

УДК 543.422.3:577.323.4:577.346

**ВЛИЯНИЕ КОФЕИНА НА КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДНК
ПРИ γ -ОБЛУЧЕНИИ *in vitro***

© 2011 С.В. Пастон*, А.Е. Тарасов

*Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет**Статья поступила 14 июня 2011 г.*

Методами низкоградиентной вискозиметрии, двойного лучепреломления в потоке, атомной силовой микроскопии и УФ спектроскопии показано радиопротекторное действие кофеина при γ -облучении растворов ДНК. В присутствии кофеина наблюдается уменьшение влияния радиации на объем макромолекулярного клубка ДНК в растворе, снижение количества двунитевых разрывов, разрушенных азотистых оснований, степени радиационной денатурации.

Ключевые слова: кофеин, ДНК, γ -облучение, радиопротекторы, радиосенсибилизаторы, спектрофотометрический анализ, вторичная структура ДНК.

Кофеин — одно из самых распространенных биологически активных веществ. Он входит в ежедневный рацион человека на протяжении многих веков. Влияние кофеина на организм изучается давно и интенсивно. Кофеин широко применяется в медицине как средство, оказывающее возбуждающее действие на центральную нервную систему и стимулирующее сердечную деятельность, при инфекционных заболеваниях, отравлениях, спазмах сосудов, нарушениях дыхания [1].

Несмотря на большое количество накопленных экспериментальных данных о влиянии кофеина на организм, многие важные особенности его биологического действия стали выявляться только в последние годы. Например, обнаружено, что кофеин способен образовывать комплексы с ароматическими молекулами, интеркалирующими в ДНК, тем самым уменьшая их эффективную концентрацию вблизи макромолекулы и снижая их мутагенный и канцерогенный эффект [2—5]. Также кофеин способен ингибировать синтез ДНК в клетке [6, 7]. Интересна роль кофеина в процессе γ - и УФ облучения клеток. Как известно, при действии излучений на живую клетку основным объектом поражения является молекула ДНК. Клетка обладает системой репарирующих ферментов, способных при не слишком больших дозах восстанавливать биологическую активность ДНК в течение некоторого времени после облучения. Обнаружено, что кофеин ингибирует репарацию ДНК [8—10]. К настоящему времени выяснено, что кофеин отменяет задержку клеточного цикла, вызванную ионизирующей и УФ радиацией, в сверхточных точках ("checkpoints") в конце S- и G2-фаз, тем самым сокращая время репарации, но индуцирует задержку в фазе G1 [10]. В целом добавление кофеина снижает выживаемость культуры клеток, подвергнутых облучению. Однако существуют данные о том, что кофеин проявляет как радиосенсибилизирующее, так и радиопротекторное действие при облучении клеток в зависимости от его концентрации и температуры [11].

Эти результаты послужили толчком к более подробным исследованиям взаимодействия кофеина с ДНК в клетках и в модельных растворах. В последние годы появилось много теоретических работ, моделирующих взаимодействие молекулы кофеина с двойной спиралью ДНК

