

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА АЦЕТАТА АБИРАТЕРОНА С ДЦДНК

В.В. Пронина¹, Л.Е. Агафонова¹, Р.А. Масамрех^{1,2}, А.В. Кузиков^{1,2}, В.В. Шумянцева^{1,2}*Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича,
Москва, 119121, ул. Погодинская 10; e-mail: viktorija.shumyantseva@ibmc.msk.ru²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва

Методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии исследованы электроаналитические характеристики двухцепочечной ДНК (дцДНК) и комплекса дцДНК и противоопухолевого препарата ацетата абиратерона (АА). Показано влияние ацетата абиратерона на дцДНК, регистрируемое по изменению интенсивности электрохимического окисления пуриновых гетероциклических азотистых оснований гуанина и аденина с использованием печатных электродов, модифицированных функционализированными углеродными нанотрубками. Константы связывания (K_b) комплекса [дцДНК-АА], для гуанина и аденина, составили $1.63 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $1.93 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ соответственно. Рассчитаны электрохимические коэффициенты токсического эффекта как отношение интенсивности сигналов электроокисления гуанина и аденина, входящих в состав дцДНК, в присутствии АА к интенсивности сигналов электроокисления этих азотистых оснований без лекарства (%). При концентрациях АА, превышающих 60 мкМ, регистрируется снижение токов электрохимического окисления гуанина и аденина на 50% и более. На основании анализа электрохимических параметров и значений констант связывания сделано предположение о механизме взаимодействия АА с ДНК преимущественно за счет образования водородных связей с малой бороздкой.

Ключевые слова: электроанализ; углеродные нанотрубки; модифицированный электрод; абиратерон; ДНК; константа связывания

DOI: 10.18097/BMCRM00174

ВВЕДЕНИЕ

Выяснение механизма действия лекарства на ДНК является одним из ключевых вопросов фармакогеномных исследований для понимания природы многих типов заболеваний, механизма действия лекарств на организм и разработки новых фармацевтических препаратов [1-3]. ДНК является фармакологической мишенью многих лекарств, которые, связываясь с ДНК, могут влиять на жизненно важные функции клеток, воздействуя на экспрессию, модифицируя гистоны, вызывая карциногенез или мутагенез. Химическая реакционная способность лекарственных препаратов и образование активных форм кислорода может приводить к повреждению ДНК и разрывам сахарофосфатного остова [4]. Взаимодействие лекарства с двухцепочечной ДНК может происходить различными способами, включая интеркаляцию, связывание в бороздках спирали, электростатическое взаимодействие, расщепление ДНК и встраивание аналогов нуклеозидов [5, 6]. Понимание механизмов комплексообразования ДНК с лекарством имеет решающее значение для создания новых лекарственных препаратов [7]. Индукция повреждения или разрывов цепи ДНК является серьезной проблемой для многих противоопухолевых терапий, мишенью которых является ДНК. Кроме того, для экспериментальной и клинической онкологии необходим дизайн новых ДНК-связывающих молекул, способных изменять архитектуру ДНК и блокировать транскрипцию, не вызывая повреждения ДНК.

Количественный анализ ДНК, нуклеотидов, нуклеозидов, гетероциклических оснований (ГЦО) может быть проведен различными методами: абсорбционной спектроскопией, где регистрируется интегрированный

спектр поглощения ДНК, флуоресцентной спектроскопией с введением флуоресцентных «меток», полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с необходимым набором дополнительных реактивов и автоматизированного оборудования [8, 9]. Электрохимический метод количественного анализа ДНК имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами. Его отличают высокая чувствительность, малый объем проб (0.5–60 мкл), непродолжительное время анализа, регистрация пуриновых и пиримидиновых ГЦО при соответствующем выборе типа рабочих электродов [10-17]. Кроме того, наноструктурирование рабочей поверхности электродов (модификация электродов наноматериалами) позволяет подобрать оптимальные условия, сделать селективный сенсор выбранной электрохимической реакции определяемого вещества, а также обеспечить необходимые аналитические характеристики метода, такие как биосовместимость, предел обнаружения, широкий диапазон определяемых концентраций аналита. Электрохимические ДНК-биосенсоры используются для анализа взаимодействия с ДНК при обнаружении и количественном определении химических веществ, таких как лекарства, метаболиты, биомаркеры [11-14].

Рак предстательной железы является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний. Фармакотерапия этого заболевания направлена на снижение уровня андрогенов за счёт использования ингибиторов цитохрома P450 17A1 (17 α -гидроксилазы, 17,20-лиазы) как ключевого фермента биосинтеза андрогенов, а также на блокирование взаимодействия андрогенов с рецепторами андрогенов опухолевых клеток [18-27].

Абиратерон (рис. 1) широко используют для лечения пациентов, страдающих метастазирующим кастрационно-резистентным раком предстательной железы; при его



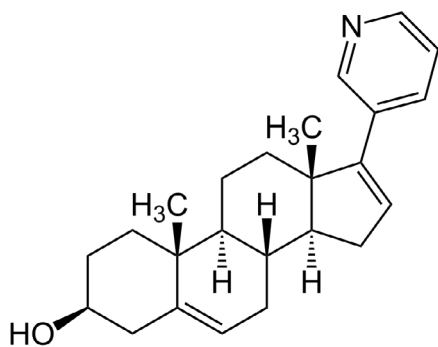


Рисунок 1. Структурная формула абиратерона (17-(3-пиридил)андроста-5,16-диен-3β-ол).

приёме в форме ацетата абиратерона (АА) в дозе 1000 мг/день наблюдается снижение уровня тестостерона до <50 нг/мл, что приводит к сокращению пролиферации опухолевых клеток, чувствительных к тестостерону [24–26]. Несмотря на активное использование абиратерона в медицинской практике, фармакологические мишени этого препарата недостаточно исследованы, за исключением ряда изоформ цитохрома P450 (21A2, 51A1, 11A1, 11B2, 19A1, 3A4, 2D6, 2C8), а также 3β-гидроксистероиддегидрогеназы [19–21]. Взаимодействие абиратерона с ДНК ранее было исследовано методами флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии [26]. На основе анализа спектральных характеристик и величины изменения свободной энергии ΔG был сделан вывод о термодинамически выгодном самопроизвольном процессе, включающем механизм образования водородных связей и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий за счет связывания абиратерона с ДНК в малой бороздке.

Цель данной работы – исследование механизма взаимодействия АА с дцДНК электрохимическими методами и оценка диапазона концентраций, оказывающих влияние на электрохимический сигнал окисления пуриновых азотистых оснований, входящих в состав дцДНК.

МЕТОДИКА

Трехконтактные печатные графитовые электроды (ПГЭ) были приобретены у «ColorElectronics» (Россия). Электрохимические измерения выполняли на приборе потенциостат/гальваност Autolab 302N («Metrohm Autolab BV», Нидерланды) с программным обеспечением Nova (версия 2.0). Все электрохимические потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного (Ag/AgCl) электрода сравнения.

Функционализированные углеродные нанотрубки (фУНТ) были приготовлены согласно методике [28]. Двухцепочечная ДНК, выделенная из молок осетровых рыб, и плазмида pBR322 были получены от «Sigma-Aldrich» (США). АА был получен от «Chemleader Biomedical» (Китай). Все остальные реактивы отечественного производства имели аналитическую чистоту и использовались без дополнительной очистки. Водные растворы были приготовлены с использованием воды Milli-Q, очищенной с помощью системы очистки Milli-Q water («Millipore», США).

