

ПРИРОДА ВЗАЄМОДІЇ МІЖ КАТІОННИМИ N-ОКСИДФЕНАЗИНАМИ ТА ДНК

Досліджено взаємодії між катіоногенними N-оксидфеназинами та ДНК у водних розчинах різного складу, а також у розчинах, приготованих на воді з різним електричним потенціалом. На підставі аналізу умов, за яких відбуваються досліджувані взаємодії, зроблено висновок, що такі взаємодії є хімічними реакціями між ДНК та ОН-радикалами, які генеруються N-оксидфеназинами.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: феназини, N-оксидфеназини, АФК, ОН-радикали, ДНК.

ВСТУП. Для пояснення механізму взаємодії між катіоногенними N-оксидфеназинами та ДНК застосовують два незалежних підходи. Перший базується на моделі інтеркаляції [6, 9, 11, 16, 23, 24] та враховує здатність катіонних феназинів утворювати комплекси з речовинами біологічного походження [28], другий базується на хімічних властивостях феназинів [17–19, 22, 26, 27] та враховує здатність N-оксидфеназинів генерувати активні форми кисню (АФК) у біологічних системах (рис. 1) [17, 26].

Оскільки знання природи взаємодій між ДНК та катіоногенними N-оксидфеназинами необхідне для розуміння механізмів дії фена-

зинових антибіотиків та виникнення феназинових інтоксикацій [1, 18, 19, 21, 22, 26], ми провели дослідження, що мали на меті визначити, яким теоретичним уявленням краще відповідають умови таких взаємодій.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Синтез та очищення досліджуваних N-оксидфеназинів (рис. 2) здійснили відповідно до опублікованих методик [2, 5, 14, 15, 25].

Висновки про взаємодії між досліджуваними N-оксидфеназинами та ДНК робили на підставі бато- й (або) гіпохромних зсувів видимих ділянок спектрів поглинання N-оксидфеназинів, що реєструвалися після внесення до їх водних розчинів ДНК [20, 24]. Щоб уникнути похибок при реєстрації бато- та гіпохромних зсувів, які можуть становити 1–2 % [20], пов'язаних зі зміною концентрації розчинів N-оксидфеназинів, ~2 мг ДНК у сухому вигляді вносили безпосередньо у фотометричну кювету, що містила розчин досліджуваного N-оксидфеназину, і там розчиняли.

Воду з позитивним електричним потенціалом отримували за умов фільтрування дистильованої води через шар силікагелю, що є сорбентом іонів гідроксилу [4, 10, 12], або барботування дистильованої води киснем [10, 12] з її наступною дегазацією.

Воду з негативним електричним потенціалом отримували за умов фільтрування дистильованої води через шар активованого вугілля, що є сорбентом іонів водню [4, 10, 12], або барботування дистильованої води воднем [10, 12] з її наступною дегазацією.

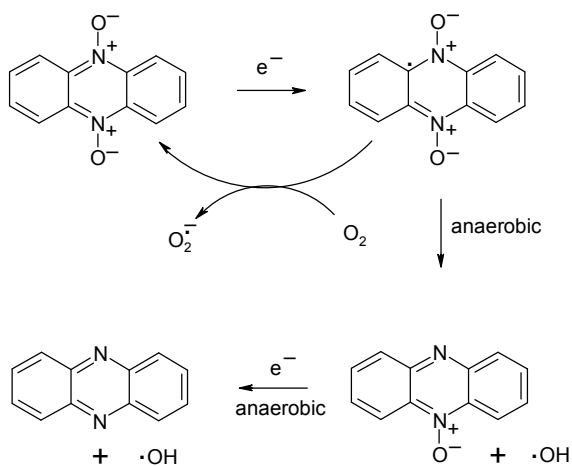


Рис. 1. Гіпотетичний механізм утворення N-оксидфеназинами ОН-радикалів. Вважають, що ОН-радикали, які за анаеробних умов та за присутності відновників генерують N-оксидфеназини, спроможні викликати пошкодження ДНК клітин пухлин [19, 22].

