

ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров
Направление «Физика»



ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КОМПЛЕКСОВ ДНК С ДИХЛОРОДИАММИНОПЛАТИНОЙ(II)

Магистерская диссертация студента

_____ **Баталовой Анастасии Александровны**

Научный руководитель:

_____ к. ф.-м. н., доц. **Поляничко А.М.**

Рецензент:

_____ к.б.н., ст. н. с. **Анацкая О.В.**

Санкт-Петербург
2017

Список используемых сокращений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

НК – нуклеиновые кислоты

п.о. – пары оснований

ДДП- дихлородиамминоплатина(II)

Цис-ДДП – *цис*-дихлородиамминоплатина(II)

Транс-ДДП – *транс*-дихлородиамминоплатина(II)

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия

УФ-спектроскопия – ультрафиолетовая спектроскопия

ТРИС – трис-(оксиметил)-аминометан(2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол

ЭДТА – этилендиамминтетрауксусная кислота

ТАЕ – трис-уксусная кислота – ЭДТА

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

Оглавление

Список используемых сокращений.....	2
Введение.....	4
Глава I. Общие сведения о предмете исследования.....	6
1.1.Строение молекулы ДНК.....	6
1.2.Химическая структура цис-ДДП и транс-ДДП.....	11
1.3. Взаимодействие цис-ДДП и транс-ДДП с водой. Растворимость и реакционная способность.....	14
1.4. Взаимодействие ДНК и ДДП. Образование комплексов.....	15
Глава 2. Материалы и методы.....	18
2.1 Материалы.....	18
2.2. МЕТОДЫ.....	19
2.2.1. ИК-спектроскопия. Общие сведения.....	19
2.2.2. ИК-спектроскопия в растворах H ₂ O и D ₂ O.....	22
2.2.3. Принципы ИК-Фурье спектроскопии.....	22
2.2.4. Электрофорез в агарозном геле.....	24
2.2.5. Пробоподготовка.....	26
2.2.6. Подбор оптимального времени экспозиции раствора ДНК ультразвуком.....	27
2.2.7.Методы очистки растворов.....	28
ГЛАВА 3.Результаты и обсуждение.....	31
3.1. Регистрация спектров.....	31
3.2. Обработка.....	32
3.3. Результаты.....	33
3.4. Обсуждение.....	51
ВЫВОДЫ.....	55
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	56
Список использованной литературы.....	57

Введение

На сегодняшний день во всем мире активно ведется поиск новых эффективных противоопухолевых препаратов, и уже разработан достаточно широкий спектр лекарственных средств, вызывающих регресс злокачественных новообразований за счёт повреждения молекул ДНК в опухолевых клетках. Механизм действия многих существующих лекарственных препаратов заключается в подавлении матричной функции ДНК, однако, каким именно образом достигается подобный эффект во многих случаях остаётся не ясным. Понимание принципов взаимодействия лекарства с молекулой ДНК очень важно для усовершенствования существующих и создания новых препаратов.

При создании эффективных средств для лечения раковых заболеваний очень важно на молекулярном уровне понимать механизмы биологической активности соединений, оказывающих противоопухолевое воздействие. Поэтому актуальной задачей является поиск оптимального физического метода, позволяющего на молекулярном уровне выяснить принципы взаимодействия лекарственного препарата с ДНК в физиологических или близких к физиологическим условиям.

Одним из методов, позволяющих получать информацию о структуре органических соединений, типах химических связей и видах взаимодействия между молекулами является ИК-спектроскопия. По изменениям интенсивностей и частот полос поглощения определённых атомных групп, можно судить об изменениях в структуре этих групп, вызванных, к примеру, химическим взаимодействием.

В представленной работе изучается механизм связывания дихлородиамминплатины(II) (ДДП), существующей в виде двух пространственных изомеров (*цис*-ДДП и *транс*-ДДП), с ДНК тимуса телёнка. *Цис*-ДДП обладает противоопухолевой активностью и в настоящее время широко используется при лечении раковых заболеваний. Главная задача

исследования, описанного в данной работе, — изучить взаимодействие ДНК с ДДП методом ИК-спектроскопии.

При сравнительном анализе ИК-спектров растворов с одинаковой концентрацией ДНК и разными концентрациями агента, связывающегося с ДНК, в рассматриваемом случае ДДП, можно установить какие именно группы в макромолекуле участвуют в образовании связей.

Представленная работа посвящена детальному исследованию физико-химических механизмов взаимодействия ДДП с ДНК методом ИК-спектроскопии. Поставлена задача определить по изменению полос в спектрах те химические группы, которые принимают непосредственное участие во взаимодействии. Так же в тексте данной работы проводится сравнение спектров комплексов ДНК с *цис*-ДДП и *транс*-ДДП и объясняются существенные различия в интенсивности связывания с ДНК двух изомеров одного химического соединения.

Глава I. Общие сведения о предмете исследования

1.1.Строение молекулы ДНК. Нуклеиновые кислоты были впервые выделены Мишером из спермы лосося в 1872 году. Цепь нуклеиновой кислоты состоит из чередующихся звеньев фосфорной кислоты и сахара рибозы в рибонуклеиновой кислоте (РНК) и дезоксирибозы в дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК). [1]. Сахарофосфатный остов одинаков у всех молекул. Уникальной её частью является последовательность присоединённых к основной цепи азотистых оснований: аденина, гуанина, тимина (урацила в случае РНК) или цитозина. Аденин и гуанин – пурины, а цитозин, тимин и урацил – пиримидины. Образование цепочки нуклеиновой кислоты происходит следующим образом: азот в положении 3 пиримидина и азот в положении 9 пурина соединяются с углеродом в положении 1 сахара (рибозы или дезоксирибозы). Последовательность нуклеотидов, присоединённых к сахарофосфатному остову носит название первичной структуры. Первичная структура дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) изображена на **рис.1.1**. Связь между звеньями цепи осуществляется фосфатной группой, расположенной между углеродами в 5' и 3' положениях. Первичная структура, однако, характеризует только химический состав молекулы ДНК, но ничего не говорит о способе расположения полимерных цепей в пространстве – вторичной структуре – в случае молекулы ДНК впервые Уотсоном и Криком [2] было показано, что это – двойная спираль.

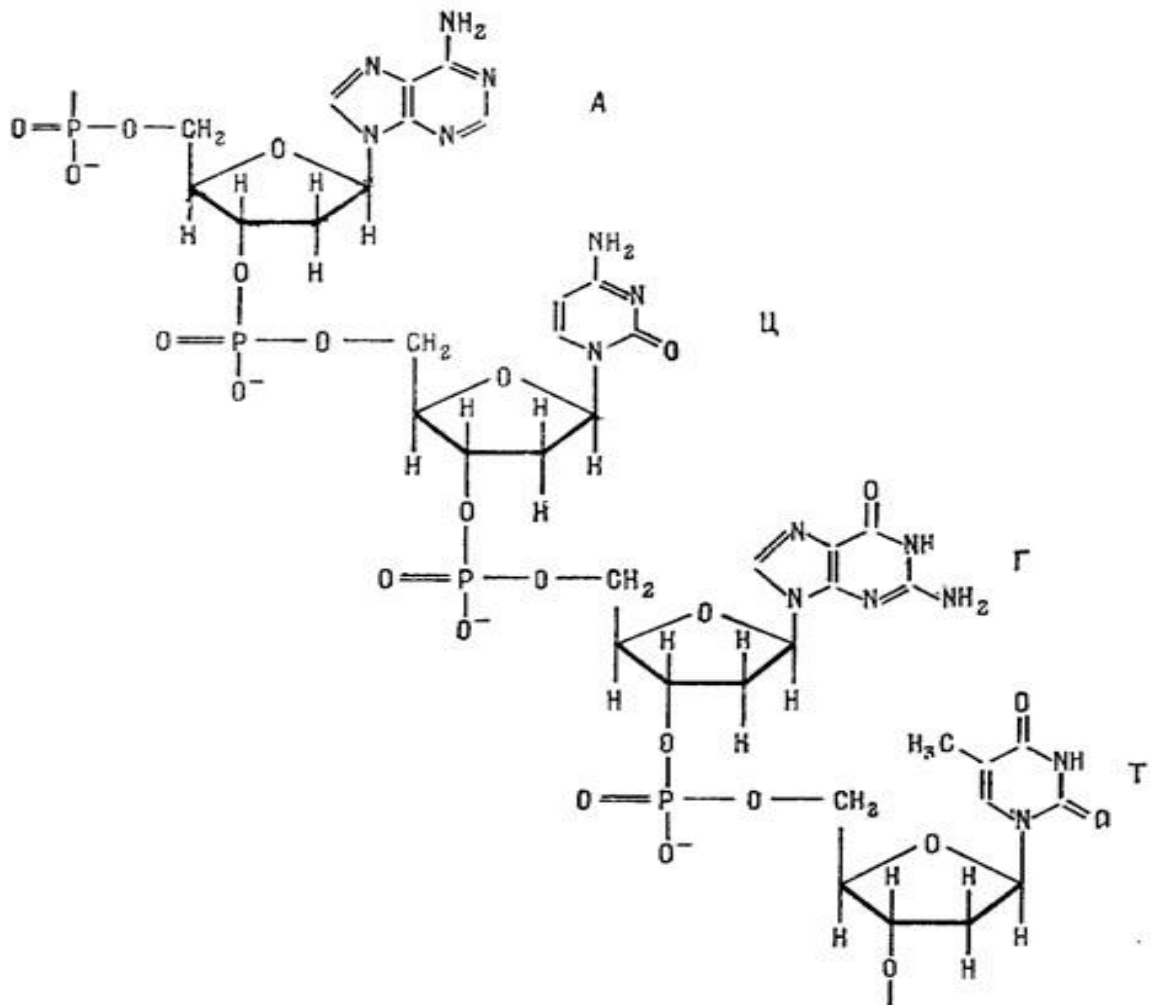


Рис. 1.1. Произвольный участок полинуклеотидной цепи ДНК; нуклеотиды соединяются между собой посредством фосфодиэфирной связи, с помощью N-гликозидной связи к дезоксирибозе прикрепляется одно из азотистых оснований [1]

Первичная структура молекулы ДНК изображена на **рис.1.1**. Нуклеотиды соединены между собой фосфодиэфирной связью, азотистое основание прикрепляется к дезоксирибозе с помощью N-гликозидной связи. Азотистые основания в молекулах нуклеиновых кислот подчиняются так называемому принципу комплементарности. Он состоит в том, что азотистые основания из двух разных цепей нуклеиновой кислоты могут взаимодействовать попарно;

аденин всегда образует водородные связи с тимином, а гуанин – с цитозином. Именно это обстоятельство и приводит к формированию вторичной структуры молекулы нуклеиновой кислоты. [3] Схема соединения двух полинуклеотидных цепей согласно принципу комплементарности представлена на **рис.1.2**.

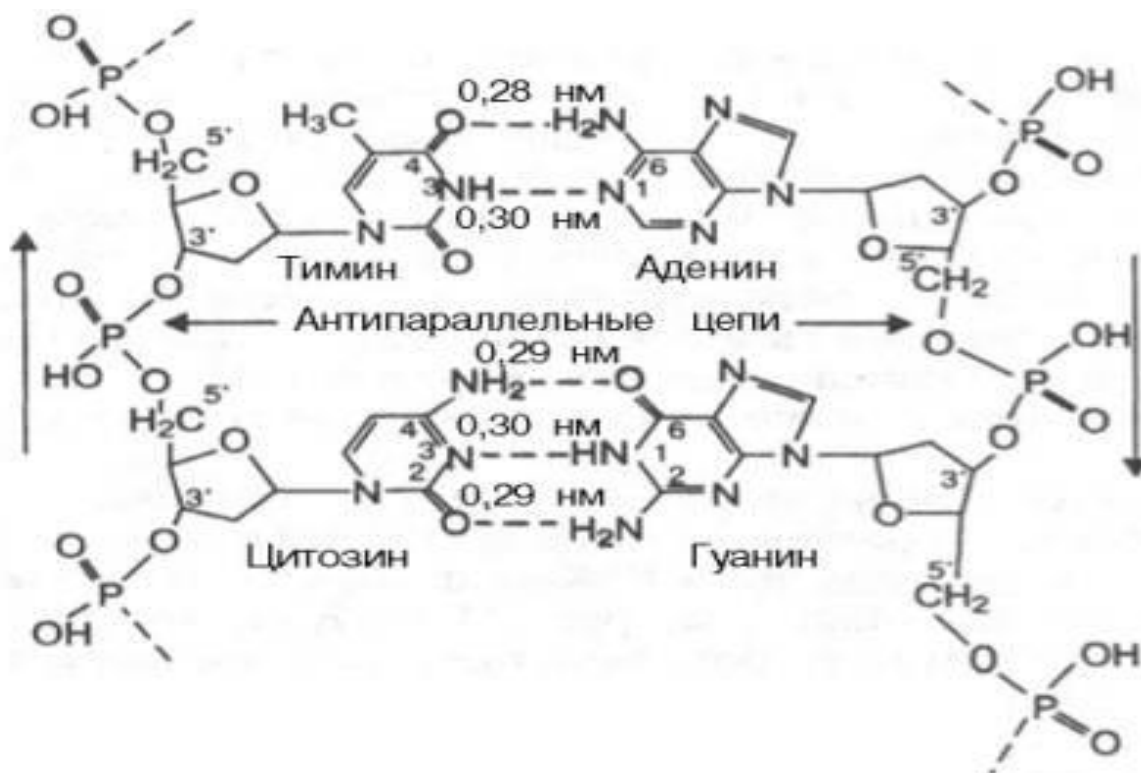


Рис.1.2. Длины водородных связей при образовании комплементарных пар азотистых оснований. [4]

На основе результатов рентгеноструктурного анализа ДНК Уотсон и Крик предположили [2], что в физиологических условиях молекула ДНК представляют собой не одну, а две полинуклеотидные цепи, связанные между собой водородными связями. При этом гидрофобные основания располагаются внутри, а гидрофильные фосфатные группы – снаружи (**рис.1.3**).

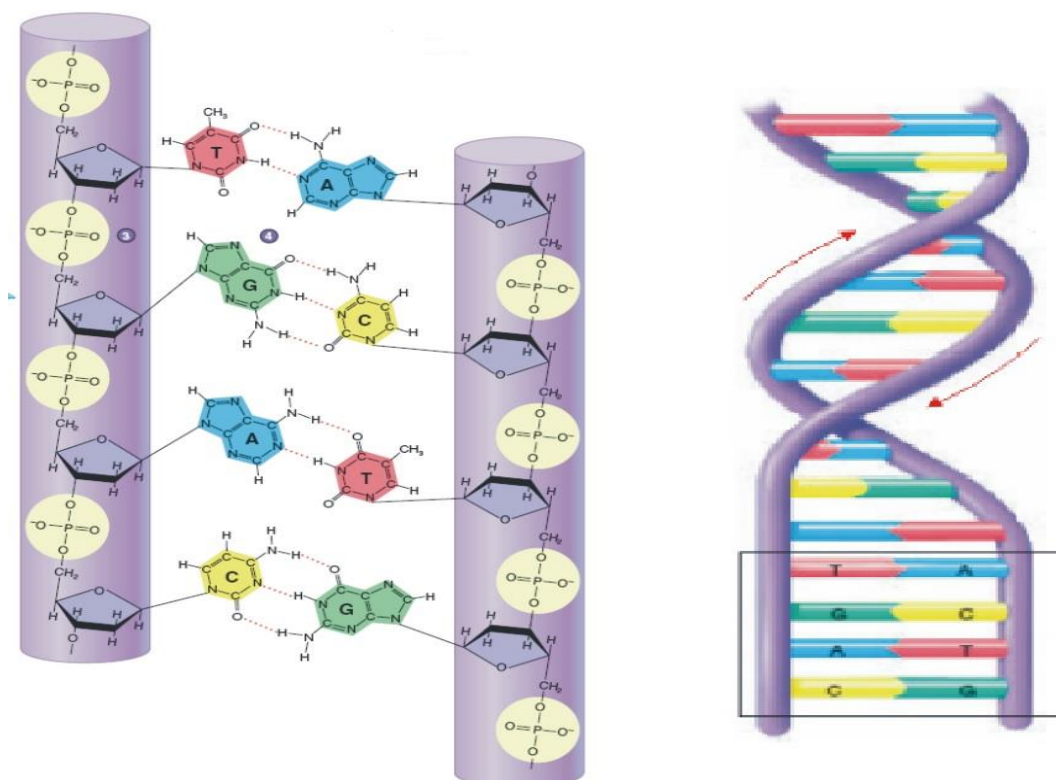


Рис.1.3. Соединение азотистых оснований согласно принципу комплементарности с образованием водородных связей (слева); образование двойной уотсон-криковской спирали из двух противоположно направленных полинуклеотидных цепей (справа).[5]

Комплементарные азотистые основания всегда лежат в одной плоскости. Такие плоские структуры при сборке двойной спирали образуют стопки – располагаются одна под другой с незначительными сдвигами, определяемыми формой спирали. Между этими стопками пар оснований возникают стэкинг-взаимодействия, делающие спиральную структуру молекулы ДНК ещё более стабильной. [6]. Под стэкингом (eng. stacking) понимаются нековалентные взаимодействия (притяжение) между ароматическими кольцами, содержащими π -связи. [7]

В физиологических условиях ДНК, как правило, существует в В-форме (рис.1.4). В настоящее время В-форма хорошо изучена. [8] В В-форме на один виток спирали приходится 10 пар оснований (п.о.), шаг спирали составляет 3,4

нм, её диаметр около 2 нм, а плоскости колец азотистых оснований образуют практически прямой угол с осью спирали [9].

