

тугоухости, отоакустическая эмиссия, вестибулярная loss, otoacoustic emission, vestibular function, mice.
 функция, мыши.

Стаття надійшла 1. 03. 2016 р.

Рецензент Запорожець Т.М.

УДК 577.113.4:546.719

К.В. Парамонова, О.А. Голіченко, С.О. Бабій, О.В. Штеменко, Н.І. Штеменко
 Дніпропетровський Національний Університет ім. О.Гончара, Український Державний
 Хіміко-Технологічний Університет, Державна установа «Інститут гастроентерології
 НАМНУ», м. Дніпропетровськ, Інститут біохімії імені О.В.Палладіна АН України, м. Київ

ВЗАЄМОДІЯ ДНК З КЛАСТЕРНИМИ СПОЛУКАМИ РЕНІЮ РІЗНИХ СТРУКТУРНИХ ТИПІВ

Вивчено взаємодію ДНК з кластерними сполуками Ренію(III) трьох структурних типів, що відрізняються кількістю та орієнтацією органічних лігандів навколо кластерного фрагменту Re_{26+} методом електронної спектроскопії. Підтверджено механізм взаємодії цис-, транс-дикарбоксилатів та тетракарбоксилату диренію(III) із суперспіралізованим полінуклеотидом шляхом ковалентного зв'язування, утворення комплексу сполука Ренію(III) – нуклеїнова основа з наступним розплетенням спіралі ДНК. Показано, що така взаємодія має особливості при низьких і високих концентраціях кластерних сполук Ренію та відрізняється для різних структурних типів. Показано редокс-активацію процесу взаємодії сполук Ренію та ДНК, що може пояснити показану раніше синергічну або адитивну антиканцерогенну дію сполук Ренію та Платини.

Ключові слова: кластерні сполуки Ренію(III), ДНК, розплетення ДНК, редокс-активація.

Робота є фрагментом НДР «Координаційні сполуки $Re(I,III)$ та $Zr(IV)$ як основа для синтезу нових біологічно активних речовин та функціональних матеріалів», № держреєстрації 0114U002488.

У наших роботах вивчалася взаємодія ДНК з одним із представників цис-дикарбоксилатів диренію(III) [15] та взаємодія нуклеїнових основ із сполукою, яка належить до тетракарбоксилатів диренію(III) [16]. У цих роботах було доведено факт взаємодії комплексних сполук ренію(III) як із суперспіралізованим полінуклеотидом, так і з нуклеїновими основами пуринового ряду шляхом ковалентного зв'язування і утворенням комплексу сполука Ренію(III) – нуклеїнова основа. З іншого боку, в експериментах *in vivo* було продемонстровано високоефективну протипухлинну активність цис-, транс- дикарбоксилатів та тетракарбоксилатів диренію(III) [13-16]. Також було припущено, що синергічний або адитивний протипухлинний ефект сполук Ренію та Платини, який спостерігався за одночасного введення цих сполук щурам-пухлиноносцям, може бути наслідком процесу редокс-активації комплексних сполук Ренію(III) у клітинах пухлин внаслідок прооксидантного стану їхнього внутрішньоклітинного середовища, що підсилюється введенням сполук Платини.

Метою роботи було дослідження взаємодії кластерних сполук Ренію(III) трьох структурних типів [3], а саме - цис-, транс-дикарбоксилатів та тетракарбоксилату диренію(III), які відрізняються кількістю та орієнтацією органічних лігандів навколо кластерного фрагменту Re_{26+} , з ДНК та з'ясування питання про можливість редокс-активації цих взаємодій.