© Ю. В. Пивоваренко, О. В. Шабликін, О. М. Васильєв, 2012.

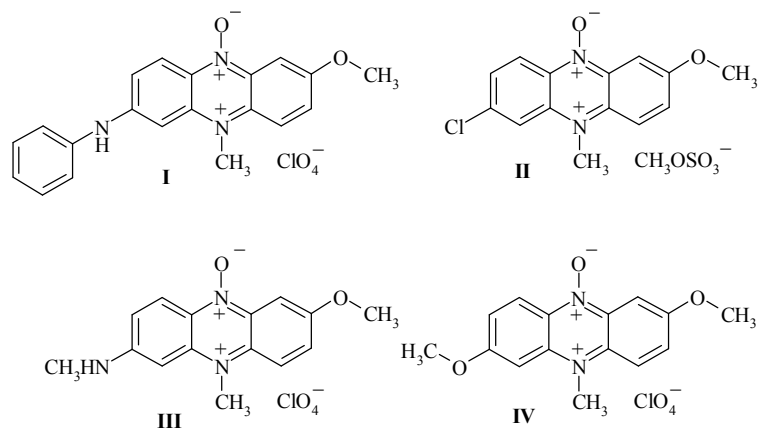


Рис. 2. Структурні формули досліджуваних N-оксидфеназінів:
 I – перхлорат 10-N-оксид-2-метокси-7-феніламін-5-метилфеназінію,
 II – метилсульфат 10-N-оксид-2-метокси-7-хлорид-5-метилфеназінію,
 III – перхлорат 10-N-оксид-2-метокси-7-метиламін-5-метилфеназінію,
 IV – перхлорат 10-N-оксид-2,7-диметокси-5-метилфеназінію.

Для дегазації воду протягом 10 хв витримували у вакуумному ексикаторі під тиском ~13 мм рт. ст.

Електричний (електродний) потенціал води визначали методом, який використовують для визначення потенціалу течії [4].

Насичення води воднем, киснем або повітрям здійснювали шляхом її барботування під тиском 1,01 атм. протягом 1 год.

Для реєстрації спектрів поглинання використовували спектрофотометр “Specord UV VIS” (Німеччина).

У роботі застосовували ДНК із тимуса теляти виробництва “Fluka” (Швейцарія) та інші реактиви виробництва “Укрреакім” (Україна).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Під час проведення спектральних досліджень було з’ясовано, що після внесення ДНК до водних розчинів досліджуваних N-оксидфеназінів видимі ділянки спектрів поглинання таких розчинів зазнавали бато- та (або) гіпохромних зсувів (рис. 3).

Літературні джерела надають декілька пояснень таким спектральним ефектам. Так, відповідно до 1–3 положень теорії кольорості [3, 13], такі спектральні зміни вказують на те, що за присутності ДНК відбувається хімічна модифікація досліджуваних N-оксидфеназінів. Згідно ж з уявленнями авторів, які розглядали взаємодії катіоногенних феназінів та ДНК в аспекті комплексоутворення [11, 20], такі зміни спектрів свідчать про утворення комплексів між досліджуваними N-оксидфеназинами та ДНК, а згідно з уявленнями прибічників моделі інтеркаляції – про утворення інтеркаляційних комплексів [24]. Щоб визначитись, яким теоретичним уявленням заре-

естровані спектральні зміни (рис. 3) відповідають краще, ми варіювали умови дослідів, які проводили.

Взаємодії досліджуваних N-оксидфеназінів з ДНК у водних розчинах з різною концентрацією NaCl та різними значеннями рН. Виявлено, що досліджувані N-оксидфеназини взаємодіють з ДНК у нейтральних водних розчинах із [NaCl] < 0,2 М, проте не взаємодіють з ДНК у нейтральних водних розчинах із [NaCl] ≥ 0,2 М, тобто за умов, які сприяють стабілізації дволанцюгової структури молекул ДНК [16].