Все электрохимические измерения проводили при комнатной температуре в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7.4) с 50 мМ NaCl в качестве фонового

электролита. Прямое электрохимическое окисление дцДНК регистрировали при помощи метода дифференциально-импульсной вольтамперометрии (ДИВА), используя следующие параметры: диапазон потенциалов 0.4–1.1 В, амплитуда импульса 0.025 В, шаг потенциала 0.005 В, длительность импульса 50 мс, амплитуда модуляции 0.05 В.

Исходный раствор дцДНК (3 мг/мл) готовили в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7.4) с 50 мМ NaCl. Разведение исходного раствора дцДНК проводили тем же буфером. Исходный 10 мМ раствор АА готовили в смеси этанола и 100 мМ калий-фосфатного буфера, 50 мМ NaCl (рН 7.4) в соотношении 1:1. Разведение исходного раствора АА проводили тем же буфером. Для электрофореза готовили 1% агарозный гель, затем его нагревали и добавляли бромистый этидий до полного остывания, затем планшет помещали в ванну с трис-ацетатным буфером (ТАЕ).

Рабочую поверхность ПГЭ модифицировали 2 мкл дисперсией 1 мг/мл фУНТ в этаноле, приготовленной при помощи ультразвуковой дезинтеграции в течение 5 мин. фУНТ исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе HitachiS-5500 («Hitachi», Япония). Внешний диаметр фУНТ составлял 56 ± 10 нм.

Электронакопление дцДНК (из 60 мкл раствора дцДНК заданной концентрации) на поверхности модифицированного электрода ПГЭ/фУНТ проводили при потенциале 0.4 В в течение 15 мин. Во всех экспериментах использовали горизонтальный режим измерений. Для исследования взаимодействия дцДНК-АА комплекс дцДНК с АА готовили в заданных концентрациях и инкубировали в течение 15 мин, затем проводили измерения сигнала окисления пуриновых азотистых оснований дцДНК методом ДИВА.

Расчёт электроактивной площади электродов, модифицированных фУНТ, проводили методом циклической вольтамперометрии (ЦВА) в диапазоне потенциалов от 0.8 В до -0.3 В, скорости развертки потенциала от 10 мВ/с до 100 мВ/с. Измерения проводили в вертикальном режиме, электрод погружали в кювету, содержащую 1 мл 5 мМ раствора феррицианида калия в 0.1 М KCl.

Расчёт электроактивной поверхности осуществляли из линейной зависимости I_p от корня квадратного скорости развертки потенциала в соответствии с уравнением Рэндлса-Шевчика (1) [29, 30]:

$$I_p = 2.69 \times 10^5 \times A \times \sqrt{D} \times \sqrt{v} \times C \times n^{3/2} \quad (1),$$

где I_p – ток пика восстановления феррицианида (А), A – площадь электроактивной поверхности электрода (см²), D – коэффициент диффузии (см²/с), v – скорость развертки потенциала (В/с), C – концентрация феррицианида (М), n – число электронов, участвующих в электрохимической реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электроаналитические характеристики ПГЭ/фУНТ

Для исследования электроаналитических характеристик электродов, модифицированных фУНТ (ПГЭ/фУНТ), были проанализированы циклические вольтамперограммы (ЦВА) с использованием внешнего электролита феррицианида калия

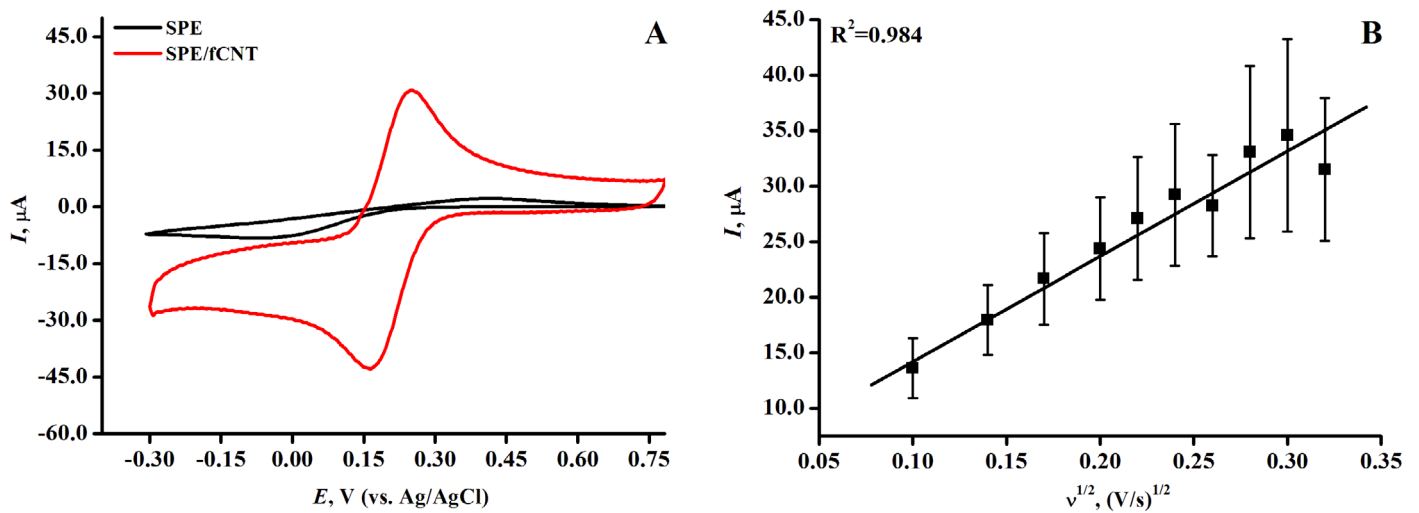


Рисунок 2. (А) ЦВА: (-) ПГЭ и (-) ПГЭ/фУНТ, при скорости сканирования 50 мВ/с в диапазоне потенциалов 0.8 – -0.3 В (отн. Ag/AgCl). Измерения проводили в вертикальном режиме в 1 мл 5 мМ раствора феррицианида калия. (Б) Зависимость тока электровосстановления феррицианида от корня квадратного из скорости сканирования для модифицированного ПГЭ/фУНТ.