Матеріал та методи дослідження. У роботі досліджувалися кластерні сполуки Ренію: біс-диметилсульфоксид-цис-тетрахлориди- μ -півалатодиреній(III) (cis- $Re_2((CH_3)_3CCOO)_2Cl_4 \cdot 2DMSO$) (I); транс-тетрахлориди- μ -півалатодиреній(III) (trans- $Re_2((CH_3)_3CCOO)_2Cl_4$) (II); біс-диметилсульфоксид-цис-тетрахлориди- μ -ізобутиратодиреній(III) (cis- $Re_2(i-C_3H_7COO)_2Cl_4 \cdot 2DMSO$) (III); транс-тетрахлориди- μ -ізобутиратодиреній(III) (trans- $Re_2(i-C_3H_7COO)_2Cl_4$) (IV); дихлоротетра- μ -ізобутиратодиреній(III) ($Re_2(i-C_3H_7COO)_4Cl_2$) (V), які були синтезовані за процедурою [15, 16]. ДНК тимусу теляти (СТ-ДНК), з середньою молекулярною масою 328Да на один нуклеотид, з молярним коефіцієнтом поглинання $\epsilon_{260} = 0,6600 \cdot 10^4 M^{-1} cm^{-1}$, придбали в Serva, Німеччина.

Електронні спектри поглинання (ЕСП) поглинання були виміряні на спектрофотометрі HP 8453 фірми «Newlett Paskard» у діапазоні від 220 нм до 400 нм за процедурою [5]. Рівень чистоти дослідної ДНК встановлювали шляхом розрахунку співвідношення показників поглинання СТ-ДНК при 260 нм та 280 нм, що становило менше ніж 1,8. Це вказувало на чистоту зразку СТ-ДНК, вільної від білкових молекул. Досліди з титруванням СТ-ДНК сполуками Ренію були проведені з фіксованими концентраціями СТ-ДНК (0,12 мкМ) у Tris-HCl буфері (5 мМ, pH 7,5) та в присутності 20 мМ NaCl. Розчин комплексу Ренію та СТ-ДНК інкубували протягом 5 хвилин, після чого були зняті спектри поглинання. Окрім того, було проведено титрування СТ-ДНК кластерними сполуками Ренію

у різних середовищах: у Tris-HCl буфері (5 мМ, рН 7,5) та в присутності 20 мМ NaCl, у присутності гідроген пероксиду (10–6 мМ) та меркаптоетанола (10–6 мМ).

Константи зв'язування, K_b (M⁻¹) розраховували за наступною формулою: $1/(A-A_0)=1/A_0+1/[K_b \times A_0 \times C(\text{комплекс})]$, (1), де A_0 та A значення поглинання розчину СТ-ДНК до та після додавання комплексу ренію, а $C(\text{комплекс})$ моль/л та K_b л/моль - концентрація сполуки Ренію та константа взаємодії відповідно [5, 14].

Результати дослідження та їх обговорення. На рис. 1 зображено електронні спектри поглинання СТ-ДНК при додаванні II, які є типовими для усіх сполук, що вивчаються.

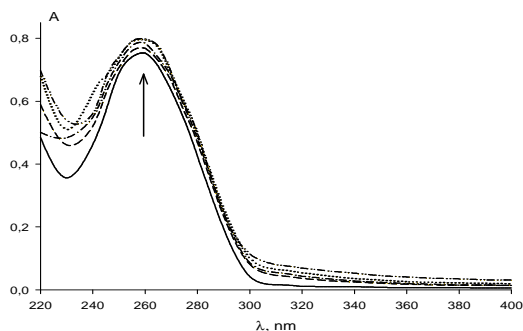


Рис. 1. Електронні спектри поглинання СТ-ДНК (-) при додаванні II: 10 μM (---), 20 μM (- · - · -), 100 μM (·····), 200 μM (- - - - -).

Ще одна важлива характеристика ультрафіолетових ЕСП СТ-ДНК, за дії різних речовин, – це зміна довжини хвилі максимуму поглинання, тобто, зсув у червону, довгохвильову область поглинання (червоний, батохромний зсув), або у синю – короткохвильову область поглинання (синій, гіпохромний зсув) відносно 260 нм. Обидва зсуви свідчать про утворення нового адукту, ДНК-речовина, а характер зсуву свідчить про напрямок зміни енергії π - π^* переходів, в основах нуклеїнових кислот. Наприклад, зсув піку поглинання (260 нм) у червону зону, свідчить про інтеркаляцію комплексу між комплементарними парами нуклеїнових основ СТ-ДНК та утворення кон'югованого адукту з інтеркалятором, з відповідним зменшенням енергії поглинання [8].