Встановлено, що досліджувані N-оксидфеназини взаємодіють з ДНК у водних розчинах із рН ≥ 6, зокрема у розчинах з рН 12,5, тобто за умов лужного плавлення ДНК, коли молекули ДНК мають виключно одностанцюгову структуру [16].

Отримані результати довели, що досліджувані N-оксидфеназини не взаємодіють з дволанцюговими ДНК, проте взаємодіють з одностанцюговими. Оскільки ароматичні барвники можуть утворювати інтеркаляційні комплекси виключно з дволанцюговими В-ДНК [7, 16, 23], одержані результати засвідчили, що утворення інтеркаляційних комплексів не є причиною бато- та гіпохромних зсувів видимих ділянок спектрів поглинання досліджуваних N-оксидфеназінів (рис. 3).

Взаємодії досліджуваних N-оксидфеназінів з ДНК у розчинах, приготованих на воді з різним електричним потенціалом. Виявлено, що взаємодії досліджуваних N-оксидфеназінів з ДНК відбуваються у розчинах, приготованих на воді з потенціалом ≤ 0 мВ, та не відбуваються у розчинах, приготованих на воді з потенціалом ≥ +150 мВ, тобто

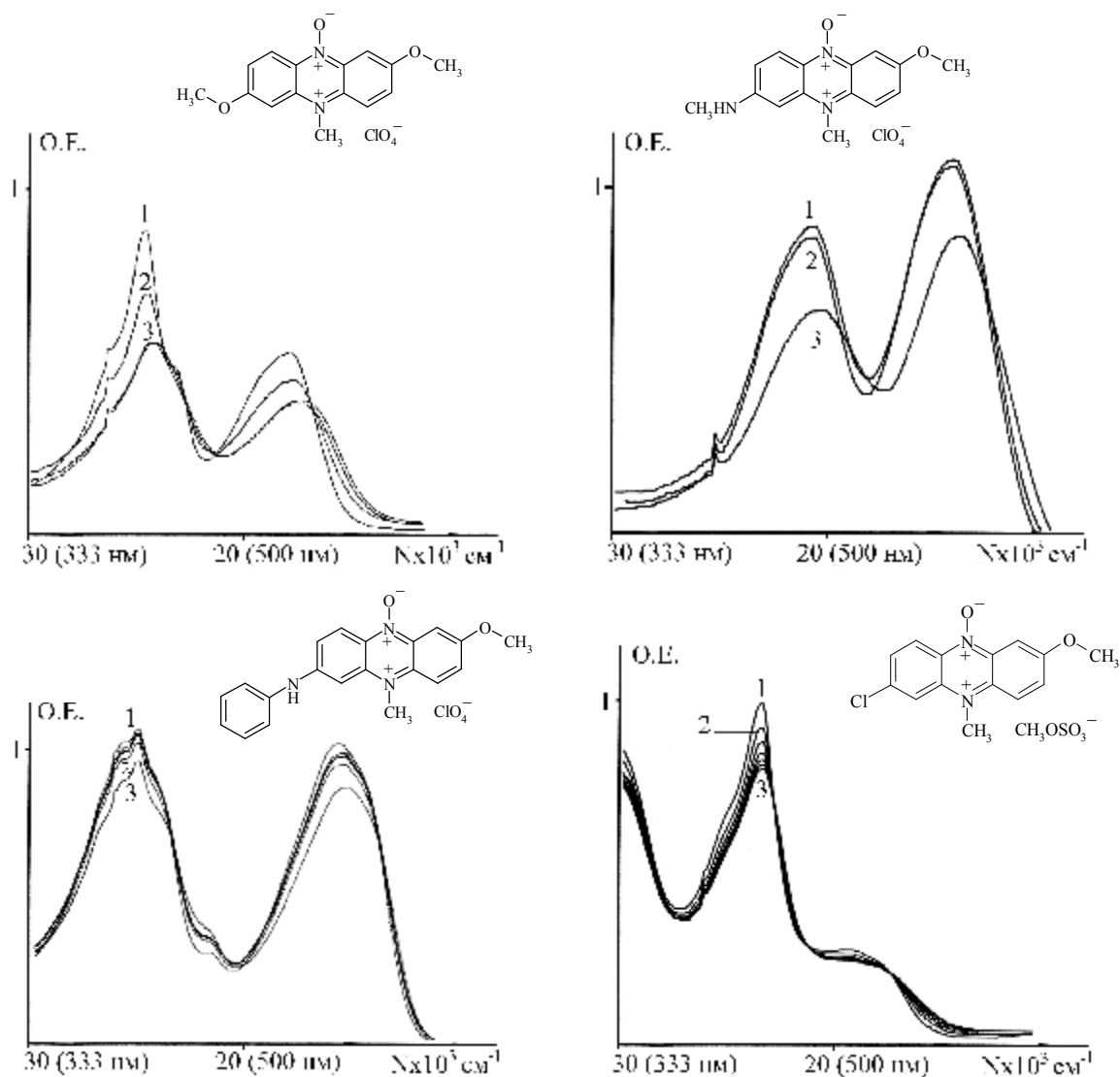


Рис. 3. Видимі ділянки спектрів поглинання: 1 – водні розчини N-оксидфеназину; 2, 3 – водні розчини N-оксидфеназину за зростаючих концентрацій ДНК та РНК. $\text{N} \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ – хвильове число.

досліджувані взаємодії є потенціалозалежними. Потенціалозалежний характер взаємодій, що відбуваються з участю феназину, свідчить про те, що за таких взаємодій феназини зазнають окиснювально-відновлювальних перетворень [17, 26, 27], а той факт, що взаємодії досліджуваних N-оксидфеназину з ДНК відбуваються у розчинах, приготованих на воді з потенціалом ≤ 0 мВ, означає, що за таких взаємодій відновлюються N-оксидфеназини [17].

Застосувавши для пояснень потенціалозалежного характеру досліджуваних взаємодій механізми реакцій, наведені на рисунку 1, можна дійти висновку, що відновлення досліджуваних N-оксидфеназину є наслідком генерації ними ОН-радикалів, яка відбувається у середовищі, збагаченому електронами.