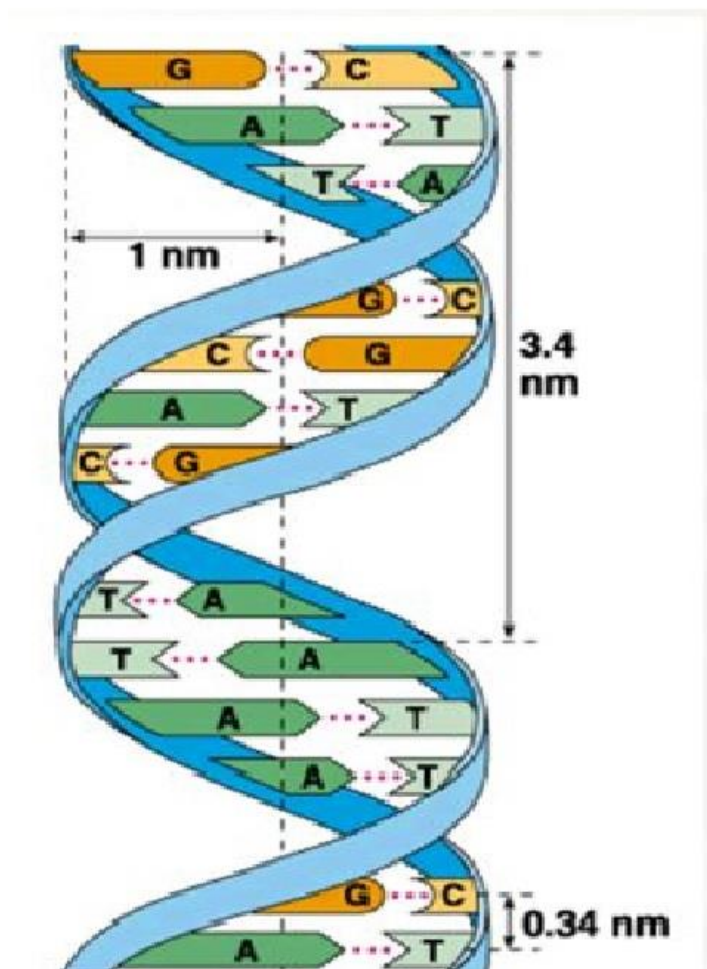


Рис.1.4. Структура и размеры ДНК, находящейся в В-форме [10]

Наибольшей реакционной способностью в азотистых основаниях ДНК обладают атомы N7 гуанина и аденина, N3 цитозина, а так же внешние атомы кислорода в тимине, цитозине и гуанине. Они активно участвуют в химических взаимодействиях, поскольку обладают наибольшей электроотрицательностью среди всех функциональных групп азотистых оснований ДНК. Однако, образование этими атомами новых химических связей может исказить вторичную структуру молекулы ДНК. [6]. Во многих случаях при взаимодействии азотистых оснований ДНК с лигандами образуются сшивки между спиральями одной молекулы или между несколькими соседними молекулами. Лиганд, присоединившийся к любому из азотистых оснований или

встроившийся между соседними парами оснований, повреждает ДНК, создавая физическое препятствие для осуществления репликации и транскрипции – это приводит к потере молекулой ДНК её основной функции – хранения и передачи информации – клетка с сильно поврежденной ДНК в конечном итоге погибает. На рисунке (рис.1.6) схематично показан процесс нарушения репликации ДНК при присоединении между парами оснований иона металла.

Рис.1.6. Схема нарушения нормального процесса репликации ДНК в клетке в присутствии атома металла – М. На рисунке А показан ненарушенный процесс репликации, Б – нарушенная репликация: атом металла мешает временному расхождению цепей для прохода ДНК-полимеразы, В – металл захватывает сразу несколько нуклеотидов, мешая правильному «чтению» матрицы. [11]

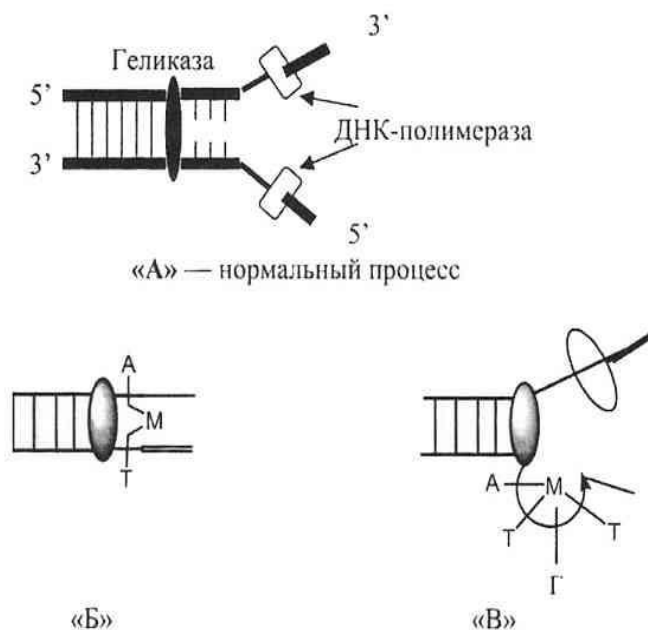


Рис.1.7. Препарат «Цисплатин». Форма выпуска. Источник картинки: <https://nebolet.com/spisok-lekarstv/cisplatin.html>

Механизм действия большинства противоопухолевых препаратов связан именно с направленным повреждением ДНК раковых клеток. [15] Сегодня в медицинской практике широко используются препараты на основе комплексов платины (рис.1.7.) [17] Они доказали свою эффективность при лечении различных видов рака. [15]

1.2.Химическая структура цис-ДДП и транс-ДДП. Изучаемое вещество – дихлородиамминплатина(II) – представляет

собой комплексное (координационное) соединение. Оно образуется путем присоединения к центральному атому – комплексообразователю – посредством координационных связей различных нейтральных атомов и молекул – лигандов. Координационная связь образуется за счёт перераспределения энергии d-орбиталей в атоме-комплексообразователе [12]. В зависимости от расположения лигандов, ДДП может существовать в виде двух пространственных изомеров: *цис*-ДДП и *транс*-ДДП. Вследствие неодинакового распределения электронной плотности в молекулах этих двух веществ, они по-разному взаимодействуют с ДНК. Строение молекул *цис*-ДДП и *транс*-ДДП представлено на **рис. 1.8**.

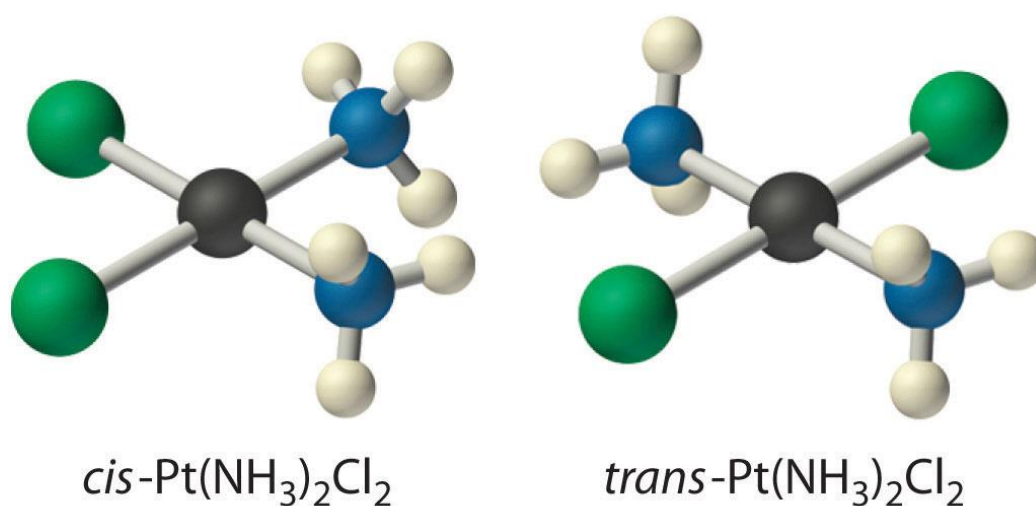


Рис. 1.7. Два изомера ДДП. Слева – *цис*-ДДП, справа – *транс*-ДДП; черным показаны атомы платины, зеленым - атомы хлора, голубым – азота и белым – водорода. [13]

Опытным путем было установлено, что *цис*-ДДП в физиологических условиях активно соединяется с белками и нуклеиновыми кислотами [22], вследствие чего обладает сильным цитотоксическим действием. [23] В связи с этим *цис*-ДДП и её производные успешно применяются для лечения раковых заболеваний [14]. *Транс*-ДДП не обладает никакими клинически подтверждёнными лечебными свойствами [15]. Однако, несмотря на успехи в лечении некоторых видов рака, цисплатин обладает рядом серьёзных побочных

эффектов: во многих случаях его применение провоцировало тяжёлую почечную недостаточность [16], а при длительной терапии обнаруживалась способность клеток опухоли формировать устойчивость к нему [15]. В связи с этим были предприняты попытки создать более безопасные и эффективные аналоги данного препарата. [17]. Многие соединения были протестированы как в лабораторных условиях, так и в клинической практике [18]. Найдены препараты, обладающие гораздо меньшей токсичностью для организма в целом, но они не эффективны в отношении клеток с приобретенной резистентностью к цисплатину, например, карбоплатин. [19] Однако, очень хорошие результаты при лечении рака прямой кишки показал препарат оксалиплатин. Он, в отличие от карбоплатина, продемонстрировал эффективность в отношении клеток с приобретенной резистентностью к цисплатину. [20]. Структурные формулы некоторых биологически активных производных цисплатина приведены на **рис. 1.8**.

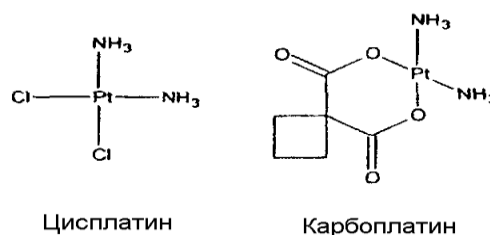
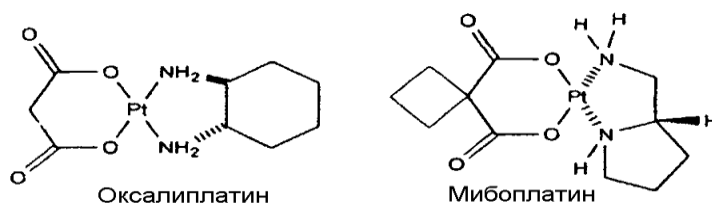


Рис.1.8. Некоторые производные цисплатина, используемые в медицине [21]



После открытия биологической активности цисплатина Розенбергом [22] и практического подтверждения его противоопухолевой эффективности [23], ученые стали предпринимать попытки объяснить молекулярный механизм действия данного лекарства. Уже на начальных этапах исследований было установлено, что основной мишенью для цисплатина в клетке является ДНК [24], и среди ранних гипотез присутствовали сообщения о том, что

повреждение клеток цисплатином связано именно с физическим блокированием репликации. [25].

1.3. Взаимодействие цис-ДДП и транс-ДДП с водой. Растворимость и реакционная способность. В водном растворе атомы хлора ДДП замещаются на молекулы воды. Замещение происходит поэтапно, сначала замещается один атом, и затем спустя несколько часов другой. [26]. Говорят, что ДДП, когда произошло замещение атомов хлора на молекулы воды, находится в акватированной или активированной форме. Этапы замещения лигандов ДДП в водном растворе продемонстрированы на **рис.1.9.** *Цис-ДДП* и *транс-ДДП* представляют собою мелкие порошкообразные вещества жёлтого или бледно-жёлтого цвета, очень мало растворимые в воде, растворимость *цис-ДДП* всего 0.253 г на 100 мл [27]. Раствор *цис-ДДП* в 0.9% NaCl не переходит в акватированную форму в течении 24 часов при комнатной температуре в защищенном от света месте. В таком растворе платина практически не гидролизуеться, доля гидролизованной платины составляет около 3%. Возрастание стабильности раствора в NaCl обусловлено появлением дополнительных ионов хлора, предохраняющих атомы ДДП от перехода в активированную форму. [28], [29]. С растворами *цис-ДДП* следует работать, соблюдая меры предосторожности, поскольку он является высокотоксичным соединением, обладает канцерогенными и мутагенными свойствами [30],[31]. Вступать во взаимодействие с молекулой ДНК и белками цисплатин способен только в акватированной форме (**рис.1.9.**) [15]. Поэтому при проведении реакции образования комплексов ДДП-ДНК существует необходимость соблюдения солевого баланса, поскольку при больших концентрациях соли свободные ионы хлора, присутствующие в растворе, затрудняют процесс замещения лигандов.

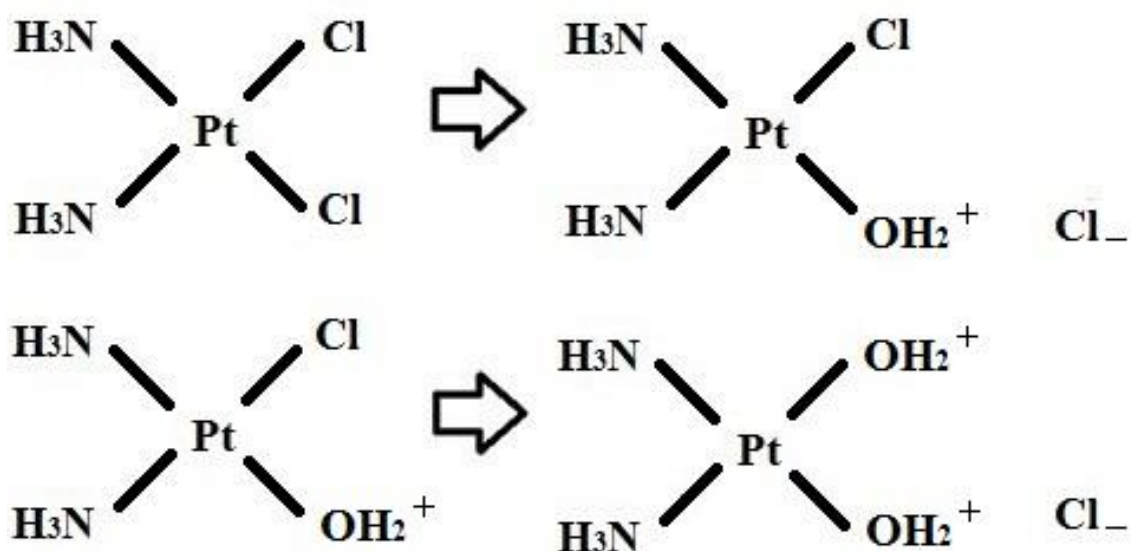


Рис. 1.9. Ступенчатое замещение лигандов цис-ДДП в водном растворе. Образование аквакомплексов. На каждом этапе происходит замещение атома Cl молекулой H₂O.
[Рисунок авторский]

1.4. Взаимодействие ДНК и ДДП. Образование комплексов.

Экспериментально было показано, что воздействие соединений платины на культуры клеток останавливает клеточное деление, практически не затрагивая при этом другие процессы жизнедеятельности клетки [22]. Это свидетельствует о том, что взаимодействие цисплатина с ДНК ингибирует её матричную функцию [32], механизм ингибирования матричной функции может быть связан с изменением вторичной структуры.