У наших експериментах при співвідношеннях [ДНК]:[сполука Ренію] від 1:84 до 1:1680 у ЕСП спектрах не виявлено значних відхилень від основного максимуму поглинання. Проте, деякі відхилення спостерігаються при збільшенні концентрацій речовин I-V (таблиця 1).

Таблиця 1

Характеристика ЕСП спектрів кластерних сполук Ренію з СТ-ДНК

Характеристики	Кластерні сполуки Ренію				
	I	II	III	IV	V
$\Delta\lambda$, нм ([ДНК]: [сполука Ренію])	-5 (1:840) +4 (1:840)	-	-5 (1:1680) +4 (1:1680)	-	-
Наявність нових піків, нм ([ДНК]: [сполука Ренію])	330 (1:840) плече	320 (1:420) плече 240 (1:420) плече	240 (1:420) плече	320 (1:420) плече	320 (1:1680) плече

Наприклад, у ЕСП сполуки III за співвідношення концентрацій 1:1680 різниця з довжиною хвилі максимуму поглинання інтактної СТ-ДНК $\Delta\lambda$ дорівнює: $255-260 = -5$ нм, що вказує на утворення нового ДНК-III адукту з ковалентним зв'язком між комплексом Ренію та ДНК [11].

Важливо також відмітити нові піки поглинання, які з'являються при високих концентраціях комплексів Ренію (Табл.1), та є наслідком поглинання нових адуктів СТ-ДНК-сполука Ренію, що ще раз підтверджує можливість утворення ковалентних взаємодій між СТ-ДНК та кластерними сполуками Ренію. Проте, ці комплекси мають зменшену енергію збудження π - π^* переходів в основах нуклеїнових кислот СТ-ДНК, тобто утворюються внаслідок взаємодії π -електронних хмар нуклеїнових основ і лігандів, які оточують кластерний ренієвий фрагмент.

Цікаво порівняти спектри дикарбоксилатних комплексів Ренію цис- та транс- конфігурації з півалатними (рис. 2а) та ізобутиратними (рис. 2б) лігандами при високих концентраціях сполук Ренію та тетракарбоксилатного комплексу V (рис. 2б).

Очевидно, що за однакових концентраційних співвідношень ДНК-сполука Ренію з півалатними лігандами (Рис. 2а), спектри поглинання розчинів ДНК-I і ДНК-II мають суттєві різниці, а саме – цис-сполука I взаємодіє набагато сильніше, ніж транс-сполука II, оскільки присутній виражений гіперхромний ефект основного максимуму поглинання та виникає збільшення максимумів поглинання (плече) при 240 та 320 нм.

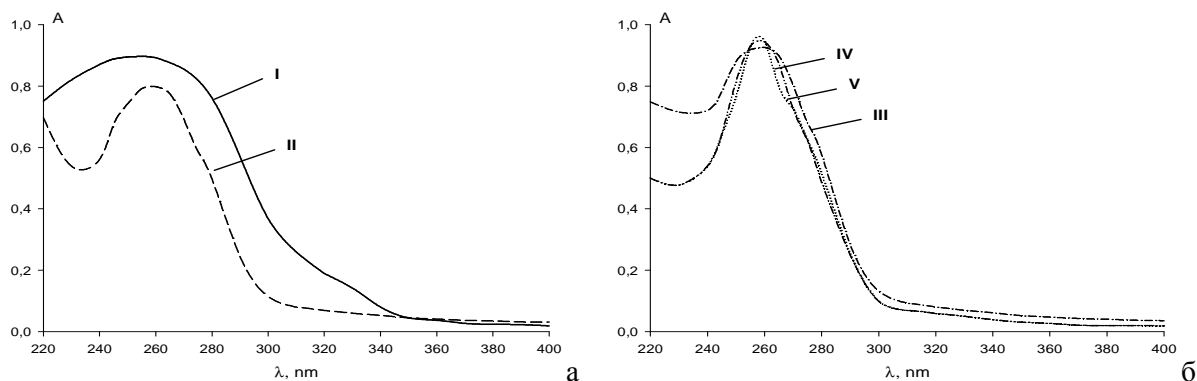


Рис. 2. Електронні спектри поглинання СТ-ДНК при додаванні I (—), II (---), III (· · ·), IV (- · - ·), V (- - -), співвідношення концентрацій ДНК-сполука Ренію 1:1680.