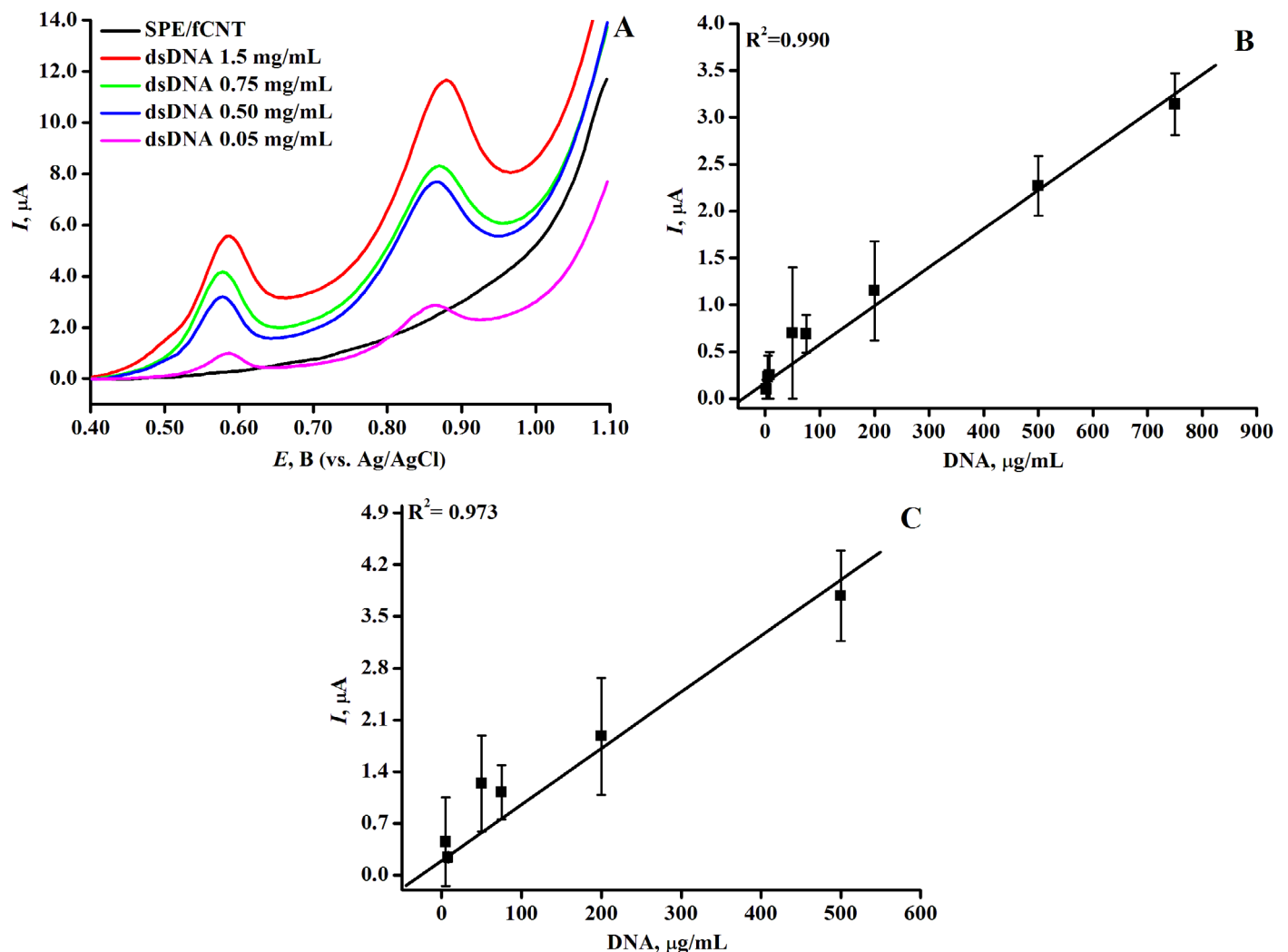


Рисунок 3. (А) ДИВА ПГЭ/фУНТ с различной концентрацией дцДНК. На рабочую поверхность электродов наносили 60 мкл дцДНК с концентрацией: (-) 1.5 мг/мл, (-) 0.75 мг/мл, (-) 0.5 мг/мл, (-) 0.05 мг/мл, (-) ПГЭ/фУНТ. Электролит 100 мМ калий-фосфатный буфер, содержащий 50 мМ NaCl (рН 7/4) Потенциал электронакопления (аккумуляции) 0/4 В, время аккумуляции 15 минут, амплитуда импульса 0/025 В, шаг потенциала 0/005 В, длительность импульса 50 мс, амплитуда модуляции 0/05 В. Все потенциалы отнесены к электроду сравнения Ag/AgCl. (Б) Зависимость величины интенсивности тока электроокисления гуанина от концентрации дцДНК. (В) Зависимость величины интенсивности тока электроокисления аденина от концентрации дцДНК.

Таблица 1. Электроаналитические характеристики дцДНК с использованием ПГЭ/фУНТ

E_{ox} , В	Гуанин	Аденин
	0.59 ± 0.03	0.86 ± 0.04
Чувствительность, мкА/мкг/мл	0.004	0.008
Диапазон концентраций, в котором наблюдается линейная зависимость тока от концентрации ДНК, мкг/мл	0–750	0–500
Характер зависимости тока от концентрации ДНК в линейном диапазоне	$I_{0.59} = 0.00411C + 0.16768$	$I_{0.85} = 0.00761C + 0.19514$
Предел определяемых концентраций LOD, мкг/мл	1.57	1.03
Предел количественного определения LOQ, мкг/мл	4.77	3.13

Примечание. Относительное стандартное отклонение оценивали не менее чем для трех измерений ($n = 3$).

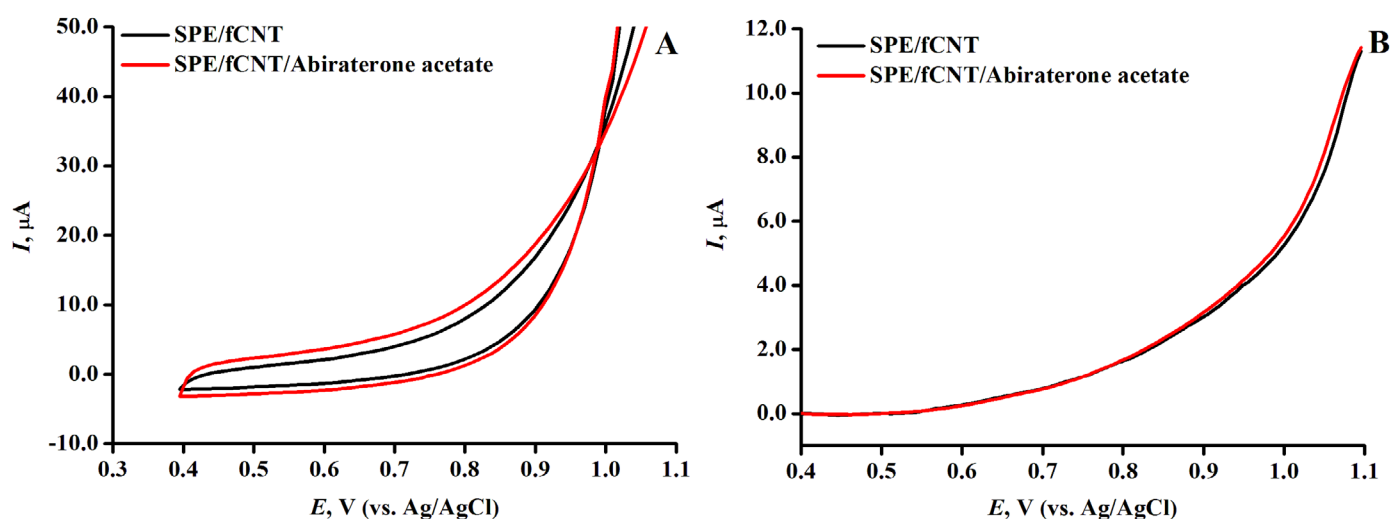


Рисунок 4. (А) ЦВА ПГЭ/фУНТ/ацетат абиратерона с концентрацией ацетата абиратерона 10 мМ в диапазоне потенциалов 0.4–1.1 В (отн. Ag/AgCl). (Б) ДИВА ПГЭ/фУНТ/ ацетат абиратерона в диапазоне потенциалов 0.4–1.1 В (отн. Ag/AgCl).

$K_3Fe(CN)_6$. Методом ЦВА регистрировали сравнительные значения интенсивности сигналов электровосстановления/электроокисления $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ на ПГЭ и модифицированном ПГЭ/фУНТ (рис. 2 А). Для расчёта площади электроактивной поверхности была построена зависимость интенсивности электровосстановления от корня квадратного из скорости сканирования (рис. 2 Б).

На ЦВА присутствуют два пика, характеризующие процессы восстановления и окисления на поверхности ПГЭ феррицианида ($Fe(CN)_6^{3-/4-}$). Потенциалы восстановления и окисления феррицианида имеют значения 0.162 ± 0.006 В и 0.252 ± 0.003 В (отн. Ag/AgCl) соответственно. Наблюдается линейная зависимость между величиной пика восстановления и корнем квадратным из скорости развертки потенциала, что свидетельствует о диффузионно-контролируемом процессе [29, 31]. Электроаналитические характеристики электродов, модифицированных фУНТ, продемонстрировали существенное увеличение электроактивной площади модифицированных электродов (в 5 раз) по сравнению с немодифицированными электродами (0.0024 см^2 и 0.0121 см^2 для ПГЭ и ПГЭ/фУНТ соответственно).