Рассмотрим более подробно процесс присоединения молекулы ДДП к молекуле ДНК в присутствии NaCl. Вначале происходит гидролиз ДДП – первый ион хлора замещается молекулой воды (**рис.1.9**), образуется так называемый моноаквакомплекс [33], а затем происходит связывание ДДП с наиболее активным центром на молекуле ДНК (N7 гуанина), удобное расположение этого центра связывания в большой бороздке и его высокая электроотрицательность позволяет лигандам легко взаимодействовать с ним, образуя координационную связь [26]. Связывание может происходить и на

других активных центрах, однако, известно, что связывание *цис*-ДДП с N7 аденина возможно только после того, как произошло связывание с гуанином [34]. Второй хлоридный лиганд ДДП может гидролизироваться вслед за первым, тогда в растворе будет существовать диаквакомплекс [36], однако, если уже произошло связывание комплекса с ДНК по одному из активных центров, замещение второго лиганда в этом комплексе произойдет быстрее. Поведение моно- и ди- аквакомплексов дихлородиамминплатины(II) в растворах отличается [37], [38]. В случае взаимодействия *цис*-ДДП только с одним активным центром на молекуле ДНК образуется так называемый монофункциональный аддукт, а в случае образования двух координационных связей – бифункциональный аддукт [39]. Виды аддуктов, формирующихся при взаимодействии ДНК с ДДП приведены на **рис. 1.10**

Бифункциональные аддукты формируют внутри- или меж- нитевые сшивки.

Рис 1.10 Они могут возникать между двумя гуанинами или между гуанином и аденином. Сшивки с гуанином являются более часто образующимися и более стабильными ещё и потому, что атом Об в кольце гуанина способен образовывать водородную связь с аминогруппой *цис*-ДДП [35]

При образовании большого числа аддуктов стабильность двойной спирали уменьшается [40], могут образовываться изгибы, возможно частичное раскручивание платинированного участка спирали [42]. В экспериментах по ЯМР наблюдается расширение малой бороздки при взаимодействии ДНК с ДДП. [41]. Нефизиологические изменения в структуре молекулы ДНК влекут за собой нарушение её функций. В первую очередь блокируется процесс репликации. Наличие аддуктов стерически препятствует функционированию ферментов. [25]

Биологически неактивный изомер *транс*-ДДП в отличие от *цис*-ДДП формирует преимущественно монофункциональные аддукты, их доля составляет больше половины всех аддуктов, хотя образуются и межнитевые

сшивки, соединяющие, как правило, гуанин и комплементарный ему цитозин[43].

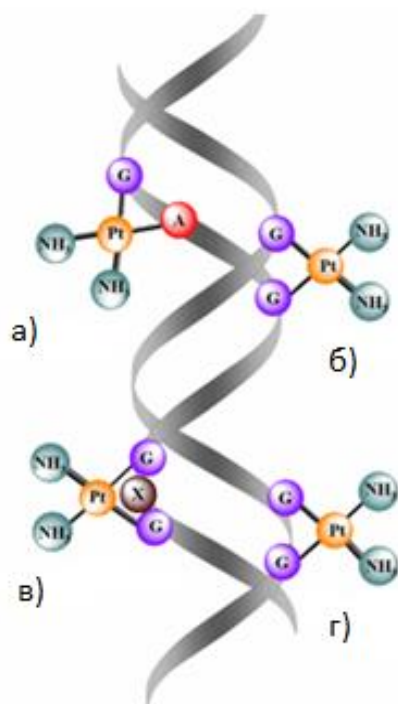


Рис.1.10. Бифункциональные аддукты, образующиеся при взаимодействии *цис*-ДДП с ДНК. По данным [44]. В скобках указана доля данного аддукта в общем числе аддуктов. а) Внутринитевая сшивка между гуанином и аденином ($\approx 25\%$), б) Межнитевая сшивка между двумя гуанинами, в) Внутринитевая сшивка между гуанинами, в случае наличия между ними другого азотистого основания ($\approx 10\%$), г) Внутринитевая сшивка между двумя гуанинами (60-65%).

Некоторые авторы связывают отсутствие противоопухолевой активности у трансplatина именно с неспособностью образовывать бифункциональные внутринитевые аддукты (сшивки между двумя соседними гуанинами (аденинами) или между аденином и гуанином). [15]. Неспособность трансplatина образовывать такие аддукты обусловлена пространственной конфигурацией (рис. 1.7.) молекулы этого вещества.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Материалы

- высокомолекулярная ДНК тимуса телёнка (тип II, фирма «Sigma», США)
- *цис*-дихлородиамминплатина(II) (фирма «Sigma», США),
- *транс*-дихлородиамминплатина(II) (фирма «Sigma», США),
- D₂O, доля молекул D₂O не менее 99,9% (фирма «АстраХим», Россия),
- H₂O получена на системе для очистки воды Direct-Q Ultrapure Water System, производитель Millipore (США)
- NaCl, чистота более 99,5 % (Helicon, Россия)
- HClO₄, 65% ХЧ («Вектон» Россия),
- центрифужные фильтры Vivacon 500 мкл, 50 кДа, (Производитель «Sartorius stedim biotech», Германия)
- центрифужные фильтры Vivacon 15 мл, 50 кДа, (Производитель «Sartorius stedim biotech», Германия)
- агароза, натяжение геля (1.5%) более 1200 г/см² температура полимеризации 36-39, температура таяния 87-89, (Helicon, Россия)
- ТРИС, чистота более 99,8 %, рН 10.0-11.5 (Helicon, Россия)
- маркер молекулярного веса для ДНК
- NaOH, ЧДА, ГОСТ 4328-77 («Экрос», Россия)
- ЭДТА, чистота более 99,0 %, рН 4.0-6.0 (Helicon, Россия)
- уксусная кислота ледяная «РЕАХИМ»

2.2. МЕТОДЫ

2.2.1. ИК-спектроскопия. Общие сведения. На сегодняшний день ИК-спектроскопия является достаточно доступным и при этом надёжным методом определения химической структуры вещества. Он широко используется для изучения биологических молекул, важным преимуществом его по сравнению с другими методами для данного типа объектов является то, что в процессе

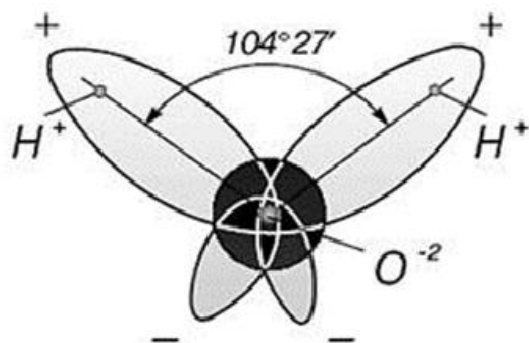


Рис. 2.1. Строение молекулы воды

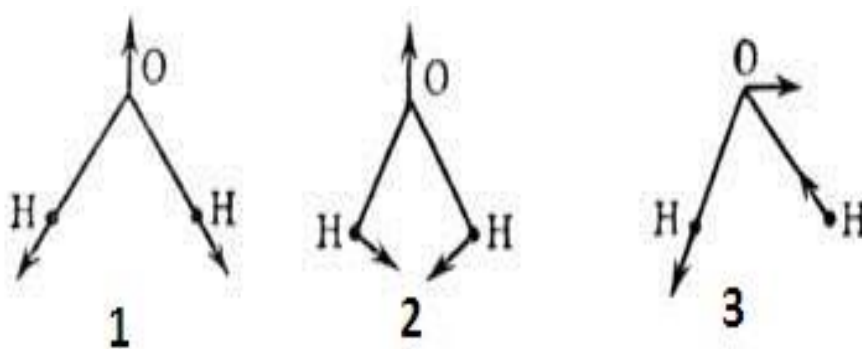
Источник иллюстрации:

<https://www.monographies.ru/ru/book/section?id=2724>

исследования не происходит повреждения образца. Суть метода заключается в нахождении частот колебаний различных атомов и атомных групп относительно друг друга. Для наглядности рассмотрим основные принципы спектроскопии на примере одной из самых простых молекул. Молекула воды (H_2O) состоит из двух атомов водорода (H^1) и одного атома кислорода (O^{16}). Три ядра в молекуле воды образуют равнобедренный треугольник с двумя протонами и кислородом. Расстояние O-H - 0,9568 Å; H-H - 1,54 Å. [45] Модель молекулы воды, предложенная Нильсом Бором, показана на **рис. 2.1**. Угол между связями составляет $104^{\circ}27'$. [46]

Молекула имеет $3N$ степени свободы, из которых $3N-6$ — это колебательные или вращательные степени свободы. Задача о колебательном движении многоатомной молекулы — это задача об относительных движениях её атомов, которые не сопровождаются перемещением молекулы в пространстве как целого. В качестве примера рассмотрим возможные относительные движения атомов в молекуле воды.

Рис.2.2. Нормальные колебания молекулы воды: 1 - симметричное валентное колебание; 2 - деформационное колебание; 3 – антисимметричное валентное колебание.[47]



Основные колебательные полосы, наблюдаемые в инфракрасном спектре молекулы жидкой воды при комнатной температуре представлены в таблице. См. **Таблица 1**

Отнесение	H ₂ O	HDO	
		Неполное замещение	D ₂ O
ν_{as}	3490 ± 10	3420 ± 10	2580 ± 10
ν_{as}	3250 ± 10	2920 ± 10	-
$\delta+L$	2130 ± 20	-	1550 ± 10
Δ	1640 ± 5	1460 ± 5	1215 ± 5

Таблица 1: Положение максимумов в спектре поглощения жидкой воды (см⁻¹) при комнатной температуре, и их отнесение по [62] ν_{as} , ν_s — антисимметричные и симметричные валентные колебания, $\delta+L$ — комбинация деформационного и крутильного колебания, δ — деформационное колебание.

В сложных молекулах, состоящих из многих атомов, так же встречаются все эти типы колебаний: симметричные и антисимметричные валентные, деформационные и крутильные. Валентные колебания, как правило, дают

самые интенсивные полосы. В спектре любой сложной молекулы имеются так называемые «характеристические колебания» химических групп. К примеру, валентные колебания групп углерод-водород, волновые числа которых лежат в интервале 2800-3100 см⁻¹. Другое характеристическое колебание – валентное колебание группы атомов кислород – углерод (карбонильной группы) оказывается в интервале волновых чисел 1640-1780 см⁻¹. [48] Таким образом ИК-спектроскопия с середины двадцатого века успешно применялась для анализа химической структуры молекул. [49]

В больших полимерных молекулах число атомов очень велико, что приводит к возникновению множества колебаний. Спектры получаются сложными, но их изучение может быть существенно упрощено, поскольку колебания в полимерной молекуле, состоящей из многих более простых элементов (мономеров), повторяются. Колебания несколько изменяются в результате взаимодействия связанных соседних единиц, но влияние такого взаимодействия на характеристические колебания химических групп достаточно мало. В n компонентной молекуле каждое колебание оказывается n раз вырожденным, т.е. каждая полоса расщепляется на n компонент. Величина расщепления зависит от степени взаимодействия между мономерами. В наблюдаемом спектре в результате усреднения близко лежащие друг к другу спектральные полосы во многих случаях не разрешаются достаточно хорошо, поэтому спектр приобретает характерный вид плавной кривой, огибающей вершины отдельных пиков [48]

При достаточно высоких концентрациях ДНК (в данной работе описаны эксперименты с концентрацией ДНК в образце примерно 10 мг/мл) удаётся получить достаточно чёткие полосы в ИК-спектре, характерные для функциональных групп молекулы ДНК (фосфатов, сахаров, азотистых оснований). А по изменению положения и интенсивности этих полос можно судить об изменениях, происходящих с ДНК при взаимодействии с ДДП.

2.2.2. ИК-спектроскопия в растворах H₂O и D₂O. В связи с различием масс атомов водорода и дейтерия, лёгкая и тяжелая вода имеют разную частоту колебания химических связей Н-О, D-О в молекуле, и это различие хорошо видно на ИК-спектре (**рис.2.3.**) Зеленая кривая – спектр легкой воды, голубая линия – тяжелой. Колебания связей в растворе Н-О-D образует ещё один спектр, конфигурацию которого необходимо знать, чтобы правильно оценить и скомпенсировать его влияние на спектр образца в случае неполного замещения H₂O на D₂O. Спектры поглощения тяжелой воды, лёгкой, а так же Н-О-D представлены на **рис.2.3.** Частоты основных колебаний занесены в таблицу. См. **Таблица 1.**

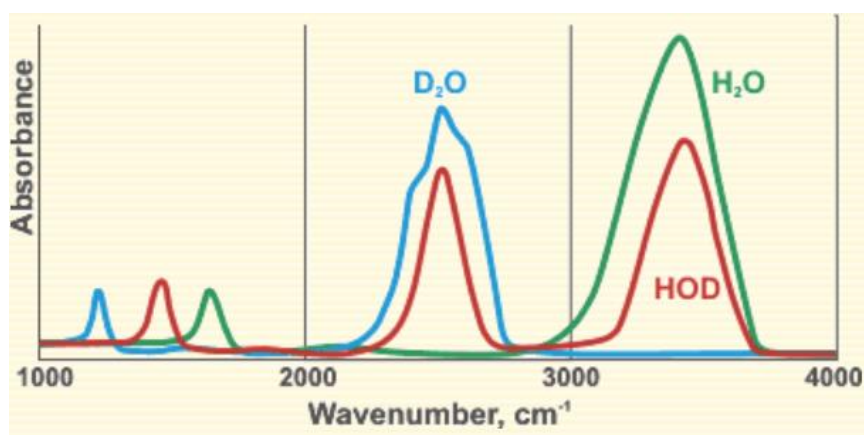


Рис.2.3. ИК спектры поглощения H₂O(зел.), D₂O(гол.), HDO(красн.) [50]

В нашем случае (при изучении спектроскопическими методами водных растворов ДНК) значительная часть спектра, которую мы рассматриваем (область поглощения азотистых оснований), лежит в пределах 1400-1700 см⁻¹ и оказывается неразличимой на фоне более интенсивного спектра растворителя (воды) **рис.2.3.** С целью избежать этого при пробоподготовке мы проводим изотопное замещение H₂O на D₂O во всех исследуемых образцах.

2.2.3. Принципы ИК-Фурье спектроскопии. ИК-Фурье спектрометр представляет собой не что иное, как дополненный различными функциональными элементами интерферометр Майкельсона: т.е. с помощью

системы зеркал создаются условия для интерференции двух когерентных лучей света, один из которых проходит через образец. Схематично устройство ИК-Фурье спектрометра Bruker изображено на **рис.2.4**. Движение лучей света показано тонкими линиями. Для получения спектра из интерференционной картины производится обратное Фурье-преобразование (что и дало название методу). В настоящее время это осуществляется с помощью компьютера, подключаемого к прибору.

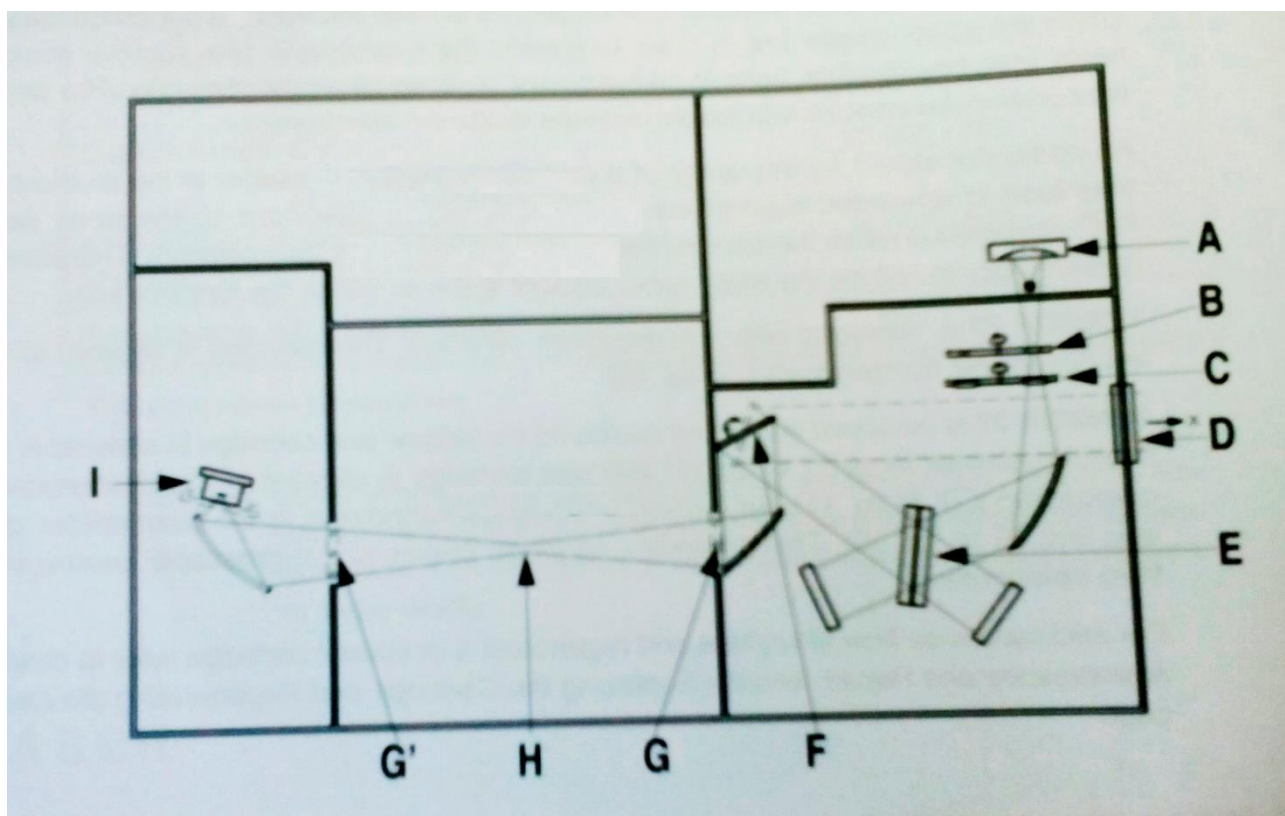


Рис.2.4. Схема устройства ИК-Фурье спектрометра Bruker Tensor. Схема. А – ИК-источник, В – апертура, С – светофильтр, D – выход луча, E – светоделительная пластина, F – подвижное зеркало, G – окно отсека с образцом, H – положение образца, I – детектор [Tensor User Manual, Инструкция по эксплуатации прибора, Bruker Optic, 2010]

При ИК-Фурье спектроскопии сканирование по всем длинам волн не требуется – обратное преобразование Фурье позволяет получить весь спектр целиком. Отношение сигнал/шум, пропорциональное числу отсчетов в интерферограмме, может быть улучшено посредством накопления спектров. [53].

