

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

Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров

Направление «Физика»



**Изучение взаимодействия молекулы ДНК с новым  
фенантроцианиновым комплексом Zn(II)**

Бакалаврская работа студента  
дневного отделения

\_\_\_\_\_ **Акуленковой Елены Валерьевны**

Научный руководитель:

\_\_\_\_\_ к. ф.-м. н., доц. **Пастон С.В.**

Рецензент:

\_\_\_\_\_ лаборант-исследователь ПИЯФ **Шулина О. В.**

# Содержание

Введение .....	3
I. Литературный обзор.....	4
1. Структура ДНК .....	4
1.1. Первичная структура ДНК.....	4
1.2. Вторичная структура ДНК.....	5
1.3. Третичная структура ДНК .....	6
2. Взаимодействие ДНК с ионами металлов .....	7
3. Взаимодействие ДНК с металлокомплексами .....	10
II. Материалы и методы.....	13
1. Электронная спектроскопия .....	13
2. Плавление .....	14
3. Флуоресценция.....	17
4. Материалы .....	18
III. Результаты и обсуждение.....	20
Выводы.....	43
Список использованной литературы.....	44

## Введение

Металлокомплексы широко используются как противоопухолевые, противомикробные и противогрибковые препараты, искусственные нуклеазы, фотосенсибилизаторы. Связывание с молекулой ДНК или ее расщепление приводит к ингибированию синтеза макромолекулы в клетке. Этим обусловлена актуальность разработки новых комплексных соединений и исследования их взаимодействия с ДНК.

В настоящее время наибольший интерес представляют фенантролин и его производные, содержащие ионы переходных металлов. Известно, что такие металлокомплексы проявляют наибольшую активность против различных вирусов и бактерий, а также весьма эффективны как противоопухолевые препараты.

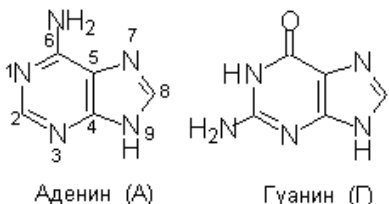
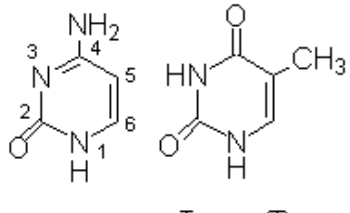
Данная работа посвящена изучению взаимодействия молекулы ДНК в растворе с новыми 1,10-фенантроцианиновыми комплексами Zn (II).

# І. Литературный обзор

## 1. Структура ДНК

### 1.1. Первичная структура ДНК

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) является главной биологической молекулой, так как обеспечивает хранение и передачу генетических данных живых организмов. ДНК представляет собой полимер, состоящий из мономерных звеньев – нуклеотидов, которые состоят из дезоксирибозы (остатка сахара), остатка фосфорной кислоты и азотистого основания. Азотистые основания разделяют на две группы: пурины и пиримидины. Пурины образованы соединёнными пяти- и шестичленными гетероциклами. К ним относятся аденин (А) и гуанин (Г). Пиримидины состоят только из шестичленного гетероцикла. К пиримидинам относят цитозин (С) и тимин (Т) [1, 2].

Пуриновые основания	 Аденин (А)      Гуанин (Г)
Пиримидиновые основания	 Цитозин (Ц)      Тимин (Т)

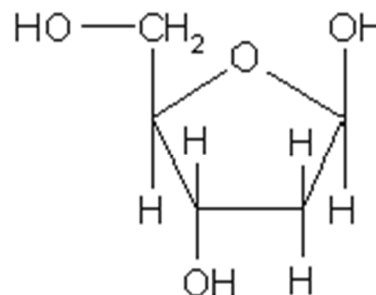


Рис. 1. Дезоксирибоза [1]

Табл. 1. Азотистые основания ДНК [1]

В ДНК дезоксирибозы связаны между собой фосфодиэфирной связью, а основания присоединены гликозидной связью к первому атому углерода сахарного кольца.