Гіперхромний ефект спостерігається також при додаванні III, при цьому при високих концентраціях сполук Ренію відмічено згладжування піку в зоні 240 – 268 нм, тобто значення $\delta\lambda$ становить від -5 до +4. Проте, різниця в спектрах цис- і транс-сполук Ренію з ізобутиратними лігандами III і IV і ДНК (рис. 2б) не така значна, як різниця у спектрах I і II з ДНК. Більше того, спектральна картина для комплексу ДНК-V, який є тетраізобутиратним похідним диренію, свідчить про менш інтенсивну взаємодію V з ДНК, ніж обидва цис-комплекси I і III. Отже, можна зробити висновок, що при високих концентраціях сполук Ренію у взаємодії з ДНК основну роль відіграє розгалуженість алкільного залишку органічного радикалу (гідрофобність, найбільша у півалатного ліганду), а не кількість органічних радикалів навколо кластерного фрагменту. Шляхом побудови графіку залежності $1/(A-A_0)$ від $1/C$, відповідно до формули (1), розраховано константи взаємодії комплексів з ДНК (Табл.2), що знаходяться у межах $10^2 - 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Таблиця 2

Константи зв'язування кластерних сполук Ренію з СТ-ДНК (M^{-1})

	Кластерні сполуки Ренію				
	I	II	III	IV	V
Кб	$2,221 \times 10^3$	$1,123 \times 10^3$	$6,012 \times 10^2$	$3,086 \times 10^2$	$3,035 \times 10^2$
Кбз гідроген пероксидом	$2,462 \times 10^3$	$5,338 \times 10^3$	$1,036 \times 10^3$	$1,524 \times 10^3$	–
Кбз меркаптоетанолом, M-1	$13,995 \times 10^3$	$5,466 \times 10^3$	$5,351 \times 10^3$	$1,835 \times 10^3$	–

Як і очікувалось, розраховані значення констант зв'язування менші, ніж для класичного інтеркалятора етидій броміду ($1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) [2], для сполук, що несуть інтеркаляційні групи [7, 9], та цисплатину ($5,73 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$). Значення констант для комплексів Ренію знаходяться у діапазоні $3,035 \times 10^2 - 2,221 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Вищенаведені міркування щодо порівняння ЕСП досліджених сполук з ДНК цілком підтверджуються величинами розрахованих констант зв'язування. Так, для півалатних похідних I і II ці величини на порядок більші, що підтверджує зроблене нами спостереження: зростання індукційного ефекту із збільшенням розгалуженості алкільного залишку органічного ліганду призводить до посилення взаємодії з ДНК, що і віддзеркалюється у зростанні значень константи зв'язування для півалатних похідних у порівнянні з відповідними комплексами Ренію з ізобутиратними лігандами.

Одержані значення Кб свідчать про те, що I – V зв'язуються з ДНК з більш низькою спорідненістю, ніж класичні інтеркалятори, але це відносно високі константи зв'язування, порівняно з іншими, неінтеркалюючими комплексами [1, 10]. Виходячи з отриманих даних, можна зробити висновок про неінтеркаляційну природу взаємодії СТ-ДНК з комплексами Ренію. Різниця у константах зв'язування досліджуваних кластерних сполук Ренію може бути пояснена різними комплексами з ДНК, які вони утворюють при високих концентраціях, як показано вище, тобто саме у діапазоні високих концентрацій сполук Ренію. Цис-дикарбоксилати виявилися найбільш активними у взаємодії з ДНК, ніж транс-дикарбоксилати, проте, пояснення цього явища потребує додаткових досліджень.

При титруванні СТ-ДНК гідроген пероксидом або меркаптоетанолом спостерігається гіпохромний ефект, слабкий при низьких концентраціях та більш значний при високих концентраціях речовин, що додаються (Рис.3).