2.2.4. Электрофорез в агарозном геле. Известно, что молекула ДНК является полианионом, и потому в случае действия на неё постоянного электрического поля она будет двигаться от катода к аноду. Скорость движения будет определяться величиной приложенного напряжения и размером самой молекулы. Электрофорез в агарозном геле широко используется для разделения смеси фрагментов ДНК по величине этих фрагментов (числу пар оснований). Агароза является линейным полисахаридом, образование пористого геля происходит посредством сшивания полимерных нитей между собой водородными связями. Размер пор в геле определяется концентрацией агарозы [55]. В настоящей работе был использован 1% агарозный гель.

Электрофорез в агарозном геле проводится с использованием электродного буфера ТАЕ (трис-уксусная кислота – ЭДТА (этилендиамминтетрауксусная кислота)). Рецепт для изготовления электродного буфера приведен ниже:

1XТАЕ

40 mM трис (трис-(оксиметил)-аминометан(2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол)

20 mM уксусной кислоты

1 mM ЭДТА

На практике удобно готовить концентрированный раствор электродного буфера, который перед использованием разбавляется до рабочей концентрации:

50XТАЕ

242 г трис

600 мл дистиллированной воды

57,1 мл ледяной уксусной кислоты

100 мл 0,5 M ЭДТА (pH=8).

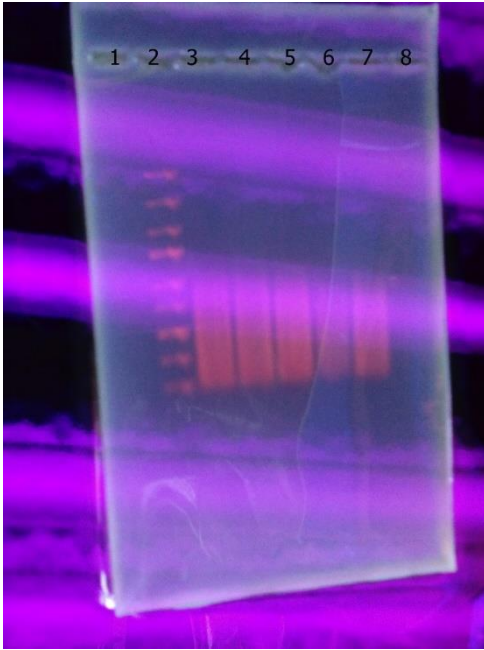


Рис.2.5 Агарозный гель, окрашенный бромистым этидием в ультрафиолетовом свете. На дорожку 2 нанесен образец, содержащий фрагменты маркерной ДНК, длины которых отличаются на 100 п.о.; дорожки 1 и 8 пустые, на остальные нанесена исследуемая ДНК. Фото автора.

Кроме электродного буфера при проведении электрофореза требуется так же буфер для проб, имеющий следующий состав:

50 мМ трис-НСl, рН=8

25 % глицерина

5 мМ ЭДТА

0,2 % бромфеноловый синий

0,2 % ксилен цианол

Чтобы получить рабочую концентрацию буфера для проб, его следует разбавить в 5-10 раз.

Для приготовления агарозного геля порошкообразную агарозу разводят в однократном буфере ТАЕ и полученную смесь доводят до кипения и дают полностью остыть. Плавление агарозного геля происходит при температуре 85-95°С, а гелеобразование – при 38-40°С. [54] Перед проведением электрофореза гель снова нагревают до полного перехода в жидкое состояние, затем заливают в лоток. Важно помнить, что перед заливкой агароза должна остыть

приблизительно до 50-60° С. На дорожки, сформированные при помощи специальной гребенки, наносили пробы ДНК с расчетом примерно 0,5-1 мкг вещества на дорожку (такое количество обеспечивает достаточно яркое свечение дорожек после окрашивания геля бромистым этидием). Так же на отдельную дорожку наносили маркер, содержащий фрагменты, отличающиеся друг от друга на 100 п.о., что позволяет определить размеры молекул в образце. Рабочее напряжение выставлялось 75 В, форе́з продолжался около 1 часа. Гель окрашивается бромистым этидием в течение 20 мин. Бромистый этидий является интеркалирующим агентом, флюоресцирующим при освещении в ультрафиолетовом диапазоне (**рис.2.5**); интенсивность флюоресценции при связывании с ДНК возрастает примерно в 20 раз, потому бромистый этидий широко применяется для выявления нуклеиновых кислот, в частности при проведении электрофореза. Фотография агарозного геля, окрашенного бромистым этидием, в ультрафиолетовом свете приведена на **рис.2.5**.

2.2.5. Пробоподготовка. При изготовлении растворов использовалась специально подготовленная вода, очищенная на установке Direct-Q Ultrapure Water System, Millipore (США). Сухую ДНК заливали водой, перемешивали на установке «BioSan» в течении 30 минут и оставляли набухать в холодильнике на сутки. Полученный раствор с целью снижения вязкости обрабатывали ультразвуком с помощью установки «BANDELIN SONOPULS» (производитель TEOPAL) на льду.

Точная концентрация ДНК в растворе определялась на спектрофотометре «Shimadzu UV-1800» методом Спирина. В ультрафиолетовой области измеряли поглощение денатурированных образцов после гидролиза в хлорной кислоте и исходя из этих данных рассчитывали концентрацию нуклеиновой кислоты в исходном растворе [55]. Дополнительно был рассчитан коэффициент экстинкции нативного образца. По величине коэффициента экстинкции можно судить о степени денатурации молекул ДНК в растворе. Для нативной ДНК в

физиологических условиях коэффициент экстинкции должен находиться в пределах 7000.

Порошкообразные *цис*-ДДП и *транс*-ДДП растворяли в 100 мМ NaCl, чтобы избежать преждевременного перехода ДДП в акватированную форму. Концентрация *цис*-ДДП в полученном растворе определялась спектрофотометрически с использованием коэффициента экстинкции представленного на сайте производителя.

Комплексы *цис*-ДДП и *транс*-ДДП с ДНК инкубировали в термостате при температуре 37°C и при концентрации NaCl около 15 мМ в течении суток. Затем с помощью центрифужных фильтров Vivascon последовательно были произведены очистка образцов от несвязавшейся платины и от соли и замещение растворителя на D₂O; конечный объем всех проб составил 50 мкл. Изотопное замещение, включающее в себя три этапа: разбавление концентрированного образца D₂O до 500 мкл, выдерживание в холодильнике в течение суток, концентрирование до 50 мкл – производилось троекратно. Концентрация ДНК в образцах для ИК-спектроскопии составила около 10 мг/мл.

2.2.6. Подбор оптимального времени экспозиции раствора ДНК ультразвуком. В ходе подготовки образцов были модифицированы некоторые из стандартных методик. Ультразвуковое дробление высокомолекулярной ДНК и ранее применялось для снижения вязкости конечных растворов, так как адекватное соотношение сигнал/шум при регистрации спектров ДНК и комплексов достигается, когда концентрация ДНК в исследуемых растворах выше 10 мг/мл. При такой концентрации растворы высокомолекулярной ДНК имеют консистенцию вязких гелей, что создает трудности при заливании их в кювету для измерений, при очистке кюветы от образца, а также провоцирует значительные потери образца при различных промежуточных манипуляциях. С целью снижения вязкости в ходе пробоподготовки мы воздействовали на ДНК ультразвуком по стандартной схеме – сериями по 20 сек, с интервалом в 40 сек

между сериями; общее время экспозиции составило 5 минут. Ультразвуковое дробление ДНК во избежание денатурации молекул в образце проводилось на льду: в интервалах между сериями образец охлаждался. Для контроля качества разделения высокомолекулярной ДНК на более мелкие фрагменты с помощью ультразвука применялся электрофорез в агарозном геле с использованием маркера, позволяющего оценить величину полученных фрагментов. Раствор ДНК после пятиминутной экспозиции на установке «BANDELIN SONOPULS» (производитель ТЕОРАЛ) был признан не отвечающим требованиям эксперимента, поскольку в этом растворе сохранялись довольно длинные фрагменты ДНК и разброс различных длин фрагментов оказался слишком широк – нам требовалось получить узкое распределение молекул в районе 600-800 п.о. Такой выбор обусловлен тем, что при наличии в растворах небольших молекул ДНК в невысоких концентрациях при сборе комплексов с ДДП уменьшается вероятность образования неспецифических продуктов реакции. В связи с тем, что стандартная схема ультразвукового дробления молекул ДНК не дала ожидаемого результата, было принято решение увеличить время воздействия ультразвука на ДНК. При этом существует значительный риск получить частично денатурированные образцы, поэтому их нативность контролировалась описанным выше методом Спирина. После проведения нескольких последовательных серий экспозиции ДНК ультразвуком было установлено, что суммарное время воздействия ультразвука на раствор для получения фрагментов величиной 600-800 п.о. на имеющейся в распоряжении аппаратуре составляет 20 минут. Было показано, что при условии соблюдения режима охлаждения между сериями такое время воздействия ультразвука на ДНК не приводит к денатурации молекул в образце.

2.2.7. Методы очистки растворов. Реакцию комплексообразования рекомендуется проводить при низких концентрациях молекул ДНК и ДДП в растворе во избежание образования неспецифических аддуктов. Инфракрасная спектроскопия, напротив, требует высоких концентраций для получения

хорошо воспроизводимого сигнала. Таким образом, перед нами стояла нетривиальная задача – совместить на этапе пробоподготовки все оптимальные условия.

При проведении реакции комплексообразования необходимо было соблюсти солевой баланс: на начальном этапе ДДП в растворе должна была находиться в неакватированной форме, поскольку в случае быстрого смешивания раствора акватированной ДДП с раствором ДНК повышается вероятность образования неспецифических аддуктов. При приготовлении комплексов мы разводили растворы до такой степени, чтобы концентрация соли в них составила 15 мМ. В этом случае объемы проб для разных соотношений ДДП/ДНК сильно отличались, что тоже создавало сложности в процессе пробоподготовки. После того, как комплексы 24 часа инкубировались в термостате при температуре 37° С, возникла необходимость единообразно их сконцентрировать. Для этого были использованы центрифужные фильтры. Они так же позволили очистить растворы от не связавшейся ДДП от излишков соли. Первоначально для этой цели планировалось использовать диализные мешки SERVA, а полученные пробы затем лиофилизировать. Но после нескольких попыток очистить растворы с помощью диализа было замечено, что выход не связавшейся с ДНК ДДП во внешний раствор недостаточен, значительная часть молекул вещества оставалась внутри – было сделано предположение, что ДДП в активированной форме способна связываться с материалом, из которого изготовлены диализные мешки. Диализ решено было заменить фильтрованием. Лиофилизация так же была признана неудачным способом концентрирования образцов, поскольку её проведение несколько раз приводило к полной или частичной потере проб, а поскольку их приготовление требует значительного времени и дорогостоящих материалов, решено было отказаться от лиофилизации и заменить её центрифужной фильтрацией.

Явным преимуществом центрифугирования является возможность сочетать очистку образца и его концентрирование. В нашем случае существовала

необходимость заменить один растворитель на другой, поскольку регистрацию ИК спектров планировалось проводить в тяжелой воде. С помощью центрифужных фильтров образцы концентрировались до минимального возможного объема. Процедура концентрирования тоже должна была быть стандартизирована, наибольшую трудность представлял подбор оптимального времени центрифугирования, поскольку «пересушивание» проб негативно сказалось бы на их качестве и могло бы способствовать засорению фильтра. Мы остановились на конечном объеме в 50 мкл. При данном объеме пробы имеют концентрацию вязкого геля, но всё ещё могут быть легко собраны пипеткой.

Изотопное замещение легкой воды на тяжелую производилось тоекратно. Однако, полностью очистить растворы от легкой воды не удалось, на всех спектрах присутствует характерный пик в районе 3400 см^{-1} . Это может свидетельствовать о том, что мембрана центрифужного фильтра при его хранении в воде набухает и затем в процессе фильтрации насыщает фильтруемый раствор молекулами воды.

ГЛАВА 3. Результаты и обсуждение.

3.1. Регистрация спектров. Прежде чем приступить к регистрации спектров растворов необходимо прописать background – спектр атмосферы, который будет автоматически вычитаться из всех снимаемых спектров. В атмосфере всегда присутствуют пары воды и углекислый газ, background обычно имеет вид как на **рис. 3.1**.

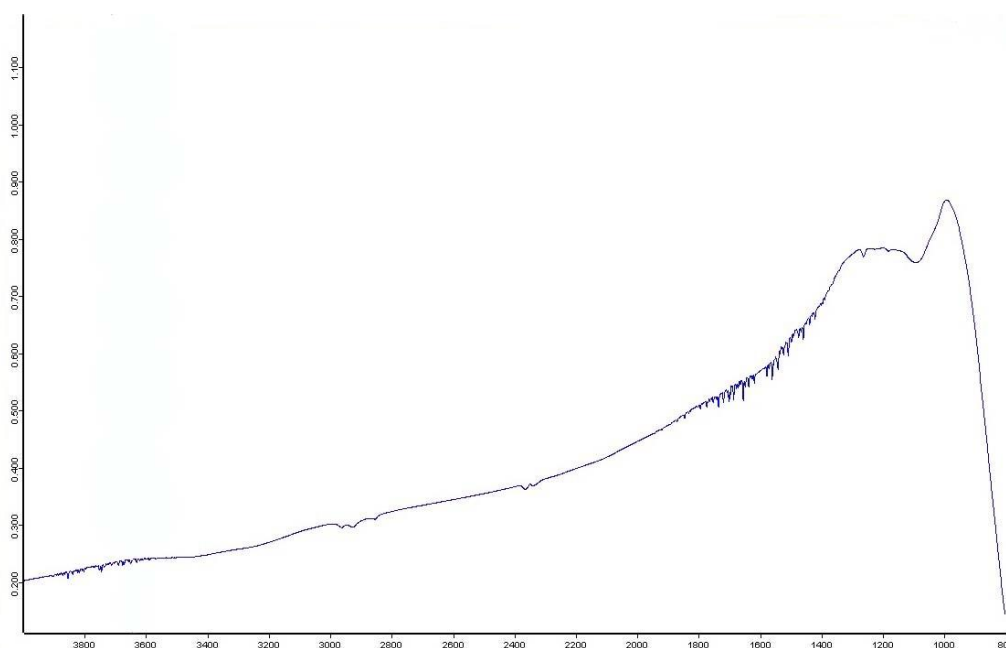


Рис 3.1. ИК-спектр атмосферы. По оси абсцисс отложены волновые числа в см^{-1} , а по оси ординат – интенсивности.

Параметры регистрации спектров: диаметр светового пучка – 0,25 мм, разрешение – 2 см^{-1} , интервал волновых чисел – $800\text{-}4000 \text{ см}^{-1}$, накопление – 500 спектров. Изначальный вид спектров тяжелой воды (черная кривая) и образца (красная кривая) представлен на **рис. 3.2**. В областях спектра $1200\text{-}1300 \text{ см}^{-1}$ и $2200\text{-}2800 \text{ см}^{-1}$ сигнал слишком слабый и поэтому не может быть зарегистрирован прибором, что проявляется возникновением осцилляций на спектре. При дальнейшей обработке эти области спектра будут вырезаны.