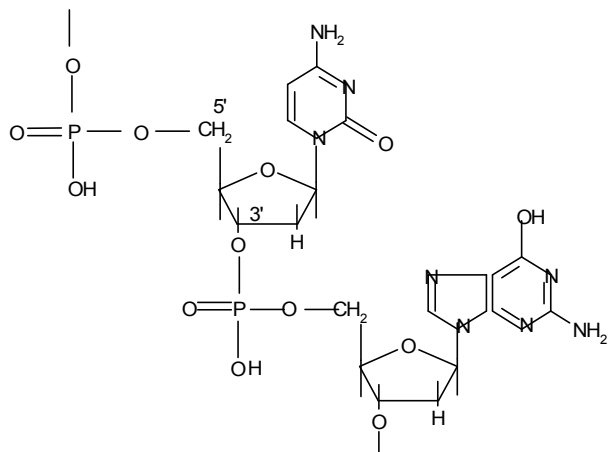


Рис. 2. Фрагмент цепи ДНК [1]

На рис. 2 приведён фрагмент цепи ДНК, состоящий из двух нуклеотидов. Каждая фосфатная группа образует две эфирные связи с 5'- и 3'- атомами углерода двух соседних дезоксирибоз. Поэтому такая связь называется фосфодиэфирной. Последовательность нуклеотидов в цепи принято записывать от 5'- конца к 3'- концу [1].

Первичная структура ДНК является чрезвычайно устойчивой и не разрушается при температурном воздействии. Однако она может быть разрушена ферментами [1].

Полимерная структура ДНК отвечает за хранение и запись генетической информации, а вторичная структура ДНК обеспечивает обработку этой информации (репликацию) [1].

## 1.2. Вторичная структура ДНК

Вторичной структурой ДНК является двойная спираль, образованная двумя антипараллельными полинуклеотидными цепями. Формирование такой структуры осуществляется азотистыми основаниями, которые представляют собой плоские гидрофобные соединения, образующие водородные связи друг с другом. Аденин одной цепи связывается с тимином другой цепи двумя водородными связями, а гуанин – с цитозином тремя водородными связями, как показано на рис. 3 [1].

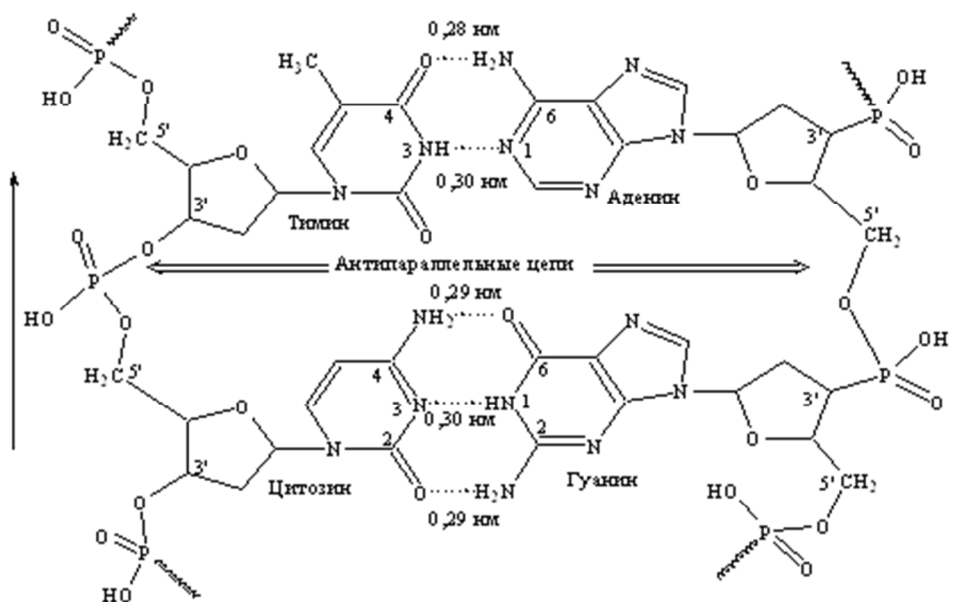
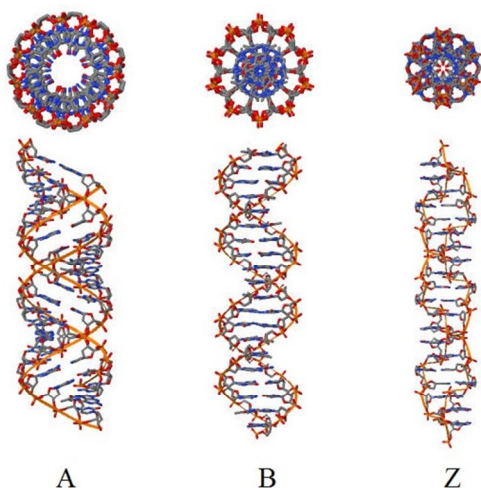