* E-mail: svpaston@list.ru

и с ее отдельными фрагментами (см., например, [12—14]). В работе [14] сделан вывод о том, что молекула кофеина может образовывать водородную связь с азотистыми основаниями ДНК, находясь как в главном, так и в минорном желобках двойной спирали. В экспериментальной работе [15] показано, что в присутствии кофеина (максимальная концентрация 1 молекула кофеина на 1 а.о.) изменяется спектр ИК поглощения ДНК. С помощью спектральных исследований в УФ диапазоне авторы [15] оценили константу связывания кофеина с ДНК $K_{св} = 9,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Вместе с тем в работах [16, 17] не обнаружено признаков комплексообразования кофеина с молекулой ДНК в растворе. В работе [16] показано, что спектр поглощения раствора, содержащего ДНК и кофеин, совпадает с суммой спектров раствора ДНК и раствора кофеина в тех же концентрациях, и приведена оценка $K_{св} < 10^3 \text{ M}^{-1}$. Авторы [16, 17] обнаружили, что кофеин проявляет радиопротекторные свойства *in vitro*. Таким образом, действие кофеина на биологические системы весьма неоднозначно. Данная работа посвящена исследованию влияния кофеина на структурные изменения молекулы ДНК, вызванные ее γ -облучением в растворе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Использовали ДНК фирмы "Sigma" из тимуса теленка молекулярной массы $M = (11,2 \pm 0,6) \cdot 10^6$ Да и ДНК из эритроцитов цыплят Олайнского химического завода молекулярной массы $M = (1,4 \pm 0,1) \cdot 10^6$ Да. Молекулярная масса ДНК была определена по значению характеристической вязкости $[\eta]$ в растворе 0,15 М NaCl [18]. Оптическое поглощение растворов ДНК измеряли на спектрофотометре СФ-56 (Россия). Гидролиз ДНК проводили как описано в [19]: к 1 мл раствора ДНК добавляли 3 мл 6 % HClO_4 , затем полученный раствор выдерживали в течение 20 мин на кипящей водяной бане, после чего резко охлаждали при 0 °С. Концентрацию ДНК (т.е. концентрацию азотистых оснований (а.о.)) в растворе (C) определяли по методу Спирина [19] по спектру УФ поглощения полученных таким образом гидролизатов:

$$C = \frac{10,1(D_{270} - D_{290}) V_2}{0,19 V_1},$$

где D_{270} и D_{290} — оптические плотности гидролизата при $\lambda_1 = 270$ нм и $\lambda_2 = 290$ нм, V_1 — объем исходного раствора ДНК; V_2 — объем гидролизата. Используя найденное значение C определяли молярный коэффициент экстинкции ДНК, который позволяет судить о степени нативности макромолекулы:

$$\varepsilon_{260} = (P) \frac{31 \cdot D_{260}}{0,099 \cdot Cl},$$

где D_{260} — оптическая плотность раствора ДНК при $\lambda = 260$ нм; l — длина кюветы в см; 0,099 = 9,9 % — процентное содержание фосфора в ДНК; 31 — атомный вес фосфора.

Использовали кофеин фирмы "Sigma". Концентрация электролита во всех исследуемых растворах — 0,003 М NaCl (кроме исследований методом АСМ). Использовали соли марки ХЧ.

Растворы ДНК подвергали воздействию γ -излучения ^{60}Co в аэробных условиях на установке "Исследователь" в Петербургском институте ядерной физики им. Б.П. Константинова. Мощность дозы составляла 20 Гр/мин. Концентрация ДНК в облучаемых растворах составляла $C = 1 \cdot 10^{-2}$ г/дл в исследованиях методами вискозиметрии и ДЛП, $C = 6 \cdot 10^{-3}$ г/дл в спектральных исследованиях и $C = 2,5 \cdot 10^{-4}$ г/дл при исследовании методом АСМ.

Вискозиметрия. Относительные вязкости η_r растворов ДНК разной концентрации измеряли в модифицированном низкоградиентном магнитном ротационном вискозиметре [20] при разных градиентах скорости потока g и экстраполировали к $g = 0$. Значение характеристической вязкости $[\eta]$ находили экстраполяцией по формуле

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{(\eta_r - 1)_{g \rightarrow 0}}{C} \right).$$

Характеристическая вязкость ДНК пропорциональна удельному объему макромолекулы в растворе ($V_{уд}$). Согласно формуле Флори [21], величина $[\eta]$ связана с параметрами полимера:

$$[\eta] = \Phi \frac{(\overline{h_0^2})^{3/2}}{M} \alpha^3 = \Phi \frac{(LA)^{3/2}}{M} \alpha^3, \quad (1)$$

где $(\overline{h_0^2})^{1/2}$ — среднеквадратичное расстояние между концами невозмущенной цепи; α — коэффициент линейного набухания макромолекулы в хорошем растворителе; Φ — коэффициент Флори; L — гидродинамическая длина макромолекулы; A — длина статистического сегмента; M — молекулярная масса ДНК. Таким образом, величина $[\eta]$ определяется как ближними взаимодействиями в цепи ДНК, т.е. жесткостью макромолекулы (A), так и дальними взаимодействиями (α) — ее набуханием в хорошем растворителе.