Количественный анализ дцДНК методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии, сопряженной с инверсионной вольтамперометрией

Количественный анализ дцДНК проводили на основе анализа интенсивности электрохимического окисления пуриновых гетероциклических оснований аденина и гуанина [32–34]. Измерения проводили методом ДИВА, сопряженной с электронакоплением образца методом инверсионной вольтамперометрии (ИВА) при потенциале 0.4 В в течение 15 мин. Снижение интенсивности пиков электрохимического окисления пуриновых оснований при повторных измерениях показывает необратимость электрохимического процесса (дополнительные материалы).

ДИВА системы ПГЭ/фУНТ/ДНК демонстрируют два пика в области потенциалов 0.59 ± 0.03 В и 0.86 ± 0.04 В (отн. Ag/AgCl), которые соответствуют электрохимическому окислению гуанина и аденина (рис. 3А). Зависимость амплитуды тока электроокисления гуанина и аденина дцДНК от концентрации линейна в диапазоне концентраций 0–750 мкг/мл для гуанина и 0–500 мкг/мл для аденина (рис. 3 Б,В).

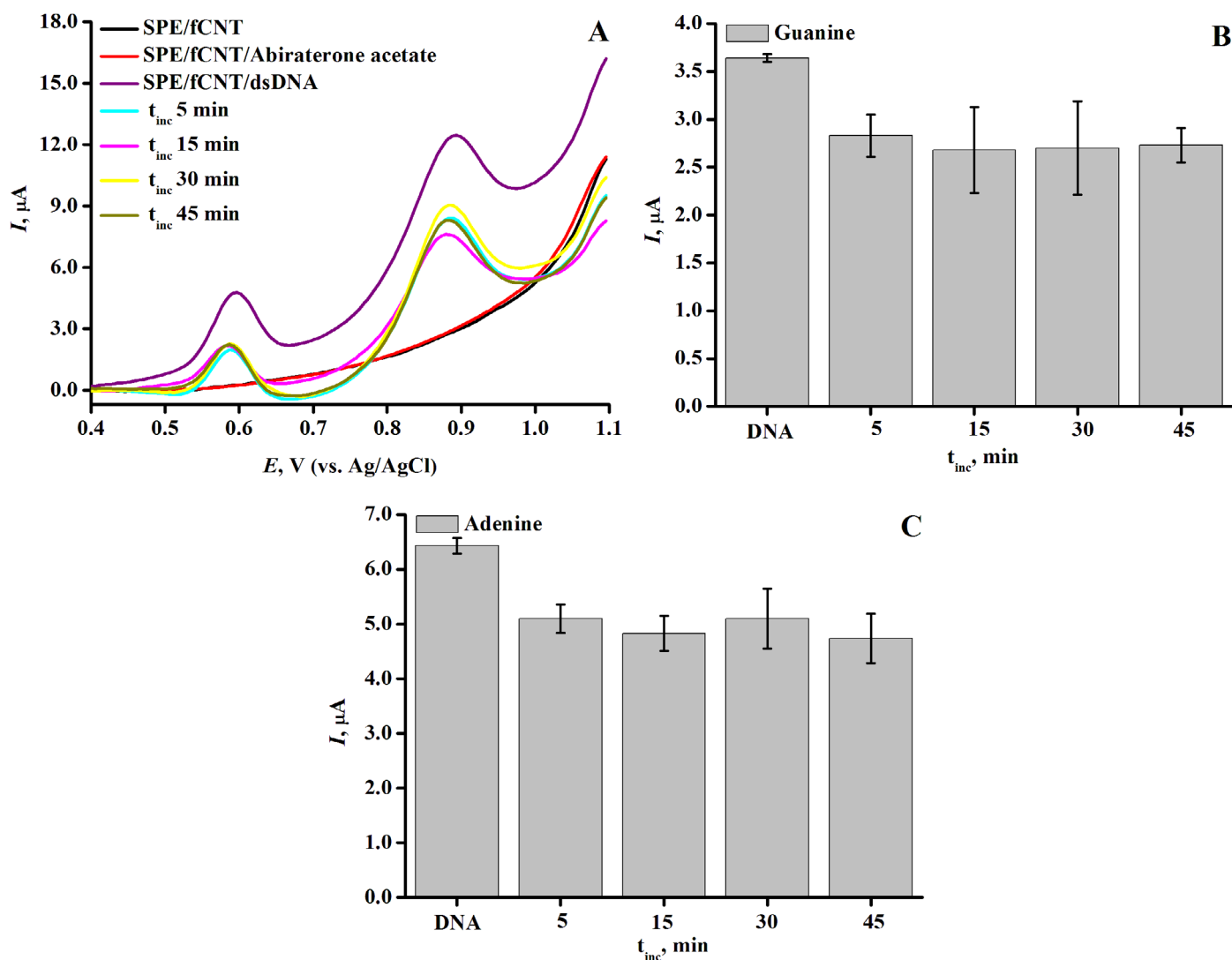


Рисунок 5. (А) ДИВА ПГЭ/фУНТ. На рабочую поверхность электрода наносили 60 мкл раствора дцДНК 1.5 мг/мл и раствор дцДНК 1.5 мг/мл с 50 мкМ абиратероном с различным временем инкубации комплекса: (-) 5 мин, (-) 15 мин, (-) 30 мин, (-) 45 мин, (-) 60 мин, (-) ПГЭ/фУНТ, (-) ПГЭ/фУНТ/абиратерон, (-) ПГЭ/фУНТ/ДНК. Параметры эксперимента: диапазон потенциалов 0.4–1.1 В, амплитуда импульса 0.025 В, шаг потенциала 0,005 В, длительность импульса 50 мс, амплитуда модуляции 0.05 В. (Б) Зависимость интенсивности сигнала электроокисления гуанина при взаимодействии абиратерона с дцДНК от времени инкубации. (В) Зависимость интенсивности сигнала электроокисления аденина при взаимодействии абиратерона с дцДНК от времени инкубации.

Электроаналитические характеристики пуриновых оснований гуанина и аденина приведены в таблице 1. Количественная регистрация дцДНК на ПГЭ/фУНТ является воспроизводимой, а аналитические характеристики ПГЭ/фУНТ/ДНК сравнимы с опубликованными данными модифицированных электродов, которые использовались для регистрации дцДНК ранее (дополнительные материалы). Электроаналитические характеристики демонстрируют низкий предел определяемых концентраций дцДНК и высокую чувствительность анализа.

Модификация электродов функционализированными углеродными нанотрубками (ПГЭ/фУНТ) позволяет регистрировать ДНК на основе интенсивности электрохимического окисления гуанина и аденина при потенциалах 0.59 ± 0.03 В и 0.86 ± 0.04 В (отн. Ag/AgCl) соответственно, что может быть использовано для электрохимического анализа комплекса дцДНК-АА. Амплитуды токов электрохимического окисления пуриновых оснований (10^{-6} мкА для концентраций ДНК

0.2–3.0 мг/мл) позволяют чётко и достоверно проследить влияние препарата на биомолекулу.

Исследование электроактивности ацетата абиратерона на ПГЭ/фУНТ

Анализ электрохимической активности АА выполнен с использованием графитовых электродов с модификацией рабочей поверхности фУНТ. Электроактивность 10 мМ АА исследовали методами ЦВА и ДИВА в 60 мкл буфера в диапазоне потенциалов 0.4–1.1 В (отн Ag/AgCl), который соответствует диапазону значений потенциалов регистрации дцДНК (рис. 4).