Рис. 3. Вторичная структура ДНК [2]

Существует три типа вторичной структуры ДНК: А-, В- и Z-формы, причём А- и В-формы являются правозакрученными, а Z-форма – левозакрученная. В-форма отличается от А-формы конформацией дезоксирибозы и ориентацией плоскостей оснований относительно оси спирали.

Также эти формы имеют различные параметры цепи, такие как шаг спирали, диаметр спирали, количество пар оснований на виток и др. [3] (см. табл. 2)



Параметр	A-форма	B-форма	Z-форма
Шаг спирали	28,6 Å	33,6 Å	45 Å
Диаметр спирали	23 Å	20 Å	18 Å
Кол-во пар оснований на виток	11	10	12

Табл. 2. Характеристики A-, B- и Z-форм ДНК [3]

Рис. 4. A-, B- и Z-формы ДНК [3]

Параметры двойной спирали, а следовательно, и её форма могут меняться в зависимости от внешних условий. Нативная ДНК в клетке и в водном растворе находится в B-форме. При повышении ионной силы раствора реализуется A-форма, при определённой последовательности нуклеотидов – Z-форма [1].

### 1.3. Третичная структура ДНК

Третичная структура ДНК – пространственная организация двойной спирали. Вирусы и некоторые бактерии имеют замкнутую кольцевую ДНК большой персистентной длины. Она может находиться в суперспирализованной или релаксированной форме, как показано на рис. 5 [1].

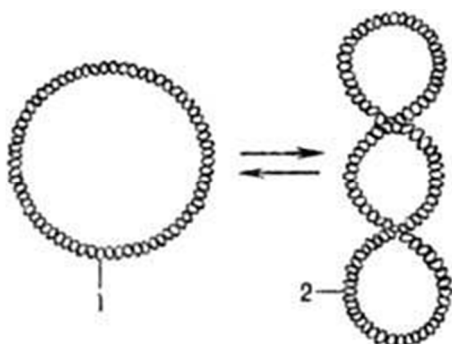


Рис. 5. Кольцевая ДНК в релаксированной (1) и суперспиральной (2) форме [4]

В клетках эукариот третичная структура ДНК представляет собой плотную упаковку вторичной структуры, которую обеспечивают гистоны. Гистоны – это ядерные белки,

содержащие остатки аргинина и лизина. Фосфатные группы ДНК, расположенные снаружи спирали и заряженные отрицательно, взаимодействуют с положительно заряженными гистонами [5].