Двойное лучепреломление в потоке (ДЛП). Зависимость величины ДЛП Δn растворов ДНК от градиента скорости потока g измеряли на оптической установке с эллиптическим компенсатором и фотоэлектрической регистрацией [22] в титановом динамооптиметре с внутренним ротором. В работах [23—25] показано, что для ДНК величина удельной анизотропии раствора конечной концентрации пропорциональна оптической анизотропии сегмента ($\alpha_1 - \alpha_2$):

$$\frac{(\Delta n / g)_{g \rightarrow 0}}{(\eta_r - 1)\eta_0} = \frac{[n]}{[\eta]} = \frac{4\pi}{45kT} \frac{(n_s^2 + 2)^2}{n_s} (\alpha_1 - \alpha_2),$$

где k — постоянная Больцмана; T — абсолютная температура; n_s — показатель преломления растворителя. Оптическая анизотропия сегмента

$$(\alpha_1 - \alpha_2) = (\alpha_{\parallel} - \alpha_{\perp}) \frac{A}{l},$$

где $(\alpha_{\parallel} - \alpha_{\perp})$ — разность поляризуемостей мономерного остатка в направлении оси спирали ДНК и перпендикулярно к ней; A — длина сегмента (жесткость цепи); l — длина мономерного остатка.

Атомная силовая микроскопия (АСМ). Использовали сканирующий (атомный силовой) микроскоп NanoScope 4a (Veeco, США). Фиксацию ДНК осуществляли на слюдяную подложку с помощью ионов магния, обеспечивающих связывание отрицательно заряженных молекул ДНК с отрицательно заряженной поверхностью слюды [26]. Каплю раствора ДНК объемом ~5 мкл ($C_{\text{ДНК}} = 2,5 \cdot 10^{-4}$ г/дл, $C_{\text{NaCl}} = 5 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{MgCl}_2} = 5 \cdot 10^{-4}$ М) наносили на подготовленную поверхность свежесколотой слюды. Далее после 3 мин выдержки образец промывали дистиллированной водой, а затем сушили в вакууме. Измерения проводили в контактном режиме, результаты сканирования обрабатывали с помощью программы Nanoscope.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование приведенной вязкости ($\eta_{\text{пр}} = \frac{\eta_r - 1}{C}$) растворов ДНК ($C_{\text{ДНК}} = 0,006$ г/дл), содержащих различные концентрации кофеина, показало (рис. 1, а), что во всем исследованном интервале концентраций кофеина $\eta_{\text{пр}}$ раствора остается неизменной. При этом вязкость растворителя не зависит от концентрации кофеина и остается равной вязкости водно-солевого растворителя при $C_{\text{коф}} = 0$. Для более точного определения удельного объема ДНК в растворе в присутствии кофеина была найдена характеристическая вязкость $[\eta]$ ДНК в растворе с $C_{\text{коф}} = 1,3 \cdot 10^{-3}$ М/л (рис. 2, а). В качестве растворителя использовали водно-солевой раствор кофеина той же концентрации, т.е. в процессе измерения соотношение компонентов в растворе менялось от 10 до 43 молекул кофеина на пару оснований ДНК. Полученная зависимость $\eta_{\text{пр}}(C_{\text{ДНК}})$ оказалась линейной, что дало возможность провести экстраполяцию к $C_{\text{ДНК}} \rightarrow 0$. Полученное значение $[\eta]$ ДНК в пределах погрешности совпадает с $[\eta]$ ДНК в растворе, не содержащем кофеин (см. рис. 2, б, таблицу). Удельная анизотропия раствора ДНК также не меняется при добавлении кофеина. Принимая во внимание неизменность спектральных параметров макромолекулы в растворах, содержащих кофеин [17], можно сделать вывод об отсутствии влияния кофеина на объем и жесткость молекулы ДНК в растворе 0,003 М NaCl вплоть до соотношения 43 моле-