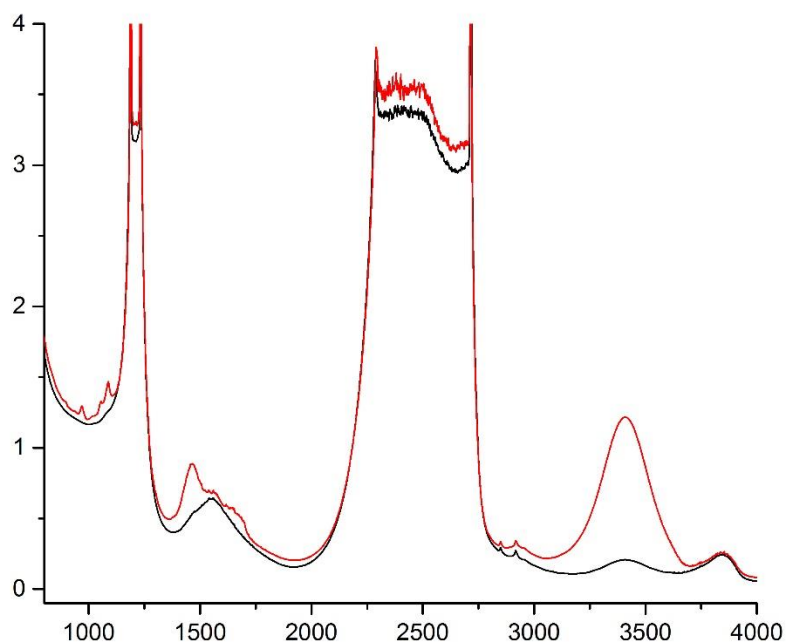


Рис. 3.2. *Спектр тяжелой воды (черная линия) и спектр раствора комплекса ДНК с ДДП (красная линия). По оси абсцисс отложены волновые числа, по оси ординат - интенсивности*

3.2. Обработка. Дальнейшая работа связана преимущественно с математической обработкой полученных спектров. Мы постарались свести её к минимуму, чтобы не увеличивать погрешность эксперимента. Первым и необходимым шагом стала атмосферная компенсация. Она была выполнена средствами программного пакета OPUS. Затем производился выбор интересной нам области во всех спектрах ($800-2000\text{ см}^{-1}$), и из каждого спектра образца вычитали спектр растворителя, используя ручной подбор множителя в интерактивном модуле пакета OPUS. Основным критерием корректности выполненного вычитания спектров служило получение нулевого поглощения (прямой линии) в области, где отсутствуют как полосы растворителя, так и полосы образца ($1800-2000\text{ см}^{-1}$).

Следующим шагом была коррекция базовой линии. Для этого спектр разделялся на две части – на область фосфатов ($800 - 1150\text{ см}^{-1}$) и на область

оснований ($1500 - 1800 \text{ см}^{-1}$). Это необходимо было сделать по объективной причине – между 1200 см^{-1} и 1400 см^{-1} существует разрыв, связанный с тем, что именно в этом диапазоне лежит одна из полос поглощения тяжелой воды, и единую базовую линию для всего спектра получить не представляется возможным

Готовый спектр сохранялся в формате data point table для дальнейшей обработки. С целью проведения количественного анализа все спектры были нормированы на пик 970 см^{-1} , который соответствует колебаниям O-D в дезоксирибозе [56] Далее средствами программного пакета Origin Pro9 проводилась процедура разложения композитных полос методом нахождения минимумов второй производной (метод поиска скрытых пиков).

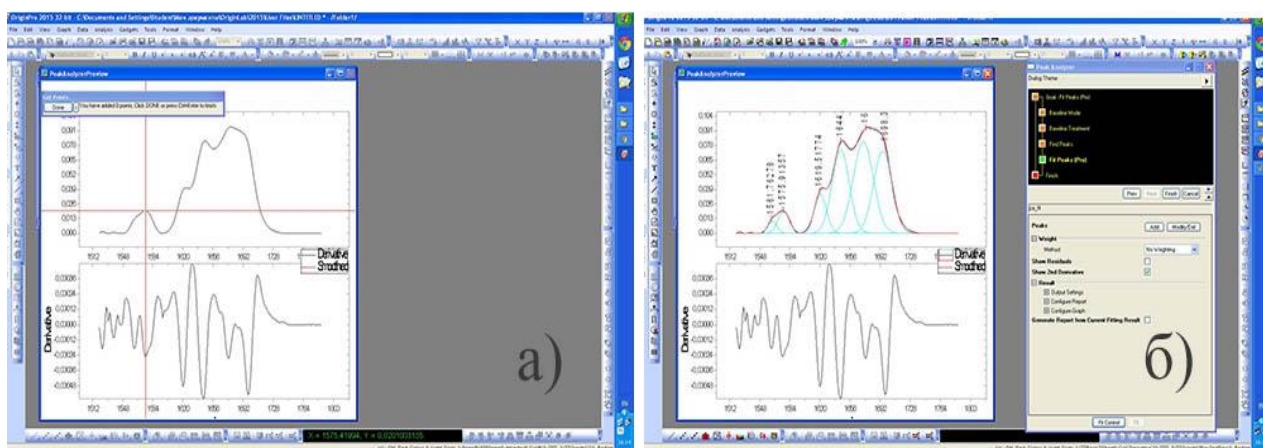


Рис 3.3 Ручное разложение композитного спектра: а) выбор точки методом минимума второй производной с помощью мыши, б) результат компьютерного разложения композитной полосы по выбранным пикам.

На **рис.3.3 а)** изображен способ ручного отбора пиков, а на рисунке **б)** – результат компьютерного расчета долей выбранных пиков в композитной полосе. По итогам разложений для области оснований составлено несколько сводных таблиц, содержащих данные по всем полосам в составе композитной полосы, их интенсивности и смещения.

3.3. Результаты. На **рис. 3.4, рис.3.5** представлены графики ДНК и комплексов с разным соотношением ДДП/ДНК. При возрастании концентрации платины

постепенно меняется форма спектра – особенно хорошо это заметно в области $1620 - 1700 \text{ см}^{-1}$ – на графиках обозначены основные полосы, наблюдаемые в ДНК и выполнено разложение сложных полос на составляющие. По величине этих составляющих можно судить о том, как меняются доли тех или иных колебаний в композитной полосе. Ниже приведены таблицы численных значений для положений, интенсивностей и интегральных вкладов всех наблюдаемых полос.

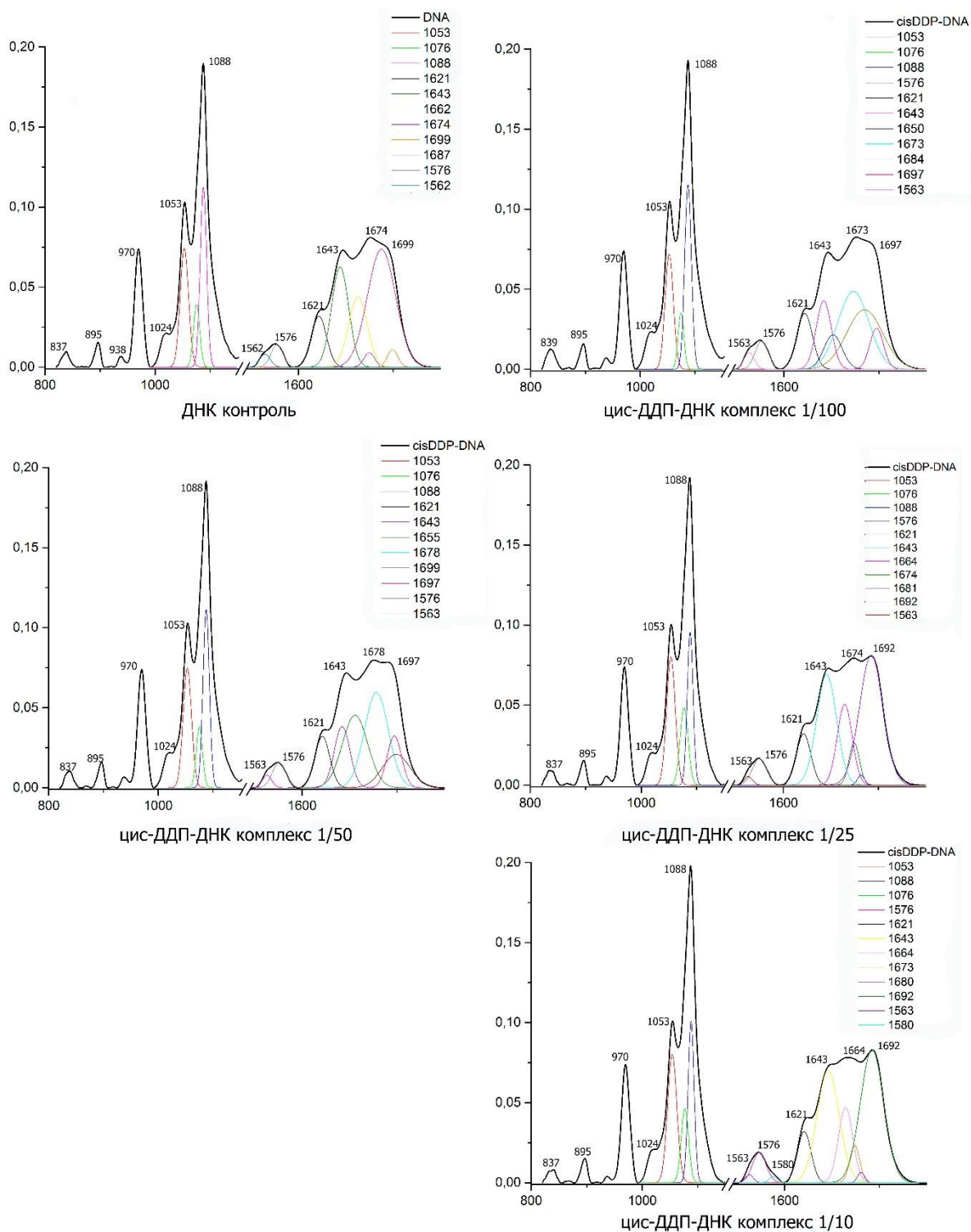


Рис. 3.4. ИК-спектры ДНК и комплексов ДНК с цис-ДДП. Волновые числа основных полос надписаны над графиком, цветными линиями обозначены разложения основной полосы на составляющие. Под каждым спектром внизу подписано отношение ДДП/ДНК.

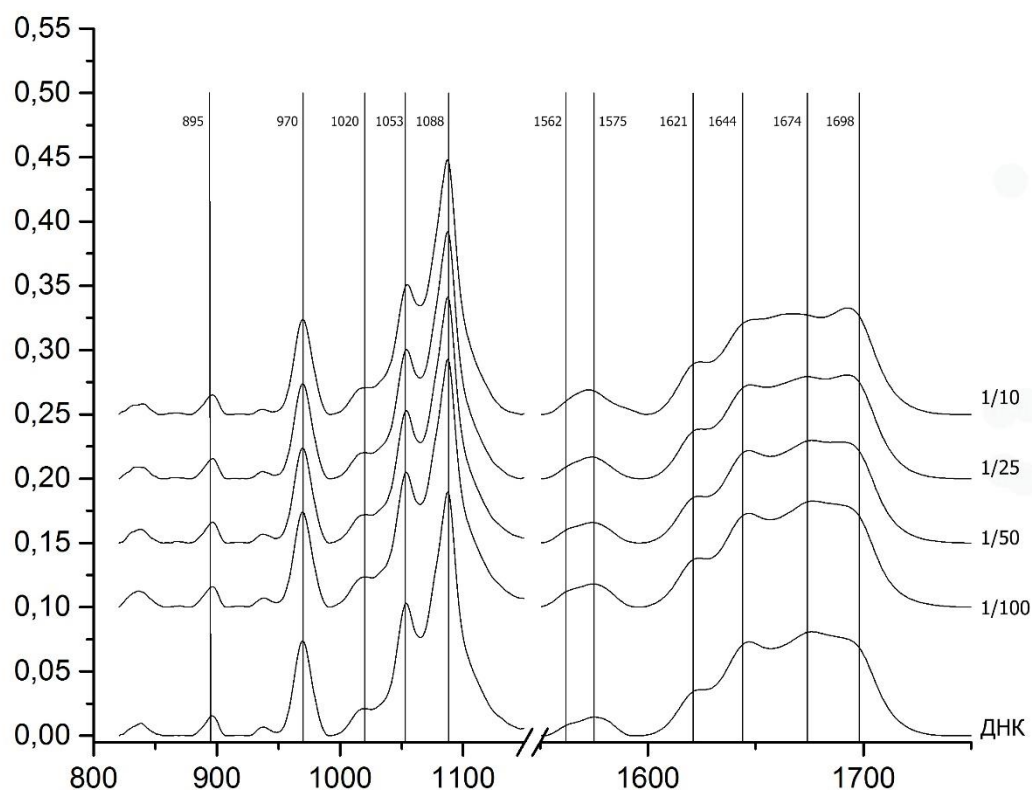


Рис. 3.5. Наблюдаемые сдвиги в спектре ДНК при взаимодействии с *цис*-ДДП. Вертикальными линиями обозначены волновые числа основных полос спектра ДНК. Сбоку возле каждой кривой указано отношение ДДП-ДНК. Нижний график – спектр ДНК в отсутствие ДДП.

Полоса 1698 см^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ в тимине) [59] сдвигается к меньшим волновым числам, как и полоса 1564 см^{-1} , соответствующая колебаниям $\text{C}=\text{N}7$ в гуанине [56,58]. Композитная полоса 1974 см^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ в основаниях) [59] так же сдвигается к меньшим волновым числам. То же происходит с полосой 1576 см^{-1} (NH_2 в гуанине [61]), а полоса 1643 см^{-1} (кольцо тимина) [60], напротив, сдвигается к большему волновому числам. (рис.3.7.) Изменение волнового числа означает изменение частоты колебания химической связи: мы предполагаем, что в структуре ДНК при взаимодействии с *цис*-ДДП происходят структурные изменения, затрагивающие азотистые основания: гуанин, аденин, тимин. Эти

изменения обусловлены связыванием исследуемого вещества (*цис*-ДДП) с молекулой ДНК.

В **Таблице 1** перечислены все наблюдаемые полосы; в крайней левой графе, рядом с волновым числом приведены отнесения для этой полосы с комментариями, найденные в литературных источниках и ссылки на соответствующие источники.

Волновое число по данным литературы, отнесение со ссылками	Волновое число по данным измерений	Комплекс ДНК-ДДП 1\100	Комплекс ДНК-ДДП 1\50	Комплекс ДНК-ДДП 1\25	Комплекс ДНК-ДДП 1\10
1576 колебания кольца аденина [58], C=NH ₂ гуанин [61]	1577,4±0,5	1576,2±0,5	1575,6±0,5	1574,6±0,5	1573,3±0,5
1563 C=N7 гуанин[56][58]	1564,8±0,5	1563,4±0,5	1563,1±0,5	1562,9±0,5	1562,8±0,5
1621, кольцо аденина [58]	1621,7±0,5	1621,8±0,5	1621,4±0,5	1621,2±0,5	1620,8±0,5
1643 кольцо тимина [60]	1644,0±0,5	1641,9±0,5	1642,2±0,5	1645,4±0,5	1646,0±0,5
1662, C5=C6 в цитозине [58] 1663 C=C в гуанине [56]	1662,8±0,5			1664,5±0,5	1664,4±0,5
1674, композитная полоса карбонильных групп [59], 1675 C2-N валентные, NH ₂ плоские в гуанине[58] 1676 C5=C6, C4=O [58], 1673 NH ₂ в плоскости в аденине, [58] 1677 C=O в гуанине [56]	1674,8±0,5	1673,2±0,5	1678,4±0,5	1674,6±0,5	1673,9±0,5
1680 C=O ν в основаниях, [58] 1679 C=C в цитозине [56]	1687,7±0,5	1684,9±0,5		1681,8±0,5	1680,7±0,5
1698 C2=O в тимине[59] 1691 карбонильная группа в тимине при платинировании [58]	1699,4±0,5	1697,7±0,5	1697,4±0,5	1692,6±0,5	1692,3±0,5
1650 водородные связи воды в бороздках ДНК [56]		1651,7±0,5	1655,9±0,5		
1580 [58], без отнесения упоминается					1588,2±0,5

Таблица 1. Экспериментальные данные по изменению положений полос в спектре ДНК при взаимодействии с *цис*-ДДП. В первом столбце приведены волновые числа, найденные в литературе, и соответствующие отнесения со ссылками, во втором столбце – волновые числа для ДНК, далее – волновые числа, полученные для комплексов при разных молярных соотношениях ДДП/ДНК.

Далее приведены две таблицы, позволяющие сравнивать интенсивности полос и их интегральные вклады в композитную полосу для ДНК и комплексов *цис*-ДДП-ДНК. В **Таблице 2** в крайнем левом столбце волновые числа характерных полос для ДНК, в столбце рядом приведена интенсивность этих полос в спектре ДНК, в других столбцах – интенсивность соответствующих полос в спектрах комплексов *цис*-ДДП-ДНК.