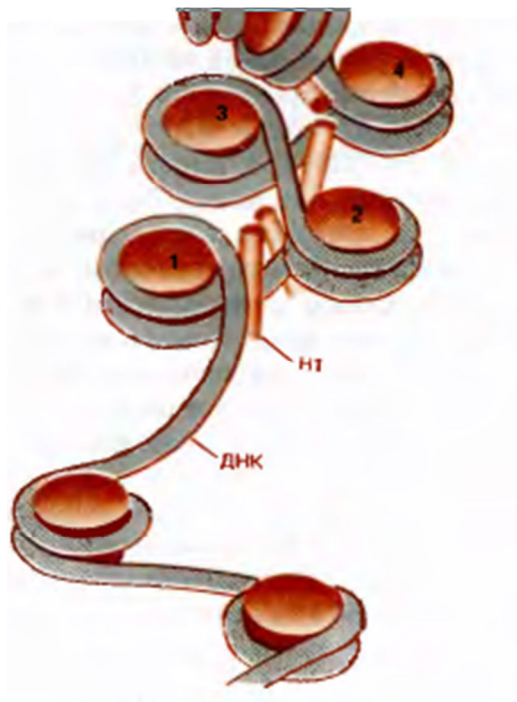


Рис. 6. Первый уровень организации хроматина [3]

Восемь гистонов четырех типов (Н2А, Н2В, Н3 и Н4) образуют комплекс, на который наматывается молекула ДНК, совершая 1,75 оборота, что соответствует 146 парам нуклеотидов. Совокупность белкового комплекса с ДНК называется нуклеосомой. Между двумя нуклеосомами находится линкерная ДНК, взаимодействующая с гистоном Н1 (рис. 6).

В водном растворе конформация ДНК зависит от молекулярной массы, вторичной структуры и свойств растворителя. При большом молекулярном весе молекула ДНК принимает форму статистического клубка. При малом молекулярном весе ( $M < 3 \times 10^5$  г/моль) её можно рассматривать как палочку [1].

## 2. Взаимодействие ДНК с ионами металлов

Ионы металлов могут связываться с четырьмя функциональными группами нуклеотида: атомами кислорода фосфатных групп, гидроксильными группами сахаров, эндоциклическими атомами азота и экзоциклическими кетогруппами оснований (рис.7) [3].

Атомы кислорода и азота могут связываться с ионами щелочных, щелочноземельных и переходных металлов. Фосфатные группы связываются со всеми вышеприведёнными ионами металлов, а гидроксильные группы сахаров взаимодействуют только со щелочными и щелочноземельными металлами. Эндоциклические атомы азота имеют неподелённую электронную пару, благодаря которой связываются с ионами металлов [3].

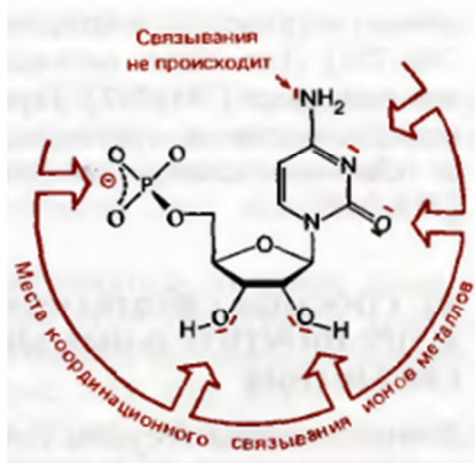


Рис. 7. Схема расположения мест связывания ионов металлов с нуклеотидом [3]

При взаимодействии с пурином ионы металлов вначале связываются с атомом N<sub>9</sub>, затем – с атомами N<sub>7</sub> и N<sub>1</sub>. При взаимодействии с тиминном связывание происходит сначала с атомом N<sub>1</sub>, а затем – с атомом N<sub>3</sub>. Для цитозина характерен обратный порядок связывания. При образовании гликозидной связи между сахаром и основанием атомы N<sub>9</sub> пурина и N<sub>1</sub> пиримидина блокируются, в результате чего в пуриновых нуклеозидах связывание начинается с атома N<sub>7</sub>, а из пиримидиновых нуклеозидов только цитидин остается способным связываться с катионом [3].