Взаємодії досліджуваних N-оксидфеназину з ДНК у розчинах, приготованих

на дегазованій воді, а також на воді, що насичена воднем, киснем або повітрям. Виявлено, що взаємодії досліджуваних N-оксидфеназину з ДНК відбуваються у розчинах, приготованих на дегазованій воді та на воді, яка насичена воднем, і не відбуваються у розчинах, приготованих на воді, що насичена киснем або повітрям (табл.).

Застосування механізмів реакцій, наведених на рисунку 1, дозволяє пояснити наведену залежність так: генерація ОН-радикалів досліджуваними N-оксидфеназинами відбувається у дегазованих розчинах (тобто за анаеробних умов) та у розчинах, збагачених воднем (донором електронів), але не відбувається у розчинах, збагачених киснем.

Таким чином, ми переконались, що для пояснення природи взаємодій між досліджуваними N-оксидфеназинами та ДНК більш

Таблиця – Взаємодії досліджуваних N-оксидфеназінів з ДНК у розчинах, приготованих на дегазованій воді, а також на воді, що насичена воднем, киснем або повітрям

ДНК та гази, які містяться у розчинах N-оксидфеназінів	Взаємодії між ДНК та N-оксидфеназинами	Час взаємодії між ДНК та N-оксидфеназинами
ДНК+вакуум	+	під час розчинення
ДНК+H ₂	+	під час розчинення
ДНК+O ₂	–	∞
ДНК+повітря	–	∞

продуктивним є застосування механізмів реакцій, наведених на рисунку 1, а не моделі інтеркаляції. До того ж, на відміну від моделі інтеркаляції, використання наведених механізмів реакцій (рис. 1) дозволяє свідомо пропонувати способи підвищення ефективності катіоногенних N-оксидфеназінів у протипухлинній хімотерапії, наприклад запропонувати сумісне застосування катіоногенних N-оксидфеназінів зі сполуками, що є донорами вод-

ню, зокрема з такими вітамінами, як аскорбінова чи тетрагідрофолієва кислота, або підвищують його вміст у кишечнику [8].