Волновое Число	ДНК	1\100	1\50	1\25	1\10
[1621]	0,0318±0,0005	0,0348±0,0005	0,0321±0,0005	0,0321±0,0005	0,0319±0,0005
[1643]	0,0625±0,0005	0,0427±0,0005	0,0382±0,0005	0,0692±0,0005	0,0702±0,0005
[1698]	0,0109±0,0005	0,0256±0,0005	0,0209±0,0005	0,0810±0,0005	0,0833±0,0005
[1563]	0,0081±0,0005	0,0103±0,0005	0,0077±0,0005	0,0053±0,0005	0,0050±0,0005
[1576]	0,0140±0,0005	0,0175±0,0005	0,0155±0,0005	0,0166±0,0005	0,0187±0,0005

Таблица 2. Изменение интенсивности характерных полос в спектрах ДНК и комплексов *цис*-ДДП-ДНК по мере увеличения молярного соотношения ДДП/ДНК (слева-направо)

Полоса 1698 см⁻¹, соответствующая колебаниям С=О в тимине [59], увеличивает свою интенсивность; интенсивность полосы 1563 см⁻¹, соответствующая валентным колебаниям С=N7 гуанина[58], напротив, снижается; нарастание интенсивности показывает полоса 1576 см⁻¹ (колебания

C=NH₂ в гуанине[61]). В **Таблице 3** приведены интегральные вклады каждой из полос в композитную полосу. В крайнем левом столбце приведены волновые числа для ДНК, в втором столбце – интегральные вклады полос в ДНК, в остальных столбцах интегральные вклады полос при увеличении молярного отношения *цис*-ДДП-ДНК (слева-направо).

Волновое число	ДНК	1\100	1\50	1\25	1\10
[1621]	9,76948±10 ⁻⁶	10,51333±10 ⁻⁶	9,54573±10 ⁻⁶	9,02402±10 ⁻⁶	8,27139±10 ⁻⁶
[1643]	21,81775±10 ⁻⁶	12,61631±10 ⁻⁶	12,04616±10 ⁻⁶	27,03783±10 ⁻⁶	29,78872±10 ⁻⁶
[1698]	2,31095±10 ⁻⁶	6,84913±10 ⁻⁶	11,55915±10 ⁻⁶	37,34168±10 ⁻⁶	37,36372±10 ⁻⁶
[1563]	1,72441±10 ⁻⁶	2,09963±10 ⁻⁶	1,46557±10 ⁻⁶	0,87376±10 ⁻⁶	0,76607±10 ⁻⁶
[1576]	3,37811±10 ⁻⁶	4,46995±10 ⁻⁶	4,20448±10 ⁻⁶	4,64575±10 ⁻⁶	4,93814±10 ⁻⁶

Таблица 3. Интегральные вклады характерных полос ДНК и комплексов *цис*-ДДП-ДНК по мере увеличения молярного соотношения ДДП/ДНК (слева-направо)

Полоса 1621 см⁻¹, соответствующая колебаниям в кольце аденина[58], уменьшает свой интегральный вклад при увеличении молярного отношения ДДП/ДНК. Вклад кольца тимина (1643 см⁻¹)[60] увеличивается, так же увеличение интегрального вклада показывает полоса 1698 см⁻¹, соответствующая колебаниям карбонильной группы в тимине[59]. Уменьшается интегральный вклад полосы 1563 см⁻¹(C=N7 в гуанине)[58] и увеличивается вклад полосы 1576 см⁻¹ (колебания C=NH₂ в гуанине[61], кольца в аденине[58]). Изменения, произошедшие в распределении интегральных вкладов разных полос, подтверждают предположение об изменениях в исследуемой системе, мы можем утверждать, что связывание ДНК с цисплатином оказало влияние на азотистые основания в составе ДНК: на

тимин, аденин и на гуанин, атом N7 которого, согласно литературе, является наиболее вероятной мишенью для связывания. [15,57]

Далее рассмотрим изменения в спектре сахарофосфатного остова. Ниже приведена таблица наблюдаемых полос с отнесениями.

Волновое число в литературе, отнесение	ДНК	1\100	1\50	1\25	1\10
1090, О-Р-О симметр. [58]	1087,3±0,5	1087,4±0,5	1087,3±0,5	1088,1±0,5	1088,2±0,5
	1075,1±0,5	1074,2±0,5	1075,3±0,5	1077,2±0,5	1077,6±0,5
1053, С-О в дезоксирибозе [58]	1053,1±0,5	1053,0±0,5	1053,7±0,5	1053,6±0,5	1054,1±0,5
1020 колебания в кольце дезоксирибозы [58]	1023,5±0,5	1023,6±0,5	1024,3±0,5	1025,1±0,5	1025,0±0,5
970 С-С в дезоксирибозе[58]	970,3±0,5	970,2±0,5	970,1±0,5	969,8±0,5	969,9±0,5
938 Слабое колебание в кольце дезоксирибозы [59]	938,6±0,5	939,1±0,5	939,4±0,5	938,2±0,5	938,7±0,5
895 валентные колебания кольца дезоксирибозы [56, 59]	895,1±0,5	895,2±0,5	895,6±0,5	895,0±0,5	895,4±0,5
837 валентные колебания кольца дезоксирибозы [56,59]	837,3±0,5	837,2±0,5	837,1±0,5	837,6±0,5	837,7±0,5

Таблица 4. Колебания сахарофосфатного остова ДНК и комплексов *цис*-ДДП-ДНК. В крайнем левом столбце приведены волновые числа полос, найденные в литературных источниках, с отнесениями и ссылками. Во втором столбце приведены данные, полученные для ДНК. В остальных столбцах – данные для комплексов. Молярное отношение *цис*-ДДП-ДНК возрастает слева направо.

Некоторые изменения, однако, происходят: полоса дезоксирибозы 1020(1023) см^{-1} смещается к большим волновым числам, полоса 1053 см^{-1} (дезоксирибоза[58]) так же смещается, но не так заметно; существенно смещается полоса 1075 см^{-1} , не найденная в литературе. Такие изменения могут свидетельствовать о конформационных изменениях в молекуле ДНК, затрагивающих дезоксирибозу, например, о расширении малой бороздки при взаимодействии *цис*-ДДП с азотистыми основаниями. В **Таблицах 5,6** приведены данные об изменении интенсивностей полос области фосфатов при взаимодействии с *цис*-ДДП.

Волновое число в ДНК	ДНК	1\100	1\50	1\25	1\10
1088	0,1837±0,0005	0,1887±0,0005	0,1857±0,0005	0,1735±0,0005	0,1843±0,0005
1076	0,0390±0,0005	0,0353±0,0005	0,0381±0,0005	0,0483±0,0005	0,0463±0,0005
1053	0,0744±0,0005	0,0717±0,0005	0,0747±0,0005	0,0800±0,0005	0,0800±0,0005
1024	0,0207±0,0005	0,0221±0,0005	0,0223±0,0005	0,0219±0,0005	0,0227±0,0005
970	0,0736±0,0005	0,0734±0,0005	0,0734±0,0005	0,0735±0,0005	0,0735±0,0005
938	0,0066±0,0005	0,0069±0,0005	0,0066±0,0005	0,0053±0,0005	0,0036±0,0005
895	0,0153±0,0005	0,0158±0,0005	0,0159±0,0005	0,0154±0,0005	0,0151±0,0005
837	0,0093±0,0005	0,0127±0,0005	0,0107±0,0005	0,0095±0,0005	0,0083±0,0005

Таблица 5. Интенсивности характерных полос (область фосфатов) в спектрах ДНК и комплексов *цис*-ДДП-ДНК по мере увеличения молярного соотношения ДДП/ДНК (слева-направо)

Полосы 1076, 1053 и 1024 см^{-1} увеличивают свою интенсивность при увеличении молярного соотношения *цис*-ДДП/ДНК, а интенсивность полосы

938 см^{-1} заметно снижается. Полоса 970 см^{-1} была использована для нормировки, и потому её интенсивность не изменяется. Все полосы, интенсивность которых изменилась, соответствуют колебаниям сахара дезоксирибозы, что ещё раз подтверждает предположение о влиянии связывания ДНК с *цис*-ДДП на пространственную конфигурацию макромолекулы. В **таблице 6** представлены интегральные вклады от всех наблюдаемых полос области фосфатов. В крайнем левом столбце указаны волновые числа полос, наблюдаемых в ДНК, во втором столбце – интегральные вклады от всех полос в ДНК, рассчитанные в данной работе, а далее – интегральные вклады полос комплексов с различным молярным соотношением *цис*-ДДП-ДНК. Молярное соотношение увеличивается слева направо. Следует обратить внимание, что интегральные вклады двух групп полос 1088-1024 см^{-1} и 970-837 см^{-1} рассчитывались отдельно.

Волновое число	ДНК	1\100	1\50	1\25	1\10
1088	69,24086±10 ⁻⁶	71,65986±10 ⁻⁶	68,34135±10 ⁻⁶	60,98949±10 ⁻⁶	62,16444±10 ⁻⁶
1076	6,56341±10 ⁻⁶	5,19797±10 ⁻⁶	6,34864±10 ⁻⁶	10,70738±10 ⁻⁶	9,10213±10 ⁻⁶
1053	16,47554±10 ⁻⁶	15,27859±10 ⁻⁶	16,7482±10 ⁻⁶	19,11172±10 ⁻⁶	19,67246±10 ⁻⁶
1024	7,72019±10 ⁻⁶	7,86358±10 ⁻⁶	8,56182±10 ⁻⁶	9,19141±10 ⁻⁶	9,06097±10 ⁻⁶
970	74,34768±10 ⁻⁶	69,63523±10 ⁻⁶	72,58297±10 ⁻⁶	74,58503±10 ⁻⁶	76,52919±10 ⁻⁶
938	5,15671±10 ⁻⁶	5,77176±10 ⁻⁶	5,64243±10 ⁻⁶	4,25781±10 ⁻⁶	2,92898±10 ⁻⁶
895	11,24860±10 ⁻⁶	11,43181±10 ⁻⁶	11,49731±10 ⁻⁶	11,43857±10 ⁻⁶	11,74724±10 ⁻⁶
837	9,24701±10 ⁻⁶	13,16120±10 ⁻⁶	10,27729±10 ⁻⁶	9,71859±10 ⁻⁶	8,79459±10 ⁻⁶

Таблица 6. Интегральные вклады характерных полос (область фосфатов) ДНК и комплексов *цис*-ДДП-ДНК по мере увеличения молярного соотношения ДДП/ДНК (слева направо)

Проанализировав данные **таблицы 6**, получаем результат, согласующийся с предыдущими: полосы дезоксирибозы 1053, 1024 см^{-1} [58] увеличивают свой

интегральный вклад по мере увеличения молярного соотношения *цис*-ДДП-ДНК, а полоса 938 см^{-1} , напротив, уменьшает. Это ещё раз подтверждает влияние связывания ДНК с *цис*-ДДП на сахарофосфатный остов.

Теперь рассмотрим взаимодействие ДНК с *транс*-ДДП. На **рис.3.6** представлены спектры всех комплексов, а так же контрольного образца с разложениями композитных полос.

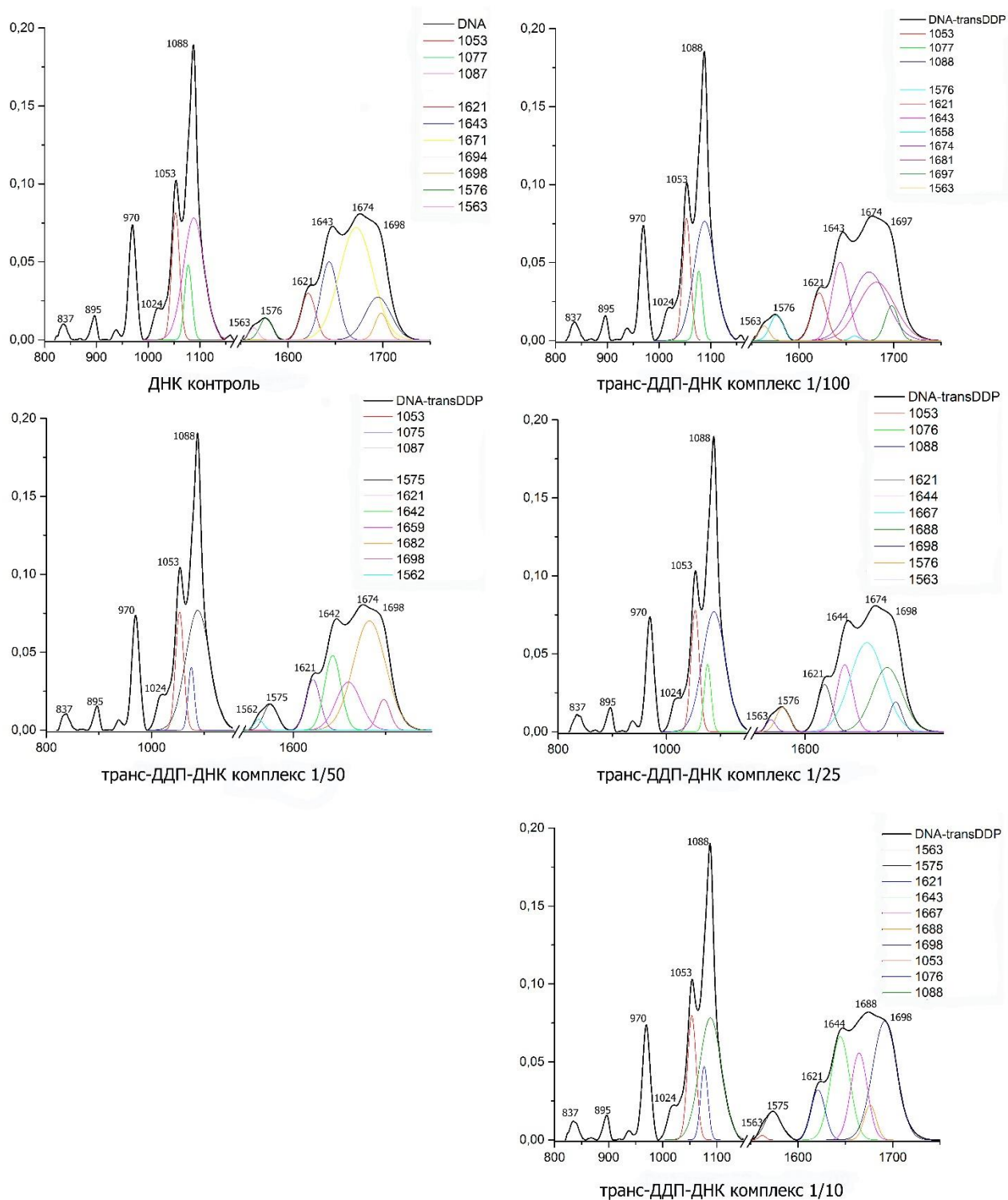


Рис.3.6. Спектры ДНК и комплексов ДНК с транс-ДДП. Спектр контрольного образца – слева вверху. Снизу под каждым спектром указано соотношение ДДП-ДНК. Цветными линиями обозначены спектральные полосы, полученные при разложении. Сверху над каждым пиком подписано волновое число.

Численные значения интенсивностей полос и их интегральных вкладов сведены в таблицы.

В **Таблице 7** приведены характерные полосы ДНК и полосы, полученные нами при регистрации спектров комплексов ДНК с *транс*-ДДП. Крайний левый столбец – волновые числа по данным литературы и соответствующие отнесения, второй столбец – полосы в ДНК, полученные в данной работе, далее – полосы в комплексах при увеличении молярного отношения ДДП-ДНК(слева-направо)

Волновое число по данным литературы, отнесение, ссылки	Волновое число для ДНК	1/100	1/50	1/25	1/10
1621 кольцо аденина [58]	1621,3±0,5	1621,2±0,5	1621,2±0,5	1621,2±0,5	1621,2±0,5
1643 кольцо тимина [60]	1643,3±0,5	1643,5±0,5	1642,6±0,5	1643,0±0,5	1644,6±0,5
1671 C=O в В-ДНК, [58] 1673 NH ₂ scissoring adenine, 1672 C5=C6, C4=O stretching, [58]	1671,9±0,5	1673,3±0,5			1672,5 ±0,5
1694, без отнесения, [58]	1694,9±0,5				
1698 C2=O в тимине[59] 1691 карбонильная группа в тимине при платинировании [56]	1698,2±0,5	1698,1±0,5	1697,9±0,5	1698,1±0,5	1698,8±0,5
1576 колебания кольца аденина [58], C=NH ₂ гуанин [61]	1576,6±0,5	1576,2±0,5	1575,3±0,5	1575,8±0,5	1573,6±0,5
1563 C=N7 в гуанине[58] [56]	1563,7±0,5	1563,4±0,5	1563,6±0,5	1563,1±0,5	1562,4±0,5
1658, без отнесения,			1659,4±0,5		

[59]					
1680 C=O ν в основаниях, должно сдвигаться при платинировании до 1660, [58]		1681,1±0,5	1682,7±0,5	1667,0±0,5	1662,4±0,5
1666, C=O в гуанине при платинировании, [56]					
1688 единственная полоса, которая нигде не встречается				1688,9±0,5	1686,1±0,5

Таблица 7. Экспериментальные данные по изменению положений полос в спектре ДНК при взаимодействии с транс-дихлородиаминоплатиной (II). В первом столбце приведены волновые числа, найденные в литературе, и отнесения со ссылками, во втором столбце – волновые числа для ДНК, полученные в данной работе, далее – волновые числа, полученные для комплексов при разных молярных соотношениях ДДП/ДНК.