Кетогруппы оснований, как уже было сказано, тоже способны связываться с ионами металлов. В пиримидиновых нуклеотидах происходит прямое связывание катиона с атомом O<sub>2</sub> цитидина и с атомами O<sub>2</sub> и O<sub>4</sub> тимидина. У пуринов прямого связывания кислорода с ионом металла не наблюдается ввиду того, что атом N<sub>7</sub> является более выгодным местом связывания по сравнению с O<sub>6</sub>. Однако атом O<sub>6</sub> участвует в образовании водородных связей, стабилизируя металлокомплекс [3].

Аминогруппы не могут напрямую связываться с ионами металлов, но являются донорами для образования водородных связей, таким образом способствуя комплексообразованию. В сильнощелочных растворах в результате депротонирования аминогруппы становятся хорошими лигандами для катионов [3].

Существует два способа связывания иона металла с молекулой ДНК – специфическое и неспецифическое, – реализация которых зависит от валентности иона. При специфическом связывании образуется стабильный долгоживущий комплекс. При неспецифическом



связывании ионы металла образуют ионную атмосферу вокруг молекулы, оставаясь при этом подвижными. Для одновалентных ионов характерно неспецифическое связывание, однако при определённых внешних условиях (при уменьшении влажности или диэлектрической проницаемости среды) может реализоваться второй тип связывания. Для двухвалентных ионов характерны оба способа связывания, поэтому в растворе наблюдается равновесие между специфически и неспецифически связанными ионами [1].

Для молекулы ДНК характерны те же функциональные группы, с которыми могут связываться ионы металлов, что и для нуклеотидов, кроме гидроксильных групп сахаров. Связывание с той или иной функциональной группой зависит от природы металла. Взаимодействие ионов щелочных ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) и щелочноземельных ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ) металлов с ДНК осуществляется, в основном, по фосфатным группам. Двухвалентные ионы переходных металлов ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) могут связываться как с фосфатными группами, так и с основаниями в большой бороздке [1].

Ионы металлов оказывают влияние на вторичную и третичную структуры ДНК. Ионы  $\text{Na}^+$  способствуют образованию А-формы, а ионы  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  стабилизируют В-форму [1]. Кроме того, ионы металлов влияют на термостабильность ДНК, изменяя температуру плавления и ширину перехода спираль-клубок [3]. Изменение этих характеристик зависит от типа иона металла. Для одновалентных ионов температура плавления уменьшается в следующей последовательности:  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ , а ширина перехода спираль-клубок меняется согласно ряду:  $\text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Li}^+$  [1]. Ионы щелочных и щелочноземельных металлов повышают термостабильность ДНК, а ионы переходных металлов, наоборот, её снижают. Однако при больших концентрациях щелочных металлов ( $>2\text{M}$ ) наблюдается обратный эффект. При плавлении растворов с высоким содержанием ионов  $\text{Mg}^{2+}$  наблюдается агрегация ДНК. Этот процесс зависит от концентрации ДНК и природы ионов металла, поэтому агрегация ДНК при определённых условиях может происходить при комнатной температуре. Способность металлов вызывать агрегацию ДНК уменьшается в следующей последовательности:  $\text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$  [1].

При больших концентрациях соли в растворе необходимо учитывать гидратацию ДНК, при которой вокруг макромолекулы образуется два слоя воды – первичная и вторичная гидратные оболочки, - стабилизирующие структуру ДНК. В первичной гидратной оболочке молекулы воды упорядочены и встроены в двойную спираль, поэтому любое нарушение первичного слоя воды может привести к изменению конформации ДНК. Взаимодействие ионов щелочных и щелочноземельных металлов с молекулой ДНК осуществляется через вторичную гидратную оболочку, молекулы которой не упорядочены [1].

### 3. Взаимодействие ДНК с металлокомплексами

Фенантролин (Phen), изображённый на рис. 8, и его производные представляют огромный интерес из-за высокой активности против рака, вирусных, бактериальных и грибковых инфекций.