АА не проявляет электроактивность в области значений потенциалов электроокисления пуриновых оснований с использованием ПГЭ/фУНТ, что позволяет проводить электрохимический анализ комплекса дцДНК-АА на основе регистрации сигналов электрохимического окисления гуанина и аденина. В отличие от исследований, проведенных

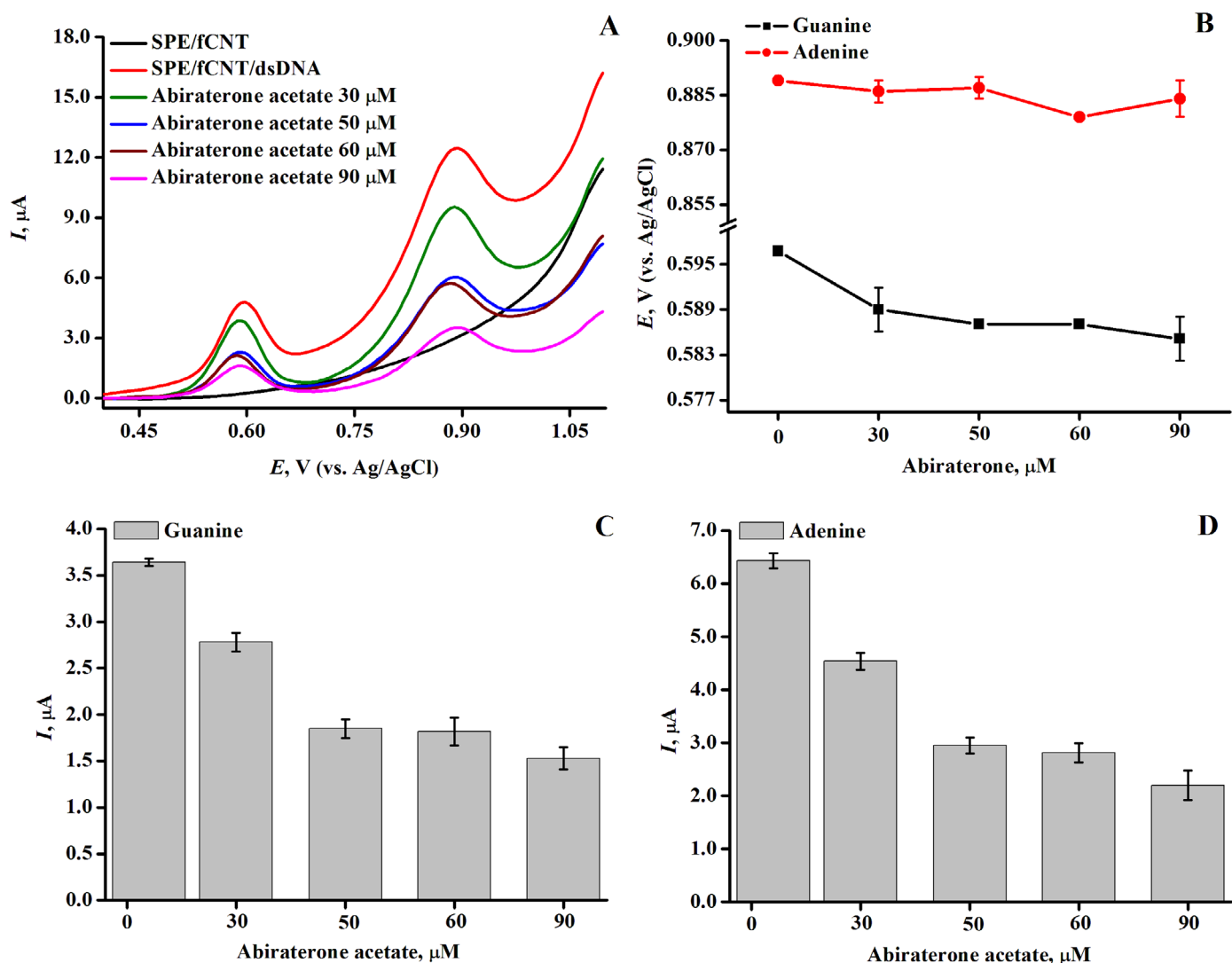


Рисунок 6. (А) ДИВА ПГЭ/фУНТ/дцДНК и ПГЭ/фУНТ/дцДНК/ ацетат абиратерона с различной концентрацией препарата: (-) 30 мкМ, (-) 50 мкМ, (-) 60 мкМ, (-) 90 мкМ, (-) ПГЭ/фУНТ/ацетат абиратерона, (-) ПГЭ/фУНТ/дцДНК. Параметры ДИВА: диапазон потенциалов 0.4–1.1 В, амплитуда импульса 0.025 В, шаг потенциала 0.005 В, длительность импульса 50 мс, амплитуда модуляции 0.05 В. (Б) Зависимость значений потенциалов электроокисления пуриновых оснований дцДНК от концентрации ацетата абиратерона в диапазоне 0–90 мкМ. (В) Влияние терапевтических концентраций ацетата абиратерона (0–90 мкМ) на интенсивность электроокисления гуанина дцДНК; (Г) Влияние терапевтических концентраций ацетата абиратерона (0–90 мкМ) на интенсивность электроокисления аденина дцДНК.

спектральными методами при постоянной концентрации АА и варьируемой концентрации дцДНК [26], алгоритм анализа данного исследования заключался в исследовании влияния возрастающих концентраций АА на интенсивность сигналов электрохимического окисления гуанина и аденина при постоянной концентрации дцДНК (1.5 мг/мл). Такой подход дает информацию о концентрационной зависимости противоопухолевого препарата на генетический материал и позволяет сделать выводы о влиянии препарата на ДНК.

Оптимизация условий регистрации комплекса дцДНК-АА

Выбор оптимальных условий для регистрации влияния препарата на дцДНК основывался на определении наибольшего влияния на интенсивность электроокисления дцДНК (1.5 мг/мл) и АА (50 мкМ) после инкубации методом ДИВА (рис. 5). Пик в области потенциалов 0.59 ± 0.03 В соответствует электроокислению гуанина, пик в области потенциалов 0.86 ± 0.04 В соответствует электроокислению аденина.

Как следует из рисунка 5 Б, В, наиболее интенсивное уменьшение тока электроокисления дцДНК наблюдается для времени инкубации 15 мин, это время было выбрано оптимальным для анализа образования комплекса дцДНК-АА.

Исследование влияния концентрации ацетата абиратерона на комплексобразование с ДНК

Терапевтические концентрации лекарственных препаратов в крови пациентов регистрируются в диапазоне микромолярных значений [25–27]. Для анализа влияния АА на ДНК 0–90 мкМ препарата инкубировали с дцДНК в течение 15 мин и регистрировали ДИВА в диапазоне потенциалов 0.4–1.1 В. На вольтамперограмме наблюдаются два пика в области потенциалов 0.6 В и 0.9 В, что соответствует электроокислению комплекса дцДНК-АА для гуанина и аденина соответственно. Согласно данным таблицы 2 были построены гистограммы зависимости интенсивности электроокисления гуанина и аденина от концентрации АА (рис. 6).