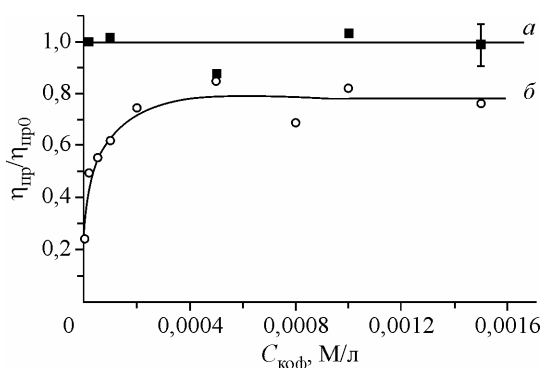


Рис. 1. Относительное изменение приведенной вязкости растворов ДНК при разных концентрациях кофеина: необлученные (а), γ -облученные растворы (доза 10 Гр) (б)

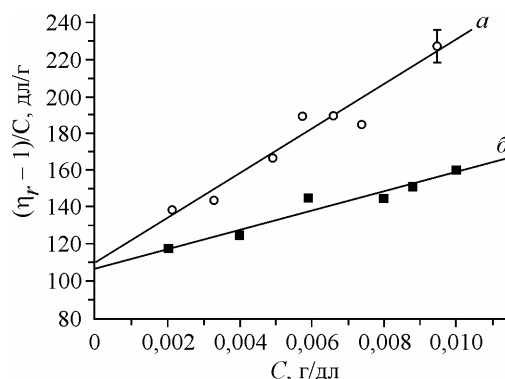


Рис. 2. Зависимость приведенной вязкости от концентрации ДНК, используемая для экстраполяции к $C = 0$, в необлученных растворах при $C_{\text{коф}} = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ М/л}$ (а) и $C_{\text{коф}} = 0$ (б)

кулы кофеина на 1 пару а.о. ДНК. Следует отметить, что на основании полученных данных нельзя однозначно утверждать, что комплексообразование ДНК с кофеином отсутствует, так как существуют такие способы связывания лигандов с ДНК (например, некоторые типы бороздочного связывания), при которых объем и жесткость макромолекулы остаются неизменными [27].

Изучение γ -облученных растворов ДНК, содержащих кофеин, показало, что снижение величины $\eta_{\text{пр}}$ растворов ДНК, вызванное радиацией, становится меньше с ростом концентрации кофеина в облучаемом растворе (см. рис. 1, б). Сравнение значений $[\eta]$ ДНК, γ -облученной в растворе при $C_{\text{коф}} = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ М/л}$, со значениями, полученными для ДНК, γ -облученной в отсутствие кофеина, показывает, что кофеин защищает молекулу ДНК от действия радиации (см. таблицу). Заметим, что при дозах облучения до 30 Гр удельная анизотропия раствора ДНК остается неизменной (см. таблицу).

Результаты, полученные методом АСМ, показаны на рис. 3. Из сравнения рис. 3, а и б видно, что γ -облучение вызывает сильную фрагментацию ДНК, очевидно, из-за двунитевых разрывов в цепи макромолекулы [28]. Добавление кофеина к облучаемому раствору приводит к тому, что в облученном образце встречаются более длинные макромолекулы (см. рис. 3, в). Это позволяет сделать вывод о том, что в присутствии кофеина в облучаемом растворе снижается количество двунитевых разрывов в цепи ДНК.