По данным **Таблицы 7** можно утверждать, что полосы 1576 см^{-1} (колебания C=NH₂ в гуанине[61], кольца в аденине[58]) и 1563 см^{-1} (C=N7 в гуанине) сдвигается к меньшим волновым числам, то же самое происходит и с композитной полосой C=O (1680 см^{-1} [58]ли 1674 см^{-1} [59])– её пик существенно смещается к меньшим волновым числам(1660 см^{-1}). В литературе описано, что такое явление может наблюдаться при платинировании ДНК [58]. Полоса 1643 см^{-1} , соответствующая колебаниям в кольце тимина, незначительно сдвигаются к большим волновым числам. Наблюдаемые изменения могут указывать на то, что азотистые основания в составе ДНК (аденин, гуанин, тимин) вступили в химическое взаимодействие с транс-ДДП.

В **Таблице 8** и в **Таблице 9** приведены значения интенсивностей и интегральных вкладов полос в ДНК и в комплексах ДНК с транс-ДДП.

Волновое число	ДНК	1\100	1\50	1\25	1\10
----------------	-----	-------	------	------	------

[1621]	0,0299±0,0005	0,0305±0,0005	0,0324±0,0005	0,0302±0,0005	0,0319±0,0005
[1643]	0,0501±0,0005	0,0501±0,0005	0,0479±0,0005	0,0430±0,0005	0,0446±0,0005
[1698]	0,0171±0,0005	0,0222±0,0005	0,0197±0,0005	0,0190±0,0005	0,0148±0,0005
[1563]	0,0077±0,0005	0,0092±0,0005	0,0069±0,0005	0,0077±0,0005	0,0029±0,0005
[1576]	0,0140±0,0005	0,0163±0,0005	0,0167±0,0005	0,0158±0,0005	0,0181±0,0005

Таблица 8. Интенсивности характерных полос (область оснований) в спектрах ДНК и комплексов транс-ДДП-ДНК по мере увеличения молярного соотношения ДДП/ДНК (слева-направо)

Интенсивность полосы 1643 см⁻¹, соответствующей колебаниям в кольце тимина[60], уменьшается при увеличении отношения ДДП/ДНК. Так же падает интенсивность полос 1698 см⁻¹(карбонильная группа тимина) [59] и 1563 см⁻¹ (С=N7 в гуанине). Интенсивность полосы 1576 см⁻¹ (колебания С=NH₂ в гуанине[61], кольца в аденине[58]) увеличивается с повышением концентрации транс-ДДП.

В **Таблице 9** приведены значения интегральных вкладов, рассчитанных, как и в предыдущих случаях, средствами программного пакета Origin. В крайнем левом столбце указаны волновые числа для ДНК, в следующем столбце – интегральные вклады полос для ДНК, полученные в данной работе, а в остальных столбцах – значения для комплексов с разным отношением ДДП/ДНК.

Волновое число	ДНК	1\100	1\50	1\25	1\10
[1621]	8,82663±10 ⁻⁶	9,34537±10 ⁻⁶	9,51641±10 ⁻⁶	8,90227±10 ⁻⁶	9,30853±10 ⁻⁶
[1643]	17,83712±10 ⁻⁶	17,26586±10 ⁻⁶	16,22242±10 ⁻⁶	14,37935±10 ⁻⁶	14,30635±10 ⁻⁶

[1698]	4,36810±10 ⁻⁶	6,09875±10 ⁻⁶	5,21558±10 ⁻⁶	4,98299±10 ⁻⁶	3,42376±10 ⁻⁶
[1563]	1,46685±10 ⁻⁶	1,96226±10 ⁻⁶	1,27708±10 ⁻⁶	1,47291±10 ⁻⁶	1,33211±10 ⁻⁶
[1576]	3,60241±10 ⁻⁶	4,37358±10 ⁻⁶	4,73312±10 ⁻⁶	4,30966±10 ⁻⁶	4,10042±10 ⁻⁶

Таблица 9. Интегральные вклады характерных полос (область оснований) ДНК и комплексов транс-ДДП-ДНК по мере увеличения молярного соотношения ДДП/ДНК (слева направо)

Полоса 1643 см⁻¹, соответствующая колебаниям в кольце тимина [60], стабильно уменьшает свой вклад в композитную полосу при увеличении отношения ДДП/ДНК. Полоса 1563 см⁻¹ (C=N7 в гуанине) [56,58] неравномерно уменьшает вклад, а полоса 1576 см⁻¹ (колебания C=NH2 в гуанине[61], кольца в аденине[58]) неравномерно свой вклад увеличивает

Данные **таблицы 10** иллюстрируют взаимодействие ДНК с транс-ДДП. В крайнем левом столбце приведены положения полос сахарофосфатного остова, найденные в литературе, с отнесениями и со ссылками на источники, во втором столбце – полученные нами для ДНК и для комплексов с разными соотношениями ДДП/ДНК. Слева направо увеличивается молярное соотношение транс-ДДП-ДНК в комплексах.

Полоса в ДНК, отнесение в литературе	ДНК	1\100	1\50	1\25	1\10
1088, О-Р-О симметр. [58]	1087,1±0,5	1088,2±0,5	1088,0±0,5	1088,1±0,5	1088,3±0,5
	1077,2±0,5	1077,1±0,5	1075,4±0,5	1076,6±0,5	1077,3±0,5
1053, С-О в дезоксирибозе [58]	1053,2±0,5	1053,3±0,5	1053,1±0,5	1053,2±0,5	1054,6±0,5
1020 колебания в кольце дезоксирибозы [58]	1025,1±0,5	1025,0±0,5	1024,2±0,5	1024,3±0,5	1025,6±0,5
970 С-С в дезоксирибозе[58]	970,0±0,5	970,4±0,5	969,7±0,5	970,1±0,5	969,8±0,5
Слабое колебание в	938,7±0,5	938,9±0,5	939,1±0,5	939,3±0,5	939,0±0,5

кольце дезоксирибозы [59]					
895 валентные колебания кольца дезоксирибозы [56, 59]	895,0±0,5	895,2±0,5	895,1±0,5	895,5±0,5	895,7±0,5
837 валентные колебания кольца дезоксирибозы [56, 59]	836,3±0,5	837,0±0,5	836,7±0,5	837,3±0,5	836,9±0,5

Таблица 10. Колебания сахарофосфатного остова ДНК и комплексов транс-ДДП-ДНК. В крайнем левом столбце приведены волновые числа полос, найденные в литературных источниках, с отнесениями и ссылками. Во втором столбце приведены данные, полученные для ДНК в данной работе. В остальных столбцах – данные для комплексов. Молярное отношение транс-ДДП-ДНК возрастает слева направо.

Согласно данным **таблицы 10**, при взаимодействии ДНК с транс-ДДП полосы сахарофосфатного остова практически не смещаются, что косвенно подтверждает выдвинутый нами тезис о том, что *цис*-ДДП сильнее воздействует на ДНК. В **таблицах 11, 12** приведены данные об изменениях интенсивностей и интегральных вкладов полос при взаимодействии ДНК с транс-ДДП. В крайнем левом столбце приведены волновые числа для ДНК, во втором столбце – интенсивности в спектре ДНК (по результатам данной работы). Полосы дезоксирибозы 1024 и 938 см⁻¹ [58] увеличивают свою интенсивность. Однако, все изменения спектра выражены не так сильно, как в случае с *цис*-ДДП.

Волновое число в ДНК	ДНК	1\100	1\50	1\25	1\10
1088	0,1718±0,0005	0,1717±0,0005	0,1842±0,0005	0,1793±0,0005	0,1768±0,0005
1076	0,0478±0,0005	0,04448±0,0005	0,0403±0,0005	0,0433±0,0005	0,0470±0,0005
1053	0,0814±0,0005	0,0783±0,0005	0,0757±0,0005	0,0780±0,0005	0,0797±0,0005
1024	0,0215±0,0005	0,0225±0,0005	0,0234±0,0005	0,0228±0,0005	0,0237±0,0005
970	0,0733±0,0005	0,0732±0,0005	0,0732±0,0005	0,0732±0,0005	0,0732±0,0005
938	0,0064±0,0005	0,0077±0,0005	0,0064±0,0005	0,0067±0,0005	0,0123±0,0005

895	0,0153±0,0005	0,0158±0,0005	0,0154±0,0005	0,0155±0,0005	0,0157±0,0005
837	0,0103±0,0005	0,0120±0,0005	0,0109±0,0005	0,0112±0,0005	0,0123±0,0005

Таблица 11. Интенсивности характерных полос (область фосфатов) в спектрах ДНК и комплексов транс-ДДП-ДНК по мере увеличения молярного соотношения ДДП/ДНК (слева-направо)

В таблице 12 приведены результаты расчета интегральных вкладов наблюдаемых полос. В крайнем левом столбце указаны волновые числа полос, наблюдаемых в ДНК, во втором столбце – интегральные вклады от всех полос для ДНК, полученных в этой работе, а далее – интегральные вклады полос комплексов с различным молярным соотношением транс-ДДП-ДНК. Молярное соотношение увеличивается слева направо.

Волновое число в ДНК, отнесение	ДНК	1\100	1\50	1\25	1\10
1088	62,03086±10 ⁻⁶	63,1776±10 ⁻⁶	67,50432±10 ⁻⁶	65,07514±10 ⁻⁶	62,07619±10 ⁻⁶
1076	10,30909±10 ⁻⁶	9,14491±10 ⁻⁶	6,73698±10 ⁻⁶	8,04252±10 ⁻⁶	9,39881±10 ⁻⁶
1053	19,00221±10 ⁻⁶	18,38019±10 ⁻⁶	16,88554±10 ⁻⁶	17,84214±10 ⁻⁶	18,86876±10 ⁻⁶
1024	8,65785±10 ⁻⁶	9,2973±10 ⁻⁶	8,87317±10 ⁻⁶	9,0402±10 ⁻⁶	9,65624±10 ⁻⁶
970	73,77337±10 ⁻⁶	70,15883±10 ⁻⁶	72,6249±10 ⁻⁶	71,53186±10 ⁻⁶	71,4847±10 ⁻⁶
938	4,89119±10 ⁻⁶	7,08867±10 ⁻⁶	5,57550±10 ⁻⁶	5,45122±10 ⁻⁶	4,86375±10 ⁻⁶
895	11,37234±10 ⁻⁶	11,03601±10 ⁻⁶	11,21678±10 ⁻⁶	11,24819±10 ⁻⁶	11,21254±10 ⁻⁶
837	9,96309±10 ⁻⁶	11,71645±10 ⁻⁶	10,58281±10 ⁻⁶	11,76873±10 ⁻⁶	12,43901±10 ⁻⁶

Таблица 12. Сравнение интегральных вкладов характерных полос (область фосфатов) ДНК и комплексов транс-ДДП-ДНК по мере увеличения молярного соотношения ДДП/ДНК (слева-направо)

Следует обратить внимание, что интегральные вклады двух групп полос 1088-1024 см⁻¹ и 970-837 см⁻¹ рассчитывались отдельно.

3.4. Обсуждение. Спектры области оснований комплексов ДНК с *цис*-ДДП и с *транс*-ДДП изображены на **рис 3.7**. На графике **а)** полосы изменяются более существенно, чем на графике **б)**. Сравнение графиков на **рис.3.7** позволяет нам предположить, что *цис*-ДДП более активно связывается с ДНК[15], чем *транс*-ДДП, поскольку смещения спектральных полос и изменения значений их интенсивностей качественно более заметны.

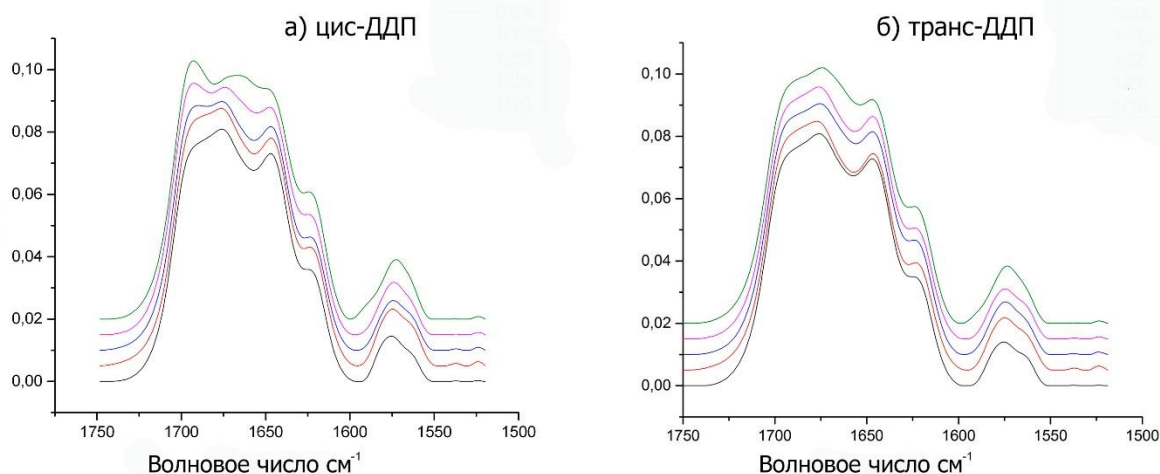


Рис 3.7. Спектры комплексов ДНК с *цис*-ДДП и с *транс*-ДДП при различных молярных отношениях ДДП/ДНК. На рисунке а) изображены спектры комплексов ДНК с *цис*-ДДП. На рисунке б) изображены спектры комплексов ДНК с *транс*-ДДП. Черная кривая – спектр ДНК. Красная линия – комплекс ДДП/ДНК= 1/100, синяя кривая ДДП/ДНК = 1/50, малиновая кривая ДДП/ДНК=1/25, зеленая кривая ДДП/ДНК=1/10.

Проанализируем теперь изменения, произошедшие в спектре в области (800-1200 см^{-1}), соответствующей колебаниям сахарофосфатного остова.[58] На **рис.3.8**. представлены спектры области фосфатов комплексов ДНК с *цис*-ДДП и *транс*-ДДП. Визуально изменения в спектрах зафиксировать не удалось.

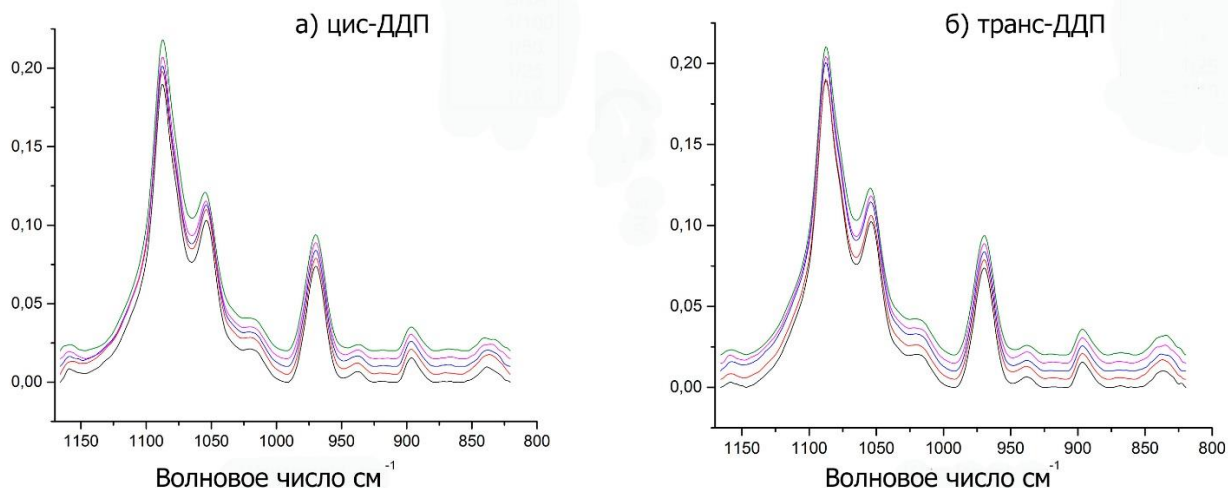


Рис 3.8. Спектры комплексов ДНК с *цис*-ДДП и с *транс*-ДДП в области фосфатов при различных молярных отношениях ДДП/ДНК. На рисунке а) изображены спектры комплексов ДНК с *цис*-ДДП. На рисунке б) изображены спектры комплексов ДНК с *транс*-ДДП. Черная кривая – спектр ДНК. Красная линия – комплекс ДДП/ДНК = 1/100, синяя кривая ДДП/ДНК = 1/50, малиновая кривая ДДП/ДНК = 1/25, зеленая кривая ДДП/ДНК = 1/10.