Це свідчить про інший механізм взаємодії цих речовин, у порівнянні зі сполуками Ренію, який не призводить до значного розплетення спіралі ДНК. Проте, якщо після цього провести

титрування СТ-ДНК кластерною сполукою Ренію, відбувається різке підвищення поглинання у області поглинання нуклеїнових основ. На рисунку 4 показано залежність інтенсивності поглинання у області 260 нм при титруванні сполукою І розчину ДНК з гідроген пероксидом. Схожа закономірність спостерігається для розчину ДНК з меркаптоетанолом.

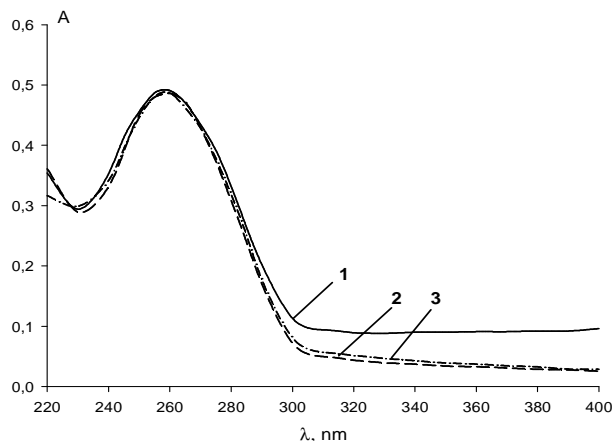


Рис. 3. Електронні спектри поглинання СТ-ДНК (1) (—) з додаванням гідроген пероксиду (2) (---), меркаптоетанолу (3) (- · - ·); співвідношення концентрацій ДНК-гідроген пероксид та ДНК-меркаптоетанол 1:1680.

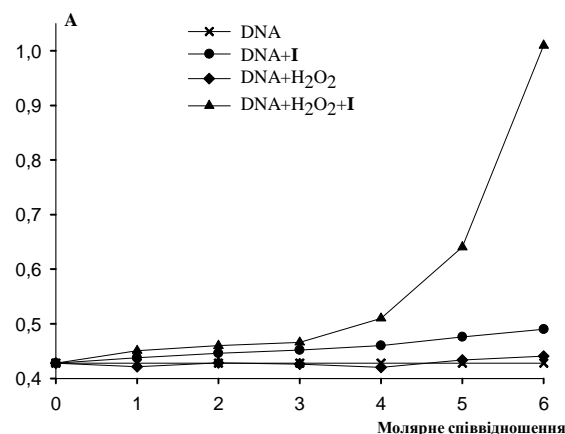


Рис. 4. Інтенсивність поглинання (A) у області 260 нм. Співвідношення концентрацій ДНК-гідроген пероксид та ДНК – I: 1- 1:84; 2 - 1:168; 3 - 1:252; 4 - 1:420; 5 - 1:840; 6 - 1:1680.

Константа зв'язування з ДНК зростає при цьому у декілька разів (табл. 2). Це свідчить про наявність окисно-відновного, або хімічного каталізу у системі, наприклад, гідроген пероксид – сполука Ренію – ДНК, який призводить до значного порушення просторової структури біомолекули.

Такі зміни відбуваються непропорційно до збільшення концентрації комплексу в розчині, що підтверджує каталітичний характер взаємодій, що ми вивчаємо. Отримані нами дані підтверджують віднесення механізму взаємодії кластерних сполук Ренію у живій клітині, як механізму редокс-активації антиканцерогенних препаратів, або так званої продраг-стратегії «prodrug strategy» [4, 12], яка пояснює активність деяких препаратів, на кшталт, нетоксичних кластерних сполук Ренію, що стають активними тільки у раковій клітині, де редокс-статус набагато відрізняється від редокс-статусу звичайної клітини.