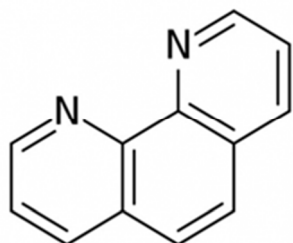


Рис. 8. Структура фенантролина

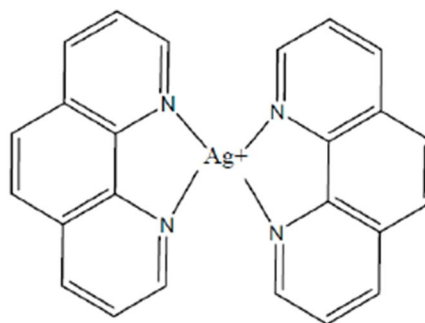


Рис. 9. Структура металлокомплекса [6]

Структура металлокомплекса, содержащего фенантролин, представлена на рис. 9. Подобные структуры могут самопроизвольно формироваться в водном растворе, содержащем фенантролин и ионы металла [7, 8]. Образование комплекса не вносит существенных изменений в УФ спектр поглощения фенантролина (рис. 10) [6, 7], однако образование металлокомплекса может проявиться в длинноволновой области спектра [8]. Флуоресценция металлокомплекса определяется флуоресценцией фенантролина [6].

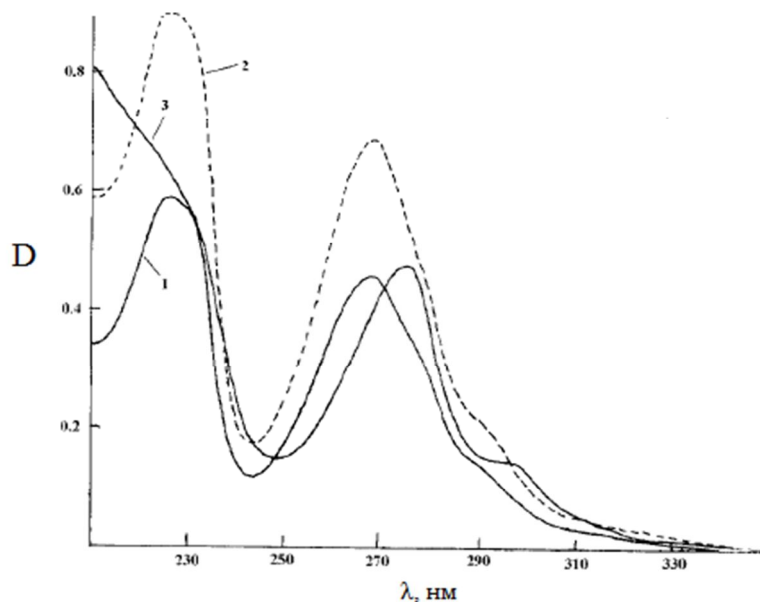


Рис. 10. УФ спектры поглощения  
1 -  $\text{Mg}(\text{phen})_3(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  ( $5.22 \cdot 10^6 \text{ M}$ )  
2 -  $1,10\text{-phen} \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $2.46 \cdot 10^5 \text{ M}$ )

Металлокомплексы могут связаться с молекулой ДНК [6, 9-15] или расщепить её по фосфодиэфирной связи [12], что позволяет ингибировать синтез ДНК в клетке. Существует три способа связывания металлокомплексов с ДНК [16, 17]:

- интеркаляция, обусловленная стэкинг-взаимодействиями;

- бороздочное связывание, при котором металлокомплекс взаимодействует с ДНК по бороздке;
- электростатическое взаимодействие, при котором металлокомплекс связывается с фосфатной группой ДНК.