Большинство полос сахарофосфатного остова сохраняют стабильное положение, это ещё раз косвенно подтверждает тезис о том, что основной мишенью для *цис*-ДДП в ДНК являются основания.

Основным полученным результатом является сильное смещение полос, отвечающих за колебание связей в гуанине. Полоса 1564 см^{-1} ($\text{C}=\text{N}7$) и полоса 1576 см^{-1} ($\text{C}=\text{NH}2$) сдвигаются наиболее существенно. Исходя из этого мы можем сделать вывод, что ДДП взаимодействует с гуанином, и образует координационную связь именно с атомом N7, который является наиболее активным центром [57] (рис.3.9)

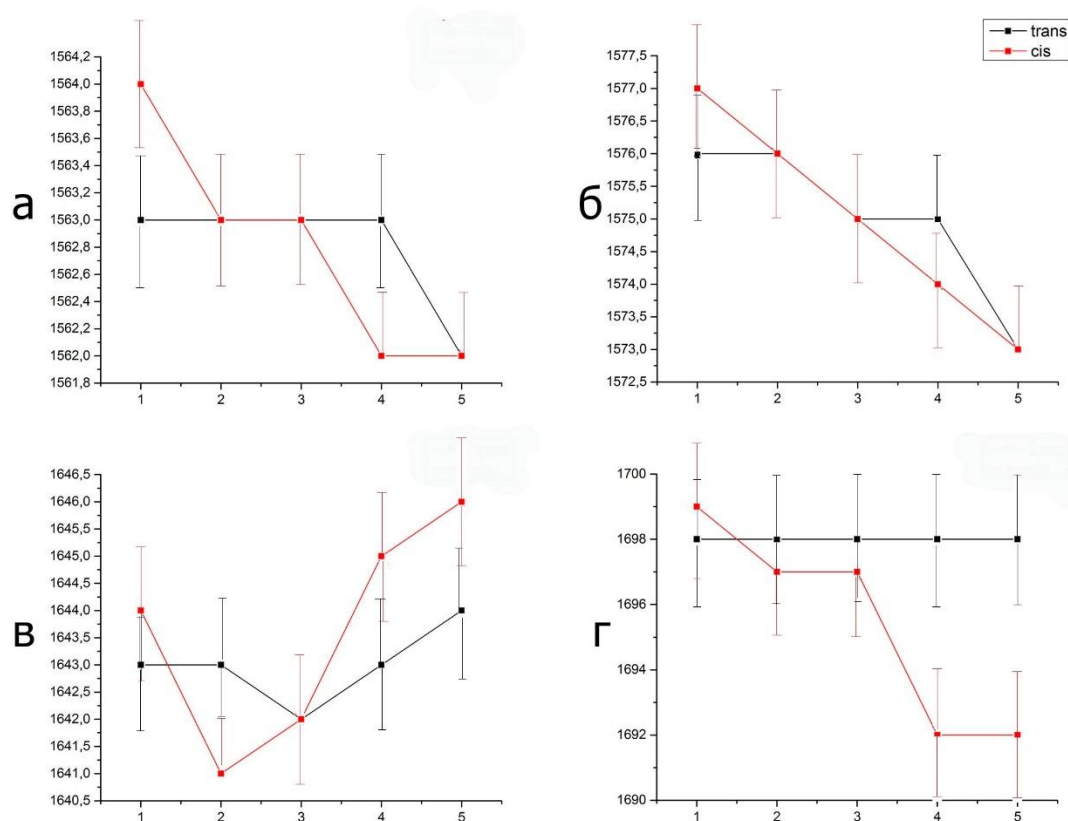


Рис.3.9. Смещение полос в области оснований при взаимодействии ДНК с ДДП. Рисунок а – полоса 1564 см^{-1} ($C=N7$ в гуанине), рисунок б – полоса 1576 см^{-1} ($C=NH2$ в гуанине), рисунок в – 1643 см^{-1} (кольцо тимина), рисунок г – 1698 см^{-1} ($C=O$ в тимине), красная линия – взаимодействие ДНК с *цис*-ДДП, черная линия – с *транс*-ДДП. Тонкими линиями обозначены погрешности. По оси абсцисс обозначены номера образцов. 1- ДНК, 2 – комплекс ДДП/ДНК 1/100, 3 – комплекс ДДП/ДНК 1/50, 5 – комплекс ДДП/ДНК 1/25, 5 – комплекс ДДП/ДНК 1/10

Так же мы наблюдаем изменение в полосах, соответствующих колебаниям других азотистых оснований: сдвигается к меньшим волновым числам полоса 1698 см^{-1} ($C=O$ в тимине) и композитная полоса 1974 см^{-1} [59]. Причем в случае взаимодействия ДНК с *цис*-ДДП изменения выражены гораздо более сильно, чем в случае с *транс*-ДДП. В литературе мы находим подтверждение данным о преимущественном связывании гуанина с ДДП[57]. Основная причина, по которой гуанин является более предпочтительным, чем аденин, – это

возможность ДДП образовывать дополнительную водородную связь с кислородом карбонильной группы гуанина [63], [64], [57]. Что касается изменений, происходящих с полосами карбонильных групп других азотистых оснований (1698 см^{-1} (C=O в тимине)), то это может быть объяснено образованием водородной связи C2=O с NH2 ДДП в случае связывания ДДП с одним из соседних азотистых оснований. C2=O тимина выходит в большую бороздку, и является, наряду с C=O гуанина, активным протонакцепторным центром. [65]. Для более детального изучения того, как именно аддукты, образующиеся при взаимодействии ДДП с ДНК, влияют на соседние азотистые основания, можно применить дополнительные методы: ИК-спектроскопия, к сожалению, не дает возможности построить полную картину. Например, можно применить ЯМР для визуализации аддуктов на молекуле ДНК или снять спектр кругового дихроизма, который позволит нам судить об изменении углов химических связей и, соответственно, о происходящих в молекуле конформационных изменениях. Следует отметить, что *транс*-ДДП не вызывает таких сильных изменений в полосах, соответствующих карбонильным группам азотистых оснований – это дает нам право выдвинуть предположение о том, что при связывании *транс*-ДДП с ДНК преобладают монофункциональные аддукты, поскольку *транс*-ДДП имеет пространственную структуру менее удобную для образования бифункциональных аддуктов. [15] Бифункциональные аддукты могут повлиять на форму двойной спирали. Располагаясь на близком расстоянии друг от друга они могут способствовать изгибу молекулы, возможно частичное раскручивание участков ДНК и образование локальных расширений малой бороздки. [41]. Наблюдаемые изменения в спектре фосфатов позволяют нам утверждать, что *цис*-ДДП (в отличие от *транс*-ДДП) при взаимодействии с ДНК способствует искажению формы двойной спирали.

ОСНОВНЫЕ ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ:

- установлено, что оптимальное время обработки растворов ДНК ультразвуком с целью уменьшения ее молекулярной массы, составляет 20 минут
- отработана методика изотопного замещения растворителя без промежуточного высушивания образцов
- проведен анализ колебаний химических групп в составе оснований и сахарофосфатного остова ДНК при взаимодействии с ДДП. Показано, что наиболее чувствительны к связыванию платины группы в составе азотистых оснований.

ВЫВОДЫ

На основе анализа полученных данных, можно сделать следующие выводы:

1. Атом N7 гуанина является предпочтительным участком связывания ДДП на ДНК;
2. Связывание *цис*-ДДП приводит к существенной деформации сахарофосфатного остова ДНК;
3. В условиях эксперимента, *транс*-ДДП образует преимущественно монофункциональные аддукты на ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В литературных источниках цисплатин упоминается как один из наиболее эффективных на сегодняшний день противоопухолевых препаратов [14,15]. Известно, что его механизм действия основан на блокировании клеточного деления, и основной мишенью для цисплатина в клетке является ДНК [22,23] В данной работе была поставлена задача исследовать методом инфракрасной спектроскопии взаимодействие *цис*-ДДП и *транс*-ДДП с молекулой ДНК.

Были проанализированы ИК-спектры комплексов ДНК с *цис*-ДДП и с *транс*-ДДП в тяжелой воде. Зарегистрированы изменения положений и интенсивностей полос 1563 см^{-1} ($\text{C}=\text{N7}$ в гуанине [58-61]), 1576 см^{-1} ($\text{C}=\text{NH}_2$ в гуанине[61]), 1643 см^{-1} (кольцо тимина [58]), 1698 см^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ в тимине [59]), 1024 см^{-1} и 1053 см^{-1} (кольцо дезоксирибозы [58]) при увеличении молярного отношения *цис*-ДДП/ДНК. В случае *транс*-ДДП изменения волновых чисел и интенсивностей полос наблюдались только в области оснований ДНК: спектр области фосфатов существенно не изменялся.

Для более детального изучения изменений, произошедших в описанной системе, можно применить следующие методы: электрофорез – для определения количества ДДП, связавшейся с ДНК, по изменению массы молекул в образцах, ЯМР[41] или малоугловое нейтронное рассеяние – для визуализации образующихся аддуктов. Так же информативными будут Рамановские спектры комплексов ДНК с ДДП. [58]

Список использованной литературы

- [1] Волькенштейн М.В. Биофизика
- [2] James Watson, Francis Crick, A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, 1953, 171 (4356): 737–738
- [3] Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж., Молекулярная биология клетки, том 1, Мир, 1994
- [4] Интернет-источник, Кучерявый В.В. «Основы биохимии спорта», <https://refdb.ru/look/2357490-p3.html>
- [5] Интернет-источник, Ефимова О.А. «Молекулярная биология для биоинформатиков», модифицированный фрагмент презентации, <http://www.myshared.ru/slide/286950/>
- [6] Зенгер В., Принципы структурной организации нуклеиновых кислот, Москва, «Мир», 1987
- [7] Hunter, Christopher A.; Sanders, Jeremy K. M. (1990). "The nature of π - π Interactions". *J. Am. Chem. Soc.* 112 (14): 5525–5534.
- [8] DNA comes in many forms. *Rich A. Gene*. 1993 Dec 15;135(1-2):99-109
- [9] Alberts B. et al. *Essential Cell Biology* // New York – 2009
- [10] Интернет источник «Островок здоровья» http://bonoesse.ru/blizzard/A/Posobie/Genetik/AiS/DNA_02.html
- [11] Интернет-источник, http://medbe.ru/materials/meditsinskaya-bioneorganika/primery-vazhneyshikh-khelatov-v-biokhimii/?PAGEN_2=4
- [12] Ф.Басоло, Р.Джонсон, «Химия координационных соединений», «Мир», Москва, 1966
- [13] Интернет источник: <https://www.sciencedaily.com/releases/2009/12/091207151226.htm>
- [14] Zamble DB, Lippard SJ, 1995

- [15] Jamieson ER, Lippard SJ, Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts, Chem.Rev.,1999
- [16] Hayes, D.; Cvitkovic, E.; Golbey, R.; Scheiner, E.; Krakoff, I. H. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 1976, 17, 169.
- [17]Weiss, R. B.; Christian, M. C. Drugs 1993, 46, 360-377
- [18]Hambley, T. W. Coord. Chem. Rev. 1997, 166, 181-223
- [19]Lebwohl, D.; Canetta, R. Eur. J. Cancer 1998, 34, 1522-1534
- [20] Cvitkovic, E. Br. J. Cancer 1998, 77,8-11
- [21] Интернет источник: <http://placenta-lab.ru/ru/patent/2341296.html>
- [22] Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. Nature 1965, 205, 698699
- [23] Kociba, R. J.; Sleight, S. D.; Rosenberg, B. Cancer Chemother. Rep. 1970, 54, 325-328.
- [24] Harder H.C., Rosenberg B. Inhibitory effects of anti-tumor platinum compounds on DNA, RNA and protein syntheses in mammalian cells in vitro // Int. J. Cancer, 1970, 6(2), 207-216
- [25] Riley, C.M., and Sternson, L.A., “Cisplatin” Analytical Profiles of Drug Substances, 14, 77, 1985
- [26] Mu-Hyun Baik et al., Theoretical Study of Cisplatin Binding to Purine Bases, New York, 2003
- [27] The Merck Index, 12th ed., Entry# 2378
- [28] Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 31st ed. p. 552. 4
- [29]Greene, R.F. et al., Am. J. Hos. Pharm., 36, 38, 1979
- [30]Chibber, R. et al., Eur. J. Cancer and Clin. Oncol., 25, 27, 1989
- [31]Burnouf, D. et al., Proc. Natl Acad. Sci., 87, 6087, 1990

- [32] Eastman A., The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes // *Pharmacol. Ther.*, 1987, 34(2), 155-166
- [33] Bancroft, D. P.; Lepre, C. A.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112
- [34] Fichtinger-Schepman A.M., van der Veer J.L., den Hartog J.H., Lohman P.H.M., Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification and quantitation // *Biochemistry*, 1985, 24(3), 707-713
- [35] Struik AF et al., 1991
- [36] Legendre, F.; Bas, V.; Kozelka, J.; Chottard, J. C. *Chem. Eur. J.* 2000, 6, 2002.
- [37] Miller, S. E.; House, D. A. *Inorg. Chim. Acta* 1990, 173, 53
- [38] Miller, S. E.; House, D. A. *Inorg. Chim. Acta* 1989, 166, 189
- [39] Roberts J.J., Pascoe J.M., Cross-linking of complementary strands of DNA in mammalian cells by antitumour platinum compounds // *Nature*, 1972, 235(5336), 282-284
- [40] Naser L.J., Pinto A.L., Lippard S.J., Essigmann J.M. Chemical and biological studies of the major DNA adduct of cis-diamminedichloroplatinum(II), cis-[Pt(NH₃)₂(d(GpG))], built into a specific site in a viral genome // *Biochemistry*, 1988, 27(12), 4357-436
- [41] Gelasco A, Lippard SJ, 1998
- [42] Pizzaro AM, Sandler PJ, 2009
- [43] Eastman A., Barry M.A., Interaction of trans-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation of monofunctional adducts and their reaction with glutathione // *Biochemistry*, 1987, 26(12), 3303-3307

- [44] Teni Boulikas, Alexandros Pantos, Evangelos Bellis, and Petros Christofis, Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms, *Cancer Therapy* Vol 5, 537-583, 2007
- [45] Практикум по спектроскопии. Вода в минералах: учебное пособие. Издательство «Академия естествознания», 2010
- [46] Л.А. Кульковский. Вода знакомая и загадочная. Киев: изд. Радянська школа, 1982, 53 с.
- [47] Интернет источник: http://femto.com.ua/articles/part_1/1672.html
- [48] Rudolf Zbinden, *Infrared Spectroscopy of High Polymers*, Academic Press, New York and London, 1964
- [49] Беллами Л., *Инфракрасные спектры сложных молекул*, ИЛ, Москва, 1963]
- [50] Инт.источник:http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_vibrational_spectrum.html
- [52] <https://ru.wikipedia.org>
- [53] P. B. Fellgett, «On the ultimate sensitivity and practical performance of radiation detectors», 1949, *J. Opt. Soc. Am. (OSA)* 39: 970–976
- [54] Поляничко А.М., «Электрофорез в агарозном геле», Методическое пособие, СПб, 2007
- [55] Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот, А.С. Спирин, *Биохимия*, т.23, вып.5, 1958
- [56] V. Andrushchenko et al, DNA Oligonucleotide-cis-Platin Binding: Ab Initio Interpretation of the Vibrational Spectra, *J. Phys. Chem. A* 2007, 111, 9714-9723
- [57] Baik et al, Theoretical study of cisplatin binding to purine bases, *J Am Chem Soc*, 2003
- [58] *Drug-DNA Interactions: Structures and Spectra*, Kazuo Nakamoto, Masamichi Tsuboi, Gary D. Strahan, 2008

- [59]Взаимодействие диамминодихлороплатины (II) с ДНК и белками , И.А. Белая, СПбГУ, 2015
- [60] Taillandier E, Liquier J, 2002
- [61] Tsankov D et al., 2003
- [62]Г.В. Юхневич. Инфракрасная спектроскопия воды. М.: Изд. Наука, 1973, 207с.
- [63] Bauk et all 2002
- [64] Struik AF et al., 1991
- [65]Нечипуренко Ю.Д. Анализ взаимодействия ДНК с лигандами, Москва, 2014