Таким чином, вперше вивчено взаємодію ДНК тимусу теляти з кластерними сполуками Ренію, до складу яких входять ізобутиратні та півалатні ліганди методом електронної спектроскопії. Показано, що при низьких концентраціях кластерних сполук Ренію відбувається взаємодія з нуклеїновими основами, що не залежить від природи та орієнтації лігандів навколо біядерного фрагменту, найімовірніше, через його аксіальні положення, що призводить до розплетення спіралі ДНК.

За високих концентрацій сполук Ренію(III), можливе утворення комплексів з нуклеїновими основами, де відбувається взаємодія між π -електронною густиною нуклеїнових кислот і лігандами, що наявні у структурі кластерних сполук Ренію. Цис-дикарбоксилати виявилися найбільш активними у взаємодії з ДНК, ніж транс-дикарбоксилати. Проте, при високих концентраціях сполук Ренію у взаємодії з ДНК основну роль відіграє розгалуженість алкільного залишку органічного радикалу (гідрофобність, найбільша у півалатного ліганду), а не кількість органічних радикалів навколо кластерного фрагменту.

Висновок

Показано залежність механізму взаємодії ренієвих сполук та ДНК від наявності у розчинах гідроген пероксиду та меркаптоетанолу, що пояснює раніше показану синергічну антиканцерогенну дію сполук Ренію і Платини та підтверджує механізм взаємодії, що включає редокс-активацію кластерних сполук Ренію.

Перспективи подальших розробок полягають у встановленні механізму редокс-активації процесу взаємодії сполук Ренію та ДНК, що дозволить пояснити синергічну або адитивну антиканцерогенну дію сполук Ренію та Платини.

Список літератури

1. Angeles-Boza A. M. DNA binding and photocleavage in vitro by new dirhodium(II) dppz complexes: Correlation to cytotoxicity and photocytotoxicity / A. M. Angeles-Boza, P. M. Bradley, K.-L. Patty [et al.] // Inorg. Chem. – 2004. – Vol. 43. – P. 8510–8519.

2. Chouai A. Ruthenium(II) complexes of 1,12-diazaperylene and their interactions with DNA / A. Chouai, S. E. Wicke, C. Turro [et al.] // *Inorg. Chem.* – 2005. – Vol. 44. – P. 5996–6003.
3. Golichenko A. A. Cluster Rhenium(III) Complexes with Adamantanecarboxylic Acids: Synthesis and Properties / A. A. Golichenko, A. V. Shtemenko // *Rus. J. Coord. Chem.* – 2006. – Vol. 32. – P. 242–249.
4. Graf N. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery / N. Graf, S. J. Lippard // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2012. – Vol. 64. – P. 993–1004.
5. Jakupec M. A. Antitumour metal compounds: more than theme and variations / M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion [et al.] // *Dalton Trans.* – 2008. – Vol. 44. – P. 183–194.
6. Keck M. V. Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium relate complexes / M. V. Keck, S. J. Lippard // *J. Am. Chem. Soc.* – 1992. – Vol. 114. – P. 3386–3390.
7. Kumar L. Synthesis, characterization, antioxidant, antimicrobial, DNA binding and cleavage studies of mononuclear Cu(II) and Co(II) complexes of 3-hydroxy-N'-(2-hydroxybenzylidene)-2-naphthohydrazide / L. Kumar, K. S. Prasad // *Eur. J. Chem.* – 2011. – Vol. 2. – P. 394–403.
8. Liu J. Synthesis, DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes / J. Liu, T. Zhang, T. Lu [et al.] // *Dalton Trans.* – 2003. – Vol. 28. – P. 114–119.
9. Lawrence D. Synthesis, characterization and DNA binding studies of two mixed ligand complexes of ruthenium(II) / D. Lawrence, V. G. Vaidyanathan, B. U. Nair // *J. Inorg. Biochem.* – 2006. – Vol 100. – P. 1244–1251.
10. Lal B. Synthesis, characterization and antitumor activity of new ferrocene incorporated N, N'-disubstituted thioureas / B. Lal, A. Badshah, A. A. Altaf [et al.] // *Dalton Trans.* – 2012. – Vol. 41. – P. 14643–14650.
11. Nagle P. S. Understanding the DNA binding of novel non-symmetrical guanidinium/2-aminoimidazolium derivatives / P. S. Nagle, S. J. Quinn, J. M. Kelly [et al.] // *Org. Biomol. Chem.* – 2010. – Vol. 8. – P. 5558–5567.
12. Ott I. Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs / I. Ott, R. Gust // *Arch. Pharm.* – 2007. – Vol. 340. – P. 117–126.
13. Shtemenko N. Dichlorotetra- μ -isobutiratodirhenium(III): Enhancement of Cisplatin Action and KBC – stabilizing Properties / N. Shtemenko, P. Collery, A. Shtemenko // *Anticancer Research* – 2007. – Vol.27 – P. 2487–2492.
14. Shen H.-Y. In Vitro Study of DNA Interaction with Trichlorobenzenes by Spectroscopic and Voltammetric Techniques / H.-Y. Shen, X.-L. Shao, H. Xu [et al.] // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2011. – Vol.6. – P. 532–547.
15. Shtemenko N. Synthesis, X-ray structure, interactions with DNA, remarkable in vivo tumor growth suppression and nephroprotective activity of cis-tetrachloro-dipivalato dirhenium(III) / N. Shtemenko, H. T. Chifotides, K. V. Domasevitch [et al.] // *J. Inorg. Biochem.* – 2013. – Vol. 129. – P. 127–134.
16. Shtemenko A. V. Synthesis and X-ray crystal structure of the dirhenium complex $\text{Re}_2(\text{i-C}_3\text{H}_7\text{CO}_2)_4\text{Cl}_2$ and its interactions with the DNA purine nucleobases / A. V. Shtemenko, H. T. Chifotides, D. E. Yegorova [et al.] // *J. of Inorg. Biochem.* – 2015. – Vol. 153. – P. 114–120.

