям ДНК, поэтому константа связывания сильно уменьшается. При слабом – электростатическом связывании Н33258 с фосфатными группами ДНК, имеет место повышение степени упорядоченности воды вокруг ДНК, из-за чего опять сила связывания уменьшается. В случае связывания Н33258 с САЧ, взаимодействие происходит водородными связями и ван-дер-Ваальсовыми силами [12]. В данном случае мы заключаем, что степень гидрофильности вокруг молекулы САЧ растет, из-за чего гидрофобные взаимодействия не вступают в силу и связывание затрудняется. С другой стороны, водородные связи могут возникать между Н33258 и упорядоченной водой, что также понижает эффективность связывания Н33258 с САЧ. Приведенные заключения подтверждаются еще и тем, что иная картина наблюдается при облучении ММ ЭМВ с частотой 41,8 ГГц. В таблице 2 приведены значения констант связывания Н33258 с ДНК и САЧ при облучении ММ ЭМВ с частотой 41,8 ГГц. Как видно из таблицы 2 при сильном связывании Н33258 с ДНК, при облучении ММ ЭМВ с частотой 41,8 ГГц константа связывания почти не меняется, не меняется также и константа связывания слабым способом. Это свидетельствует о том, что вода вокруг ДНК не меняет своей упорядоченности и, следовательно, сродство Н33258 к ДНК не меняется. При взаимодействии Н33258 с САЧ, облучение ММ ЭМВ с частотой 41,8 ГГц также не понижает константу связывания, более того, константа связывания увеличивается. Это увеличение может быть обусловлено тем, что облучение частотой 41,8 ГГц

Таблица 1. Значения констант связывания Н33258 с необлученными и облученными ДНК и САЧ с частотой 50,3 ГГц

		Необлученные образцы ($K \cdot 10^{-5}$)	Облученные образцы частотой 50,3 ГГц ($K \cdot 10^{-5}$)
ДНК-Н33258	Сильный способ	105 \pm 0,5	58 \pm 0,2
	Слабый способ	1,1 \pm 0,05	0,52 \pm 0,05
САЧ-Н33258		0,33 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02

Таблица 2. Значения констант связывания Н33258 с необлученными и облученными ДНК и САЧ с частотой 41,8 ГГц

		Необлученные образцы ($K \cdot 10^{-5}$)	Облученные образцы частотой 41,8 ГГц ($K \cdot 10^{-5}$)
ДНК-Н33258	Сильный способ	105±0,5	101±0,3
	Слабый способ	1,1±0,05	1,3±0,08
САЧ-Н33258		0,33±0,02	0,41±0,01

воздействует непосредственно на белок, изменяет конформацию САЧ, в результате чего связывание с Н33258 происходит сильнее.

Для дальнейшего подтверждения вышеотмеченных заключений, проведены флуоресцентно-спектроскопические исследования. Получены спектры флуоресценции Н33258 и его комплексов с ДНК и САЧ (спектры не приводятся) при облучении ММ ЭМВ частотами 41,8 ГГц и 50,3 ГГц и без облучения. На основании спектров флуоресценции построены кривые Штерна-Вольмера (рис. 1).

Из кривых Штерна-Вольмера видно, что облучение приводит к уменьшению коэффициента тушения, при этом в зависимости от частоты облучения степень уменьшения K_{SV} разная. В таблице 3 представлены значения коэффициента Штерна-Вольмера. Данные, представленные в таблице 3, свидетельствуют о том, что при облучении САЧ, коэффициент тушения уменьшается, однако, при частоте 41,8 ГГц уменьшается в 1,2 раза, в то время как при частоте 50,3 ГГц уменьшается в 2,2 раза. Этот результат находится в согласии с данными, полученными абсорбционно-спектроскопическим методом и утверждает вышесделанное заключение о том, что при облучении ММ ЭМВ с частотой, резонансной для воды – 50,3 ГГц, упорядоченность воды растет в том числе и в окружении макромолекулы, вследствие чего сродство Н33258 к САЧ уменьшается. При связывании Н33258 с ДНК также наблюдается уменьшение коэффициента Штерна-Вольмера, при этом при облучении ММ ЭМВ с частотой 41,8 ГГц K_{SV} меняется слабо. При облучении ММ ЭМВ с частотой 50,3 ГГц значение K_{SV} уменьшается значительным образом, почти в 3,1 раза.