В работах [6, 9-15] различными физическими методами было изучено связывание металлокомплексов с ДНК. Наиболее распространённым методом исследования является метод электронной спектроскопии. Любое изменение поглощения металлокомплексов при добавлении ДНК в ультрафиолетовой области спектра служит доказательством существования взаимодействия между ними. Увеличение концентрации ДНК приводит к гипохромному эффекту со смещением в длинноволновую часть спектра в случае интеркалирующего связывания хромофоров с азотистыми основаниями ДНК для следующих металлокомплексов:  $Zn(4\text{-пропионил-3-метил-1-(3-хлорофенил) пиразолон-5-один})_2H_2O$ ,  $Zn(4\text{-пропионил-3-метил-1-фенил пиразолон-5-один})_2H_2O$ ,  $Zn(4\text{-пропионил-3-метил-1-фенилпиразолон-5-один})_2(1,10\text{-фенантролин})$  [10],  $[M(L)(1,10\text{-фенантролин})_2]Cl_2$  ( $M = Cu(II), Ni(II), Co(II)$  и  $Zn(II)$ , L – основание Шиффа) [11],  $Ru(1,10\text{-фенантролин})_2(4\text{-метилфенил)имидазо[4,5-f]1,10\text{-phenanthroline}$  [13],  $Ru(1,10\text{-фенантролин})(\text{пирато[2',3':5,6]пиразино[2,3-f]1,10\text{-фенантролин}})_2(ClO_4)_2$  [14]. Гиперхромный эффект наблюдается при бороздочном или электростатическом связывании (название соединения) [15]. Способ связывания зависит от концентрации металлокомплекса. В работе [6] исследовали комплекс фенантролина с серебром – ацетат бис(1,10-фенантролин)Ag(I) моногидрат. Авторы сделали вывод о двух разных типах связывания данного соединения с ДНК: при низкой концентрации металлокомплекса в результате связывания иона металла с ДНК фенантролин отделяется от комплекса и может независимо интеркалировать в двойную спираль, а при высоких концентрациях металлокомплекса происходит его внешнее связывание с ДНК [6]. При плавлении системы ДНК-Ag-Phen с увеличением концентрации металлокомплекса наблюдалось повышение температуры плавления и возрастание ширины перехода спираль-клубок. Полученные результаты свидетельствуют о том, что металлокомплекс стабилизирует вторичную структуру ДНК [6].

Ещё одним эффективным методом изучения связывания металлокомплексов с ДНК является метод флуоресценции. В работе [6] рассматривалась флуоресценция двух систем: Ag-Phen-ДНК и Phen-ДНК. При увеличении концентрации ДНК в растворе форма полученных спектров не изменялась, но при этом слабо менялась интенсивность. Монотонное изменение интенсивности флуоресценции фенантролина, связанного с ДНК, указывает на один тип связывания. В случае же металлокомплекса Ag-Phen интенсивность флуоресценции сначала падает, а затем незначительно растёт при увеличении концентрации ДНК, что указывает на два типа связывания металлокомплекса с ДНК, и, по мнению авторов, подтверждает их вывод об

отделении фенантролина от комплекса, когда концентрация ДНК превышает концентрацию металлокомплекса больше, чем в 10 раз [6].

Помимо оптических методов для исследования связывания металлокомплексов с ДНК широко применяются гидродинамические методы. Одним из таких методов является вискозиметрия. Исследования, использующие данный метод, проводились в работах [6, 9, 11]. В проведённых экспериментах менялась концентрация металлокомплексов, и наблюдалось увеличение вязкости раствора. Известно, что при интеркаляции длина спирали ДНК увеличивается, так как пары оснований раздвигаются, освобождая место для молекулы комплекса, что приводит к увеличению вязкости раствора. Таким образом, было получено подтверждение интеркаляционного типа связывания различных металлокомплексов фенантролина с молекулой ДНК [6, 9, 11].

В работе [9] комплексы фенантролина с Cu(II), Zn(II) и Ni(II) показали высокую антибактериальную активность против некоторых бактериальных штаммов. Это объясняется тем, что координация уменьшает полярность иона металла из-за частичного распределения его положительного заряда с донорскими группами в системе хелатных колец. Этот процесс, в свою очередь, увеличивает липофильный характер центрального атома металла и способствует его проникновению через липидный слой микроорганизмов, разрушая их более агрессивно.