Реферати

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С КЛАСТЕРНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ РЕНИЯ РАЗНЫХ СТРУКТУРНЫХ ТИПОВ

Парамонова К.В., Голиченко А.А., Бабий С.А., Штеменко А.В., Штеменко Н.И.

Изучено взаимодействие ДНК с кластерными соединениями рения (III) трех структурных типов, отличающихся количеством и ориентацией органических лигандов вокруг кластерного фрагмента Re_2^{6+} методом электронной спектроскопии. Подтвержден механизм взаимодействия цис-, транс-дикарбоксилатов и тетракарбоксилатов дирения (III) с суперспирализованным полинуклеотидом путем ковалентного связывания, образования комплекса соединения рения (III) - нуклеиновое основание с последующим расплетанием спирали ДНК. Показано, что такое взаимодействие имеет особенности при низких и высоких концентрациях кластерных соединений рения и отличается для различных структурных типов. Показана редокс-активация процесса взаимодействия соединений рения и ДНК, что может объяснить показанное ранее синергическое или аддитивное антиканцерогенное действие соединений рения и платины.

Ключевые слова: кластерные соединения рения(III), ДНК, расплетание ДНК, редокс-активация.

Статья надійшла 3.03.2016 р.

THE INTERACTION OF DNA WITH CLUSTER RHENIUM COMPOUNDS OF DIFFERENT STRUCTURAL TYPES

Paramonova K., Golichenko A., Babiy S., Shtemenko A., Shtemenko N.

The interaction of DNA with the cluster compounds of rhenium (III) three structural types differ in the number and orientation of organic ligands around the cluster fragment Re_2^{6+} has been studied by electron spectroscopy. The mechanism of interaction of cis-, trans- dicarboxylates and tetracarboxylates of derhenium (III) with a supercoiled polynucleotide by covalent bonding, the formation of the complex compound of rhenium (III) - nucleobase with subsequent unwinding of the helix DNA was confirmed. It is shown that this interaction is different at low and high concentrations of cluster compounds of rhenium and for different structural types of complexes. Redox activation of the interaction between DNA and rhenium compounds, which may explain the previously shown a synergistic or additive anticarcinogenic effect of rhenium and platinum compounds, has been shown.

Key words: cluster compounds of rhenium(III), DNA, unwinding DNA, redox activation.

Рецензент Білаш С.М.