Таким образом, исходя из полученных данных абсорбционно- и флуоресцентно-спектроскопическими методами, можно заключить, что облучение макромолекул ММ ЭМВ приводит к понижению сродства Н33258 к САЧ и ДНК. При этом, уменьшение выражено при облучении частотой, резонансной для воды – 50,3 ГГц, а при не резонансной частоте уменьшением можно пренебречь в случае ДНК. Это свидетельствует о том, что при

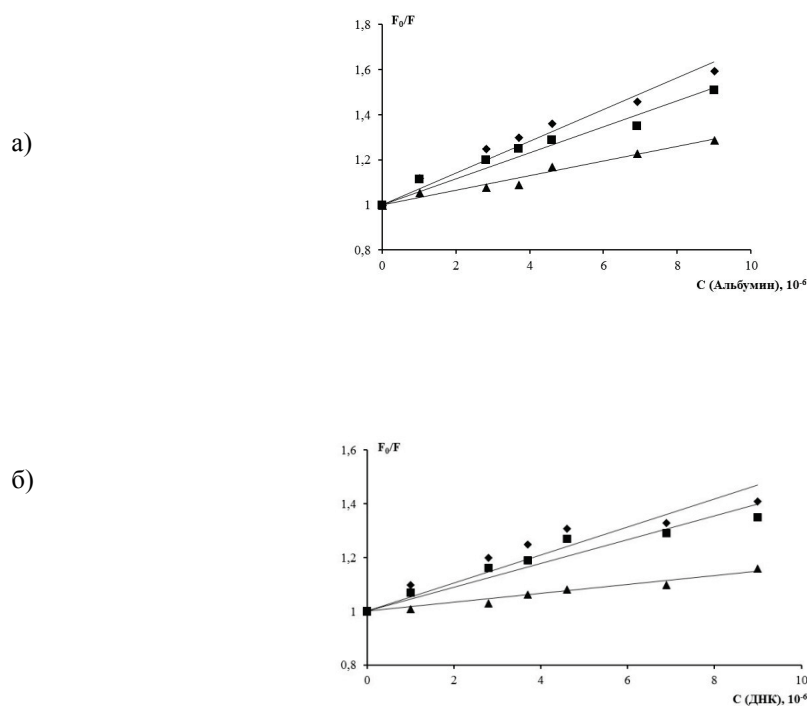


Рисунок 1. Характеристические кривые Штерна-Вольмера при взаимодействии САЧ (а) и ДНК (б) с Н33258. Сверху вниз кривые соответствуют случаям без облучения, с облучением ММ ЭМВ частотой 41,8 ГГц и 50,3 ГГц соответственно

Таблица 3. Значения констант Штерна-Вольмера для H33258 при связывании с САЧ и ДНК

	Значения констант тушения ($K_{SV} \cdot 10^{-4}$) (л/моль)	
	САЧ-H33258	ДНК-H33258
Необлученный образец	7,04±0,08	5,2±0,06
Облученный образец ММ ЭМВ с частотой 41.8 ГГц	5,8±0,06	4,4±0,06
Облученный образец ММ ЭМВ с частотой 50.3 ГГц	3,2±0,03	1,65±0,04

облучении частотой 50,3 ГГц, упорядоченность воды растет, из-за чего макромолекула экранируется водными молекулами и становится труднодоступной для лигандов, связывающихся с ними. При облучении САЧ частотой 41,8 ГГц наблюдается увеличение константы связывания H33258 с САЧ, что является результатом непосредственного воздействия облучения на белок и изменения его конформации. В конечном итоге сродство H33258 к САЧ, облученного частотой 41,8 ГГц, растет.

Список литературы / References:

1. Zhao R., Zhang S., Xu Z., Ju L., Lu D., Yao G. Studying gene expression profile of rat neuron exposed to 1800 MHz radio-frequency electromagnetic fields with cDNA microassay. *Bioelectromagnetics*, 2007, vol. 235, doi: 10.1016/j.tox.2007.03.015.
2. Zhang M., Li X., Bai L., Uchida K., Bai W., Wu B., Xu W., Zhu H., Huang H. Effects of low frequency electromagnetic field on proliferation of human epidermal stem cells: An in vitro study. *Bioelectromagnetics*, 2013, vol. 34, doi: 10.1002/bem.21747.
3. Romanenko S., Siegel P.H., Wagenaar D.A., Pikov V. Effects of millimeter wave irradiation and equivalent thermal heating on the activity of individual neurons in the leech ganglion. *Journal of Neurophysiology*, 2014, vol. 112, doi: 10.1152/jn.00357.2014.
4. Trosic I., Busljeta I., Modlic B. Investigation of the genotoxic effect of microwave irradiation in rat bone marrow cells: in vivo exposure. *Mutagenesis*, 2004, vol. 19, no. 5, doi: 10.1093/mutage/geh042.
5. Abdolmaleki A., Sanginbadi F., Rajabi A., Saberi R. The effect of electromagnetic waves exposure on blood parameters. *International Journal of Hematology, Oncology and Stem Cell Research*, 2012, vol. 6, no. 2.
6. Петросян В.И., Синицын Н.И., Елкин В.А., Девятков Н.Д., Гуляев Ю.В. Роль молекулярно-волновых процессов в природе и их использование для контроля и коррекции состояния экологических систем. *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2001, № 5-6. [Petrosyan V.I., Sinityn N.I., Elkin V.A., Devyatkov N.D., Gulyaev Yu.V. The role of molecular wave processes in nature and their use for monitoring and correcting the state of ecological systems. *Biomedical Radioelectronics*, 2001, no. 5-6. (In Russ.)]
7. Yang G.-D., Li C., Zeng A.-G., Zhao Y., Yang R., Bian X.-L. Fluorescence spectroscopy of osthole binding to human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2013, vol. 3, no. 3, doi: 10.1016/j.jpha.2012.10.002.
8. He X.M., Carter D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 1992, vol. 358, no. 186, doi: 10.1038/358209a0.
9. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetian A.T. Influence of ionic strength on Hoechst 33258 binding to DNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2008, vol. 25, no. 6, doi: 10.1080/07391102.2008.10507210.
10. Gapeyev A.B., Mikhailik E.N., Chemeris N.K. Anti-inflammatory effects of low-intensity extremely high-frequency electromagnetic radiation: Frequency and power dependence. *Bioelectromagnetics*, 2008, vol. 29, doi: 10.1002/bem.20381.
11. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H., Karapetyan A.T. The binding of ethidium bromide with DNA: Interaction with single- and double-stranded structures. *Experimental and Molecular Medicine*, 2004, vol. 35, no. 6, doi: 10.1038/emm.2003.68.
12. Vardevanyan P.O., Shahinyan M.A., Petrosyan N.H., Mamasakhlisov Y.S. Spectroscopic study of protein complexes with low-molecular compounds. *Journal of Contemporary Physics (Armenian Academy of Sciences)*, 2021, vol. 56, no. 1, doi: 10.3103/S1068337221010126.

STUDY OF THE EFFECT OF MM EMW ON COMPLEX-FORMATION OF HOECHST 33258 WITH BIOMACROMOLECULES**Vardevanyan P.O., Shahinyan M.A., Mikaelyan M.S., Grigoryan S.V.**

Yerevan State University

A. Manoogian str., 1, Yerevan, 0025, Armenia; e-mail: p.vardevanyan@ysu.am

Received 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0481

Abstract. In this work the effect of millimeter range electromagnetic waves (MM EMW) on complex-formation peculiarities of Hoechst 33258 (H33258) with biomacromolecules – DNA and human serum albumin (HSA) has been studied by the methods of absorption and fluorescence spectroscopies. Spectroscopic characteristics of the complexes DNA-H33258 and HSA-H33258 were shown to depend on the irradiation frequency of MM EMW. It was also shown that at the irradiation by the frequency 41.8 GHz the effect of MM EMW is pronounced weaker, than at the irradiation by 50.3 GHz, which maintains the water role in the influence of MM EMW, since the frequency 50.3 GHz is resonant one for water. On the other hand, it was revealed that the irradiation of MM EMW leads to decreasing of H33258 affinity to biomacromolecules, since the MM EMW irradiation results in decreasing of the binding parameters of H33258 to DNA and HSA. Besides, the MM EMW irradiation results in the weakening of H33258 fluorescence by DNA and HSA. The important conclusion also is the fact that the irradiation of MM EMW by the frequency 41.8 GHz invokes a weak change of the aforementioned parameters of the complexes DNA-H33258, while it leaves a significant influence on the complexes HSA-H33258.

Key words: *Hoechst 33258, DNA, human serum albumin, complex-formation, binding constant, fluorescence intensity quenching.*