ВИСНОВКИ. За взаємодії з ДНК катіоногенні N-оксидфеназини зазнають хімічних перетворень. Внаслідок хімічних реакцій, що відбуваються між ДНК та катіоногенними N-оксидфеназинами, N-оксидфеназини, ймовірно, генерують ОН-радикали, які окиснюють ДНК.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреев С. Н. Бактериальная инфекция у больных ХОБЛ с острой дыхательной недостаточностью / С. Н. Андреев, А. Г. Шанина, А. Г. Чучалин // Клиника микробиологической антимикробной химиотерапии. – 2005. – **7**, № 3. – С. 245–254.
2. Барашенков Г. Г. Окислення четвертинних солей N-оксидів феназінів / Г. Г. Барашенков, С. Б. Серебряний, Д. М. Федоряк // Укр. хім. журн. – 1963. – **19**, № 3. – С. 322–324.
3. Винюкова Г. Н. Химия красителей / Г. Н. Винюкова. – М.: Химия, 1979. – 296 с.
4. Воюцкий С. С. Курс коллоидной химии / С. С. Воюцкий. – М.: Химия, 1976. – 512 с.
5. Грабенко А. Д. Электрофильные реакции замещения в ряду феназина. I. Нитрование N-окиси феназина / А. Д. Грабенко, С. Б. Серебряный // Укр. хім. журн. – 1955. – **21**, № 2. – С. 249–252.
6. Дубей І. Я. Кон'югати олігонуклеотидів з інтеркаляторами: синтез та біологічна активність / І. Я. Дубей // *Ukrainica Bioorganica Acta*. – 2006. – № 1. – С. 42–59.
7. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот / В. Зенгер. – М.: Мир, 1987. – 584 с.
8. Использование препарата Эспумизан в практике гастроэнтеролога / Н. В. Харченко, В. В. Черненко, И. Н. Червак [и др.] // *Здоров'я України*. – 2008. – № 6, вып. 1. – С. 52–53.
9. Исследование взаимодействия производных феназина с ДНК методом поляризованной флуоресценции / Ю. П. Благой, В. Н. Зозуля, И. М. Волошин [и др.] // *Биополимеры и клетка*. – 1997. – **13**, № 1. – С. 22–29.
10. Ляхов А. М. Потенциалзависимые свойства воды и водных растворов / А. М. Ляхов, Ю. В. Пивоваренко // *Спортивная медицина*. – 2006. – № 1. – С. 149–152.
11. Морощкина Е. Б. Взаимодействие ДНК с производными феназинов / Е. Б. Морощкина, М. Г. Сафьянникова // *Биофизика*. – 1999. – **44**, № 3. – С. 425–429.
12. Некрасов Б. В. Основы общей химии / Б. В. Некрасов. – М.: Химия, 1974. – Т. 1. – 656 с.
13. Пацак Й. Органическая химия / Й. Пацак. – М.: Мир, 1986. – 366 с.
14. Серебряный С. Б. Аминирование алкилфеназиновых солей / С. Б. Серебряный, П. А. Юфа // *Укр. хім. журн.* – 1963. – **19**, № 3. – С. 322–324.
15. Серебряный С. Б. Электрофильные реакции замещения в ряду феназина / С. Б. Серебряный // *Укр. хім. журн.* – 1956. – **22**, № 4. – С. 507.
16. Шабарова З. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов / З. А. Шабарова, А. А. Богданов. – М.: Химия, 1978. – 584 с.
17. Эльдерфилд Р. К. Гетероциклические соединения / Р. К. Эльдерфилд. – М.: Издательство иностранной литературы, 1960. – Т. 6. – 612 с.
18. *Bioactive Heterocycles V: No. 5 (Topics in Heterocyclic Chemistry)* [Series editor R. R. Gupta, Volume editor Khan M. T. H.]. – Springer. – 2007. – 342 p.
19. DNA Cleavage by Oxygen Radicals Produced in the Absence of Metal Ions or Light / Katsuyuki Nagai, J. Barbara Carter, Jinwen Xu, M. Sidney Hecht. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1991. – **113**. – P. 5099 – 5100.
20. Hollstein U. Interaction of Phenazines with