Далее было проведено исследование влияния кофеина на изменение вторичной структуры ДНК и разрушение а.о. при γ -облучении. Известно, что под действием ионизирующей радиации происходит разрушение, модификация и отщепление а.о., а также локальное разрушение водородных связей (частичная денатурация) как в местах образования указанных повреждений, так и на других участках макромолекулы — так называемая радиационная денатурация [28, 29].

Характеристическая вязкость ДНК и удельная анизотропия исследуемых растворов

Доза (Гр)	$C_{\text{коф}} = 0$		$C_{\text{коф}} = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ М/л}$	
	$[\eta], \text{дл/г}$	$-\frac{(\Delta n / g)_{g \rightarrow 0} \cdot 10^8}{(\eta_r - 1)\eta_0}, \text{см} \cdot \text{с}^2/\text{г}$	$[\eta], \text{дл/г}$	$-\frac{(\Delta n / g)_{g \rightarrow 0} \cdot 10^8}{(\eta_r - 1)\eta_0}, \text{см} \cdot \text{с}^2/\text{г}$
0	108±5	22±2	110±8	21±2
10	26±4	21±2	89±3	20±2
20	18±3	23±2	73±10	—
30	9±2	22±2	53±2	22±2

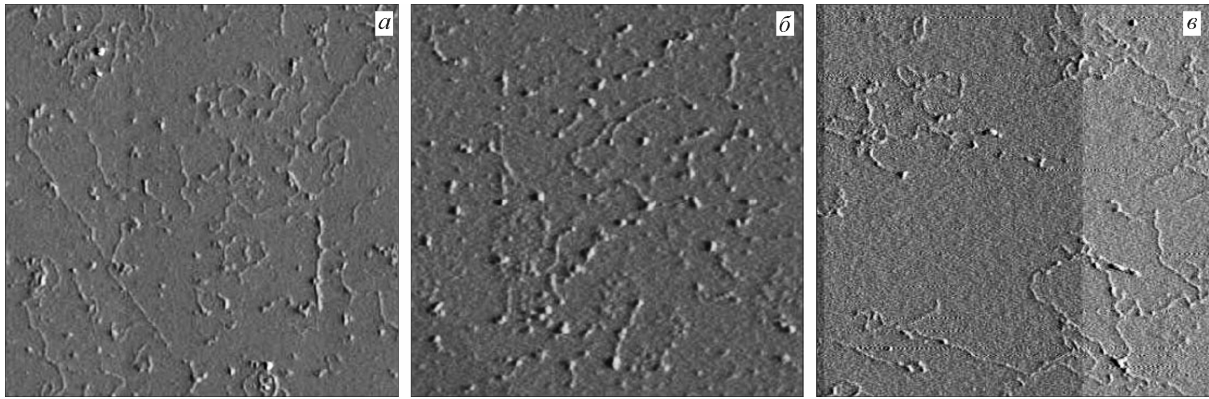


Рис. 3. АСМ изображения ДНК: необлученная $C_{\text{коф}} = 0$ (а), γ -облученная дозой 150 Гр при $C_{\text{коф}} = 0$ (б), γ -облученная дозой 150 Гр при $C_{\text{коф}} = 1,3 \cdot 10^{-3}$ М/л (в); размер изображения 3×3 мкм

Эти факторы оказывают влияние на спектр поглощения облученной ДНК: частичная денатурация вызывает гиперхромный эффект, а разрушение азотистых оснований приводит к уменьшению поглощения. Для того чтобы разделить влияние этих факторов на спектр поглощения, был проведен эксперимент, в котором исследуемые растворы подвергались γ -облучению, а затем гидролизу, как описано в [19]. Раствор 1 содержал ДНК, раствор 2 — смесь ДНК и кофеина, а раствор 3 — кофеин в той же концентрации, что и в растворе 2. Используя аддитивность спектров компонентов в спектре раствора 2, мы получали спектр поглощения ДНК, облученной в присутствии кофеина, как разностный спектр раствора 2, снятый против 3 как против растворителя (так как мы должны были учесть изменение поглощения кофеина при облучении и добавлении кислоты). Если пренебречь вкладом модифицированных а.о. в спектр гидролизованной облученной ДНК, можно воспользоваться для оценки концентрации оставшихся в облученном растворе неразрушенных а.о. методом Спирина [19]. По поглощению гидролизатов 1 и 2 при $\lambda_1 = 270$ нм и $\lambda_2 = 290$ нм была определена концентрация хромофоров в этих растворах.