Таблица 2. Электроаналитические характеристики комплекса дцДНК-АА на ПГЭ/фУНТ

Концентрация абиратерона, мкМ	Гуанин		Аденин	
	E, В± SD	I, мкА ± SD	E, В± SD	I, мкА ± SD
0	0.590±0.003	3.64±0.04	0.884±0.005	6.426±0.14
30	0.589±0.003	2.78±0.10	0.886±0.003	4.54±0.16
50	0.587±0.000	1.85±0.10	0.887±0.003	2.95±0.15
60	0.587±0.000	1.82±0.15	0.879±0.000	2.81±0.18
90	0.585±0.003	1.53±0.12	0.884±0.005	2.20±0.28

Примечание. Концентрация дцДНК во всех экспериментах 1.5 мг/мл.

Таблица 3. Электрохимический коэффициент токсического эффекта ацетата абиратерона 30÷90 мкМ на дцДНК

Концентрация абиратерона, мкМ	k, %			
	G	Коэффициент токсичности	A	Коэффициент токсичности
30	76	Умеренно токсичен	71	Умеренно токсичен
50	51	Умеренно токсичен	46	Токсичен
60	50	Умеренно токсичен	44	Токсичен
90	42	Токсичен	34	Токсичен

В таблице 2 представлены электроаналитические характеристики комплексов электродов дцДНК-АА. Как следует из рисунка 6 А, В, Г, регистрируется концентрационно-зависимое (в диапазоне концентраций 0–90 мкМ) снижение интенсивности электроокисления гуанина и аденина дцДНК.

При взаимодействии лигандов с ДНК по механизму интеркаляции регистрируется смещение потенциалов электрохимического окисления ГЦО в положительную (анодную) область потенциалов, смещение в отрицательную (катодную) область потенциалов может свидетельствовать об образовании водородных связей и/или электростатических взаимодействиях в системе ДНК-лиганд [1, 10, 35]. Зависимость потенциала электроокисления от концентрации АА в диапазоне 0–90 мкМ демонстрирует смещение в катодную область на 12 мВ для гуанина и на 5 мВ для аденина, что отражает более термодинамически выгодный электрохимический процесс (рис. 6Б). Смещение потенциала в отрицательную область свидетельствует об отсутствии интеркаляционных взаимодействий и о взаимодействии с бороздками ДНК за счет образования водородных связей [1, 10, 35]. В процессе взаимодействия образуется электрохимически менее активный, чем дцДНК, комплекс дцДНК-АА, что отражается в снижении амплитуд электрохимического окисления гуанина и аденина. Результаты электрохимического анализа взаимодействий находятся в соответствии с ранее проведенными спектральными исследованиями комплекса ДНК/абиратерон [26].

Электрохимический коэффициент токсичности препарата (S%) оценивали при каждой концентрации АА как величину соотношения тока электроокисления гуанина или аденина по формуле (2):

$$S = \left(\frac{S_s}{S_b} \right) * 100\% \quad (2),$$

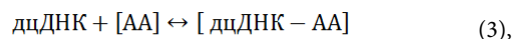
где S_b и S_s – интенсивности токов электроокисления пуриновых оснований до и после взаимодействия АА

с дцДНК соответственно. По принятым критериям препарат считается нетоксичным, если коэффициент токсичности (S) больше 85%; препарат относится к умеренно токсичным, если S имеет значения от 50% до 85%, и препарат токсичен, если S меньше 50% [17, 31, 33, 34]. Электрохимические коэффициенты токсического эффекта для концентраций препарата 30 мкМ, 50 мкМ, 60 мкМ и 90 мкМ, рассчитанные по снижению интенсивности амплитуд электроокисления гуанина и аденина, приведены в таблице 3.

При концентрациях АА выше 60 мкМ происходит интенсивное снижение сигналов ДНК (величина S меньше 50%), что позволяет отнести эти концентрации к токсичным. Терапевтически значимые концентрации АА 20–360 нМ для стандартной дозы 1000 мг/день [25-27, 35, 36] существенно ниже, что позволяет предположить отсутствие токсичности для более низких концентраций этого препарата.

Определение константы связывания

Константу связывания для процесса образования комплекса дцДНК-АА (3) рассчитывали по уравнению (4) при постоянной концентрации дцДНК 1.5 мг/мл.



$$\log \left(\frac{1}{[\text{АА}]} \right) = \log K_b + \log \left(\frac{I_{\text{дцДНК-АА}}}{I_{\text{дцДНК}} - I_{\text{дцДНК-АА}}} \right) \quad (4),$$

где K_b – константа связывания, (M^{-1}), $I_{\text{дцДНК}}$ – максимальная амплитуда тока электроокисления дцДНК, $I_{\text{дцДНК-АА}}$ – максимальная амплитуда тока электроокисления комплекса дцДНК-АА [1, 26, 37].

Пересечение линейного графика зависимости $\log(1/[\text{АА}])$ от $\log(I_{\text{дцДНК-АА}})/(I_{\text{дцДНК}} - I_{\text{дцДНК-АА}})$ использовали для определения значения константы связывания гуанина и аденина (рис. 7).

Для гуанина значение константы связывания равно $1.63 \times 10^4 M^{-1}$ и 0.96, а для аденина $1.93 \times 10^4 M^{-1}$.

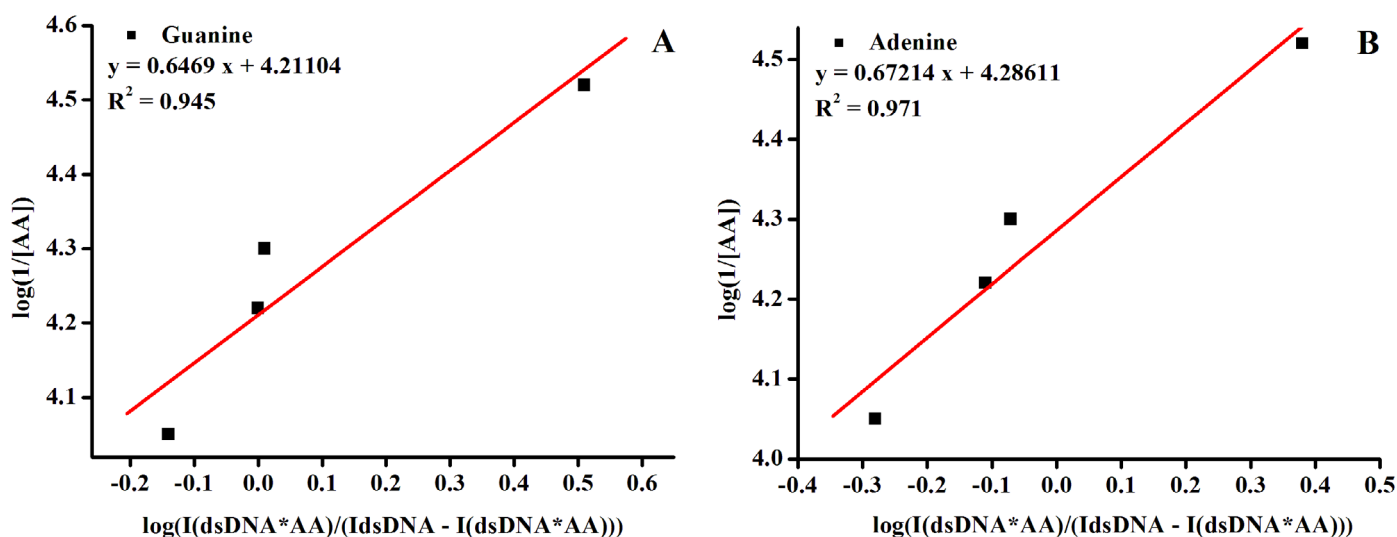


Рисунок 7. (А) Зависимость $\log(1/[AA])$ от $\log(I(\text{dsDNA} \cdot AA)/(I(\text{dsDNA}) - I(\text{dsDNA} \cdot AA)))$ для определения значения константы связывания для гуанина. (Б) Зависимости $\log(1/[AA])$ от $\log(I(\text{dsDNA} \cdot AA)/(I(\text{dsDNA}) - I(\text{dsDNA} \cdot AA)))$ для определения значения константы связывания для аденина.