- Polydeoxyribonucleotides / U. Hollstein, R. Y. Van Gemert. // *Biochemistry*. – 1971. – **10**, № 3. – P. 497–504.
21. In vitro inhibition of lymphocyte proliferation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments / R. U. Sorensen, J. D. Klinger, H. A. Cach [et al.] // *Infectional Immunology*. – 1983. – **41**, № 1. – P. 321 – 330.
22. Katsuyuki Nagai Hecht. Site-specific Cleavage by Antisense Oligonucleotides Covalently Linked to Phenazine Di-N-oxide / Katsuyuki Nagai, M. Sidney // *J.B.C.* – 1991. – **266**, № 35. – P. 23994 – 24002.
23. Lerman L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines / L. S. Lerman // *Journal Molecular Biology*. – 1961. – **3**. – P. 18–30.
24. Long E. C. On Demonstrating DNA Interaction / E. C. Long, J. K. Barton // *Acc. Chem. Res.* – 1990. – **23**, № 9. – P. 273–279.
25. McIlwain H. J. The Phenazine Series. Part IV. Reactions of Alkyl Phenazinium Salts / H. J. McIlwain // *Journal Chemical Society*. – 1937. – P. 1704–1711.
26. Michaelis L. Potentiometric Studies on Semi-quinones / L. Michaelis, E. S. Hill // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1933. – **55**, № 4. – P. 1481 – 1494.
27. Michaelis L. The Viologen Indicators / L. Michaelis, E. S. Hill // *The Rockefeller University Press* – 1933. – **16**. – P. 6859 – 6873.
28. Swan G. A. The Chemistry of Heterocyclic Compounds / G. A. Swan. – New York: Interscience Publishers, 1957. – 643 p.

Ю. В. Пивоваренко¹, О. В. Шаблыкин², А. Н. Васильев¹

УНЦ “ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЕ” КИЕВСКОГО НАЦИОНАЛЬНОГО УНИВЕРСИТЕТА
ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО И НАН УКРАИНЫ¹
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ И НЕФТЕХИМИИ НАН УКРАИНЫ², КИЕВ

ПРИРОДА ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ КАТИОННЫМИ N-ОКСИДФЕНАЗИНАМИ И НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Резюме

Исследованы взаимодействия между катионогенными N-оксидфеназинами и ДНК в водных растворах различного состава, а также в растворах, приготовленных на воде с разным электрическим потенциалом. Из анализа условий, при которых происходят исследуемые взаимодействия, сделан вывод о том, что такие взаимодействия являются химическими реакциями между ДНК и ОН-радикалами, генерируемыми N-оксидфеназинами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: феназины, N-оксидфеназины, АФК, ОН-радикалы, ДНК.

Yu. V. Pyvovarenko¹, O. V. Shablykin², O. M. Vasylyev¹

RESEARCH AND TRAINING CENTER PHYSICAL AND CHEMICAL MATERIALS SCIENCE
OF TARAS SHEVCHENKO KYIV UNIVERSITY AND NAS OF UKRAINE¹
INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY AND PETROCHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE², KYIV

NATURE OF INTERACTION BETWEEN THE CATION N-OXIDPHENAZINES AND NUCLEIC ACIDS

Summary

The interaction between the cationic N-oxidephenazines and DNA in aqueous solutions was studied. These results correlate well with the hypothesis that such interactions are chemical reactions between DNA and OH-radicals generated by N-oxidephenazines.

KEY WORDS: phenazine, N-oxidphenazines, ROS, OH-radicals, DNA.

Отримано 21.05.12

Адреса для листування: Ю. В. Пивоваренко, вул. Клименка, 8, кв. 39, Київ-37, 03037, Україна, e-mail: y.pivovarenko@gmail.com.