Обнаружено, что концентрация а.о. в растворе 1 монотонно уменьшается с ростом дозы облучения (рис. 4, а), тогда как в присутствии кофеина (в растворе 2) — практически не меняется при дозах облучения до 500 Гр (см. рис. 4, б). На рис. 5 показано относительное изменение $\varepsilon_{260}(P)$ неденатурированной ДНК в зависимости от дозы облучения с учетом уменьшения концентрации хромофоров в облученных растворах. Сравнение дозовых зависимостей а и б на рис. 4 и 5 показывает, что в присутствии кофеина в облучаемом растворе практически отсут-

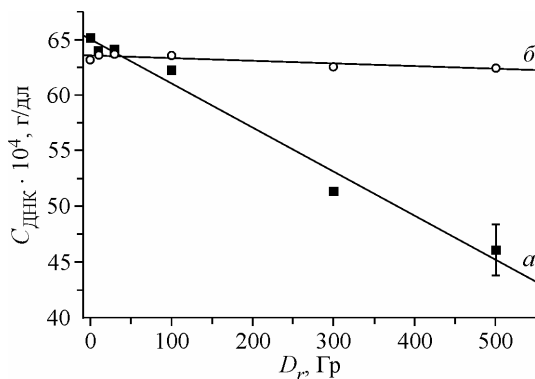


Рис. 4. Концентрация а.о. ДНК в зависимости от дозы γ -облучения при $C_{\text{коф}} = 0$ (а), при $C_{\text{коф}} = 1,3 \cdot 10^{-3}$ М/л (б)

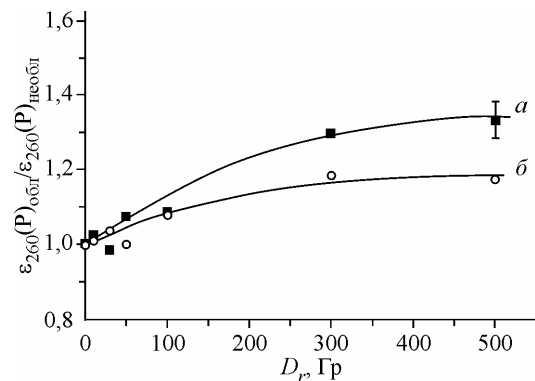


Рис. 5. Относительное изменение молярного коэффициента экстинкции ДНК в зависимости от дозы γ -облучения при $C_{\text{коф}} = 0$ (а), при $C_{\text{коф}} = 1,3 \cdot 10^{-3}$ М/л (б)

вуют разрушенные а.о., а также заметно снижается степень повреждения вторичной структуры ДНК под действием γ -облучения. Таким образом, все полученные нами результаты свидетельствуют о том, что кофеин проявляет радиопротекторные свойства *in vitro*. Учитывая, что, как следует из наших исследований, а также из литературных данных [16, 17], степень связывания кофеина с ДНК весьма мала, т.е. молекулы кофеина в основном присутствуют в растворе в свободном состоянии, можно предположить, что защитное действие кофеина осуществляется путем перехвата активных продуктов радиолиза воды. Способность кофеина перехватывать некоторые активные кислородсодержащие соединения также известна из литературы [30].