Константы связывания для интеркаляции и взаимодействия лиганда с бороздками ДНК находятся в пределах 10^5 – 10^9 M^{-1} . Для электростатических взаимодействий константы связывания имеют существенно более низкие значения (как правило, 10^3 M^{-1}). На основании анализа полученных результатов по смещению потенциалов электрохимического окисления гуанина и аденина при образовании комплекса ДНК-лекарство и значений констант связывания можно сделать вывод о механизме взаимодействия АА с бороздкой дцДНК за счет образования водородных связей, способствующих таким взаимодействиям [17, 26, 37-41]. Полученные нами результаты находятся в соответствии с результатами, полученными с помощью спектральных исследований и молекулярного моделирования комплекса дцДНК-абиратерон, исключая интеркаляционные взаимодействия [26].

Исследование влияния ацетата абиратерона на длину фрагментов дцДНК и плазмиды

Многие лекарственные препараты способны вызывать фрагментацию ДНК, что может приводить к нежелательным побочным эффектам. Для исследования фрагментации и целостности дцДНК после взаимодействия с АА в диапазоне концентраций 0–50 μM были проведены исследования методом электрофореза в агарозном геле. Объектом исследования была также плазида рBR322. Электрофореграмма подтвердила целостность молекул ДНК и плазмиды рBR322 после взаимодействия с АА: не наблюдалось фрагментов с меньшей молярной массой, чем исходные мишени (дополнительные материалы).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан чувствительный электрохимический метод анализа ДНК с пределом определяемых концентраций 1-1.6 $\mu g/ml$. ДНК-сенсор был применен для исследования взаимодействия противоопухолевого препарата АА с дцДНК при одновременной регистрации изменений токов электроокисления гуанина и аденина, что является преимуществом по сравнению со спектральными методами, где регистрируется интегральный сигнал ДНК. При концентрациях выше 60 μM АА влияет на дцДНК, вызывая

снижение сигналов ДНК более, чем на 50%. Смещение потенциалов электроокисления аденина и гуанина ДНК в катодную область при увеличении концентрации АА отражает механизм взаимодействия препарата с бороздкой дцДНК за счет образования водородных связей и исключает интеркаляцию лекарства. АА не вызывает фрагментацию ДНК, что подтверждено отсутствием фрагментов ДНК с меньшей молярной массой при анализе электрофореграмм.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период 2021 - 2030 годы (№122030100168-2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bolat, G. (2020) Investigation of poly(CTAB-MWCNTs) composite based electrochemical DNA biosensor and interaction study with anticancer drug Irinotecan. *Microchemical Journal*, **159**, 105426. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105426
2. Hua, Y., Jiaming, M., Dachao, L., Ridong, W. (2022) DNA-based biosensors for the biochemical analysis: a review. *Biosensors*, **12**, 183. DOI: 10.3390/bios12030183
3. Rehman, S.U., Sarwar, T., Husain, M.A., Ishqi, H.M., Tabish, M. (2015) Studying non-covalent drug-DNA interactions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **576**, 49–60. DOI: 10.1016/j.abb.2015.03.024
4. Eckel, R., Ros, R., Ros, A., Wilking, S.D., Sewald, N., Anselmetti, D. (2003) Identification of binding mechanisms in single molecule-DNA complexes. *Biophys. J.*, **85**, 1968–1973. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74624-4
5. Das, S., Kumar, G.S. (2008) Molecular aspects on the interaction of phenosafranine to deoxyribonucleic acid: Model for intercalative drug-DNA binding. *J. Mol. Struct.*, **63**, 87256. DOI: 10.1016/J.MOLSTRUC.2007.02.016