Работа выполнена при поддержке АВЦП "Развитие научного потенциала высшей школы" (проект № 2.1.1/4011) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 09-08-01119-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: Медицина, 1987.
2. Piosik J., Gwizdek-Wiśniewska A., Ulanowska K. et al. // Acta Biochim. Polonica. – 2005. – **52**. – P. 923.
3. Веселков Д.А., Сигаев В.А., Высоцкий С.А. и др. // Журн. структур. химии. – 2000. – **41**. – С. 86.
4. Bedner E., Du L., Traganos F., Darzynkiewicz Z. // Cytometry. – 2001. – **43**. – P. 38.
5. Битехтина М.А., Векшин Н.Л. // Биоорган. химия. – 2008. – **34**. – С. 256.
6. Bhaskara S., Dean E.D., Lam V., Ganguly R. // Gene. – 2006. – **377**. – P. 56.
7. Johnson I.M., Kumar S.G., Malathi R. // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2003. – **20**. – P. 687.
8. Araya R., Hirai I., Meyerkord C.L., Wang H.-G. // FEBS Lett. – 2005. – **579**. – P. 157.
9. Conney A.H., Zhou S., Lee M.-J. et al. // Toxicol. and Applied Pharm. – 2007. – **224**. – P. 209.
10. Kaufmann W.K., Heffernan T.P., Beaulieu L.M. et al. // Mutat. Res. – 2003. – **532**. – P. 85.
11. Soilov L.M., Mullenders L.H.F., Natarajan A.T. // Mutat. Res. – 1994. – **311**. – P. 169.
12. Анищенко Д.Б., Шестопалова А.В., Березняк Е.Г., Малеев В.Я. // Биофиз. вестн. ХНУ. – 2003. – № 593, вып. 1. – С. 13.
13. Deriabina A.S., Grokhlina T.I., Polteva N.A. et al. // J. Mol. Struct.: THEOCHEM. – 2006. – **769**. – P. 97.
14. Грохлина Т.И., Полтева Н.А., Гонсалес Э. и др. // Биофизика. – 2005. – **50**. – С. 818.
15. Nafisi S., Manouchehri F., Tajmir-Riahi Heidar-Ali, Varavipour M. // J. Mol. Struct. – 2008. – **875**. – P. 392.
16. Осипов Н.Д., Кондратьева О.П., Фрисман Э.В. // Вестн. ЛГУ. – 1979. – № 4. – С. 98.
17. Тарасов А.Е. // В сб. трудов молодежной научной конференции "Физика и Прогресс". – Санкт-Петербург, 2008. – С. 230.
18. Eigner J., Doty P. // J. Mol. Biol. – 1965. – **12**. – P. 549.
19. Спиринов А.С. // Биохимия. – 1958. – **23**. – С. 656.
20. Фрисман Э.В., Щагина Л.В., Воробьев В.И. // Коллоид. журн. – 1965. – **27**. – С. 130.
21. Flory P. Principles of the polymer chemistry. – N.-Y.: Cornell Univ. Press, 1953.
22. Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я. Структура макромолекул в растворах. – М.: Наука, 1964.
23. Фрисман Э.В., Сибилева М.А., Красноперова А.В. // Высокомолекуляр. соединения. – 1959. – **1**. – С. 597 – 606.
24. Peterlin A.A. // J. Polym. Sci. – 1954. – **12**. – P. 45 – 51.
25. Фрисман Э.В., Воробьев В.И., Щагина Л.В. // Высокомолекуляр. соединения. – 1964. – **6**, № 5. – С. 884 – 890.
26. Галлямов М.О., Яминский И.В. Сканирующая зондовая микроскопия нуклеиновых кислот. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1998.
27. Морозкина Е.Б., Касьяненко Н.А. Взаимодействие макромолекул с лигандами. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 1998.
28. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). – М.: Физматлит, 2004.
29. Крушинская Н.П. В кн.: Первичные радиобиологические процессы / Под ред. Н.В. Тимофеева-Ресовского. – М.: Атомиздат, 1973.
30. Devasagayam T.P., Kamat J.P., Mohan H. et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 1996. – **1282** (1). – P. 63.