6. Brabec, V., Kasparkova, J. (2018) Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance DNA. Binding Agents. Coord. Chem. Rev., **376**, 75–94. DOI: 10.1016/j.ccr.2018.07.012
7. Qais, F.A., Abdullah, K.M., Alam, M.M., Naseem, I., Ahmad, I. (2017) Interaction of capsaicin with calf thymus DNA: a multi-spectroscopic and molecular modelling study. Int. J. Biol. Macromol., **97**, 392–402. DOI: 10.1016/j.IJBIOMAC.2017.01.022
8. Kalanur S.S., Katrahalli U., Seetharamappa J. (2009) Electrochemical studies and spectroscopic investigations on the interaction of an anticancer drug with DNA and their analytical applications. J. Electroanal. Chem., **636**, 93–100. DOI:10.1016/J.JELECHEM.2009.09.018
9. Eckert, K.A., Kunkel, T.A. (1991) DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. PCR methods and applications, **17**, 24. DOI: 10.1101/gr.1.1.17
10. Hasanzadeh, M., Shadjou, N. (2016) Pharmacogenomic study using bio- and nanobioelectrochemistry: drug–DNA interaction. Mater. Sci. Eng. C, **61**, 1002–1017. DOI: 10.1016/j.msec.2015.12.020
11. Sigolaeva, L.V., Bulko, T.V., Kozin, M.S., Zhang, W., Köhler, M., Romanenko, I., Yuan, J., Schacher, F.H., Pergushov, D.V., Shumyantseva, V.V. (2019) Long-term stable poly(ionic liquid)/MWCNTs inks enable enhanced surface modification for electrooxidative detection and quantification of dsDNA. Polymer, **103**, 168–95. DOI: 10.1016/j.polymer.2019.02.005
12. Ronkainen, N.J., Halsall, H.B., Heineman, W.R. (2010) Electrochemical biosensors. Chem. Soc. Rev., **39**, 1747–1763. DOI: 10.1039/B714449K
13. Teles, F.R.R., Fonseca, L.P. (2008) Trends in DNA biosensors. Talanta, **77**, 606–623. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.07.024
14. Trotter, M., Borst, N., Thewes, R., Stetten, F. (2020) Review: electrochemical DNA sensing – principles, commercial systems, and applications. Biosens. Bioelectron., **154**, 112069. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112069
15. Blair, E.O., Corrigan, D.K. (2019) A review of microfabricated electrochemical biosensors for DNA detection. Biosens. Bioelectron., **134**, 57–67. DOI: 10.1016/j.bios.2019.03.055
16. Girousi, S.Th., Gherghi, I.Ch., Karava, M.K. (2004) DNA-modified carbon paste electrode applied to the study of interaction between Rifampicin (RIF) and DNA in solution and at the electrode surface. J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **36**, 851–858. DOI: 10.1016/j.jpba.2004.08.034
17. Muti, M. (2018) Electrochemical monitoring of the interaction between anticancer drug and DNA in the presence of antioxidant. Talanta, **178**, 1033–1039. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.08.089
18. Alex, A.B., Pal, S.K., Agarwal, N. (2016) CYP17 inhibitors in prostate cancer: latest evidence and clinical potential. Ther. Adv. Med. Oncol., **8**, 267–275. DOI: 10.1177/1758834016642370
19. Yoshimoto, F.K., Auchus, R.J. (2015) The diverse chemistry of cytochrome P450 17A1 (P450c17, CYP17A1). J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **151**, 52–65. DOI: 10.1016/j.jsmb.2014.11.026
20. Malikova, J., Brixius-Anderko, S., Udhane, S.S., Parveen, S., Dick, B., Bernhardt, R., Pandey, A.V. (2017) CYP17A1 inhibitor abiraterone, an anti-prostate cancer drug, also inhibits the 21-hydroxylase activity of CYP21A2. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **174**, 192–200. DOI: 10.3390/ph11020037
21. He, Y., Lu, J., Ye, Z., Hao, S., Wang, L., Kohli, M., Tindall, D.J., Li, B., Zhu, R., Wang, L. (2018) Androgen receptor splice variants bind to constitutively open chromatin and promote abiraterone-resistant growth of prostate cancer. Nucleic Acids Res., **46**(4), 1895–1911. DOI: 10.1093/nar/gkx1306
22. Salvador, J.A., Pinto, R.M., Silvestre, S.M. (2013) Steroidal 5 α -reductase and 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) inhibitors useful in the treatment of prostatic diseases. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **137**, 199–222. DOI: 10.1016/j.jsmb.2013.04.006
23. Gordevičius, J., Kriščiūnas, A., Groot, D.E., Yip, S.M., Susic, M., Kwan, A., Kustra, R., Joshua, A.M., Chi, K.N., Petronis, A. (2018) Cell-free DNA modification dynamics in abiraterone acetate-treated prostate cancer patients. Clin. Cancer Res., **24**(14), 3317–3324. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0101
24. Pezaro, C.J., Mukherji, D., De Bono, J.S. (2012) Abiraterone acetate: redefining hormone treatment for advanced prostate cancer. Drug Discov. Today, **17**(5–6), 221–226. DOI: 10.1016/j.drudis.2011.12.012
25. Aliakbarinodahi, N., Micheli, G.D., Carrara, S. (2016) Enzymatic and nonenzymatic electrochemical interaction of abiraterone (antiprostate cancer drug) with multiwalled carbon nanotube bioelectrodes. Anal. Chem., **88**, 9347–9350. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b02747
26. Wani, T.A., Alsaif, N., Bakheit, A.H., Zargar, S., Al-Mehizia, A.A., Khan, A.A. (2020) Interaction of an abiraterone with calf thymus DNA: investigation with spectroscopic technique and modelling studies. Bioorg Chem., **100**, 103957. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103957
27. Carrara, S., Cavallini, A., Erokhin, V., Micheli, G.D. (2011) Multi-panel drugs detection in human serum for personalized therapy. Biosensors and Bioelectronics, **26**, 3914–3919. DOI: 10.1016/j.bios.2011.03.009
28. Glebova, N.V., Nechitailov, A.A. (2010) Functionalization of the surface of multiwalled carbon nanotubes. Technical Physics Letters, **36**(10), 878–881. DOI: 10.1134/S1063785010100020
29. Randles, J.E.B. (1948) A cathode-ray polarograph. Part II - The current-voltage curves. Trans Faraday Soc., **44**, 327.
30. Sevcik, A. (1948) Oscillographic polarography with periodical triangular voltage. Collect Czech Chem Commun, **13**, 349.
31. Mohammadi, A., Moghaddam, A.B., Alikhani, E., Eilkanizadeh, K., Mozaffari, S. (2013) Electrochemical quantification of fluoxetine in pharmaceutical formulation using carbon nanoparticles. Micro & Nano Letters, **8**, 853–857. DOI: 10.1049/mnl.2013.0671
32. Ferapontova, E.E. (2018) DNA Electrochemistry and Electrochemical Sensors for Nucleic Acids. Annual review of analytical chemistry, **11**(1), 197–218. DOI: 10.1146/annurev-anchem-061417-125811
33. Bagni, G., Osella, D., Sturchio, E., Mascini, M. (2006) Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies. Anal. Chim. Acta., **81–89**, 573–574. DOI: 10.1016/j.aca.2006.03.085
34. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Tikhonova, E.G., Sanzhakov, M.A., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Pergushov, D.V., Schacher, F.H., Sigolaeva, L.V. (2021) Electrochemical studies of the interaction of rifampicin and nanosome/rifampicin with dsDNA. Bioelectrochemistry, **140**, 107736. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107736
35. Acharya, M., Bernard, A., Gonzalez, M., Jiao, J., De Vries, R., Tran, N. (2012) Open-label, phase I, pharmacokinetic studies of abiraterone acetate in healthy men. Chemother. Pharmacol., **69**, 1583–1590.
36. Bernard, A., Vaccaro, N., Acharya, M., Jiao, J., Monbaliu, J., Vries, R. D., Stielje, S. H., Tran, M. Y., Chien, C. (2015) Impact on abiraterone pharmacokinetics and safety: open-label drug–drug interaction studies with ketoconazole and rifampicin. Clinical Pharmacology in Drug Development, **4**(1) 63–73. DOI: 10.1002/cpdd.132
37. Nafisi, S., Saboury, A.A., Keramat, N., Neault, J.F., Tajmir-Riahi, H.A. (2007) Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. J. Mol. Struct., **827**, 35–43. DOI: 10.1016/j.molstruc.2006.05.004
38. Sirajuddin, M., Ali, S., Badshah, A. (2013) Drug–DNA interactions and their study by UV–vis, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **124**, 1–19. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013
39. DeDogon-Topal, B., Bozal-Palabiyik, B., Ozkan, S.A., Uslu, B. (2014) Investigation of anticancer drug lapatinib and its interaction with dsDNA by electrochemical and spectroscopic techniques. Sens. Actuators B Chem., **194** 185–194. DOI: 10.1016/j.snb.2013.12.088
40. Temerk, Y., Ibrahim, M., Ibrahim, H., Kotb, M. (2016) Interactions of an anticancer drug lomustine with single and double stranded DNA at physiological conditions analysed by electrochemical and spectroscopic methods. J. Electroanal. Chem., **769**, 62–71. DOI:10.1016/j.jelechem.2016.03.020
41. Yazan, Z., Bayraktepe, D.E., Dinç, E. (2020) Four-way parallel factor analysis of voltammetric four-way dataset for monitoring the etoposide-DNA interaction with its binding constant determination. Bioelectrochemistry, **134**, 107525. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107525

Поступила:	12.06.2022
После доработки:	24.06.2022
Принята к публикации:	27.06.2022

INTERACTION OF THE ANTICANCER DRUG ABIRATERONE WITH dsDNA*V.V. Pronina¹, L.E. Agafonova¹, R.A. Masamrekh^{1,2}, A.V. Kuzikov^{1,2}, V.V. Shumyantseva^{1,2*}*¹Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: viktorija.shumyantseva@ibmc.msk.ru²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The electroanalytical characteristics of double-stranded DNA (dsDNA) and the complex of dsDNA and the antitumor drug abiraterone acetate (AA) were studied by differential pulse voltammetry. The effect of abiraterone acetate on dsDNA was shown: it was registered by alteration the intensity of electrochemical oxidation of purine heterocyclic bases guanine and adenine using screen printed electrodes modified with functionalized carbon nanotubes. The binding constants (K_b) of the [dsDNA-AA] complex for guanine and adenine were $1.63 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $1.93 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectively. The electrochemical coefficients of the toxic effect were calculated as the ratio of the intensity of the electrochemical oxidation signals of guanine and adenine, in the presence of AA to the intensity the electrooxidation signals of these nucleobases without drug (%). At AA concentrations of exceeding $60 \mu\text{M}$, a decrease in the currents of electrochemical oxidation of guanine and adenine by 50% or more was registered. Based on the analysis of electrochemical parameters and the values of binding constants, an assumption about the mechanism of interaction of AA with DNA, mainly due to the formation of hydrogen bonds with the minor groove was made. The electrochemical DNA biosensor was first used to study the mechanism of interaction of the anticancer drug abiraterone acetate with dsDNA.

Key words: electroanalysis; carbon nanotubes; modified electrode; abiraterone; dsDNA; binding constant

FUNDING

The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) (№122030100168-2).

Received: 12.06.2022, revised: 24.06.2022, accepted: 27.06.2022