В работе [18] для производных фенантролина – 1,10-фенантроцианинов переходных металлов – были рассчитаны 50 %-но ингибирующие концентрации ( $IC_{50}$ ) для микобактерий туберкулёза и вируса герпеса. Их значения (0,1 - 3,0 мкг/мл) оказались на порядок ниже по сравнению с  $IC_{50}$  для соответствующих 1,10-фенантролиновых комплексов. Антибактериальная и противовирусная активность 1,10-фенантроцианинов возрастает в последовательности: Pd(II), Pt(II) < Zn(II) < Ag(I), Co(II) [18].

## II. Материалы и методы

### 1. Электронная спектроскопия

Спектроскопия описывает взаимодействие электромагнитного излучения с молекулами и даёт информацию о строении вещества. Каждое вещество имеет набор энергетических уровней, переход между которыми сопровождается испусканием или поглощением света и может быть описан следующей формулой:

$$E_2 - E_1 = h\nu.$$

Совокупность частот испускания (поглощения) света, определяющихся строением вещества, называется спектром испускания (поглощения) вещества. По полученному спектру можно судить о структуре образца [19].

При образовании молекулы из атомов происходит перераспределение электронной плотности. Существует три типа электронов:  $\sigma$ ,  $n$  и  $\pi$  – электроны, занимающие  $\sigma$ ,  $n$  и  $\pi$  – орбитали соответственно.  $\sigma$ -электроны взаимодействуют с одним или двумя атомами и образуют прочные химические связи. Поэтому для их возбуждения требуется большая энергия.  $n$ -электроны не участвуют в образовании химических связей, и орбитали, на которых находятся эти электроны, всегда заполнены. Пару  $n$ -электронов называют неподелённой парой. Под воздействием света  $n$ -электрон может перейти на свободную  $\pi^*$ -орбиталь.  $\pi$ -электроны взаимодействуют с большим числом атомов и имеются у соединений с двойными связями. Под воздействием света  $\pi$ -электроны могут переходить в возбуждённое состояние, т. е. на  $\pi^*$ -орбиталь [19].

Поглощение света в молекуле осуществляется специфическими группами атомов – хромофорами. Для ДНК в качестве хромофоров выступают азотистые основания. Вклады отдельных хромофоров неаддитивны из-за взаимодействий друг с другом. В растворах ДНК наблюдается гипохромный эффект – уменьшение оптической плотности раствора нативной ДНК по сравнению с денатурированной ДНК, что объясняется стэкинг-взаимодействиями оснований. Таким образом, по изменению оптической плотности раствора можно судить о степени денатурации ДНК [19].

В данной работе исследования проводили с помощью спектрофотометра СФ-56. Использовали кварцевые кюветы толщиной 1 см и 1 мм. В экспериментах измерялось оптическое поглощение раствора относительно растворителя, описываемое законом Бугера-Ламберта-Бэра:

$$I = I_0 10^{-D},$$

$$D = \epsilon Cl,$$

где  $D$  – оптическая плотность раствора, численно равная десятичному логарифму отношения интенсивности падающего света  $I_0$  к интенсивности прошедшего света  $I$ , т. е.  $D = \lg \frac{I_0}{I}$ ;  $l$  – толщина поглощающего слоя, равная толщине кюветы и выраженная в см,  $C$  – концентрация раствора, измеренная в молях на литр,  $\epsilon$  – молярный коэффициент экстинкции, выраженный в л\*моль<sup>-1</sup>\*см<sup>-1</sup> [19].

Концентрацию ДНК определяли методом Спирина. Для этого готовили два вида проб: с нативной и денатурированной ДНК. Для приготовления растворов денатурированной ДНК образцы кипятили в течение 20 минут в присутствии 6% HClO<sub>4</sub> с последующим быстрым охлаждением в сосуде со льдом. Концентрацию рассчитывали по формуле:

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

где  $V_k$  – конечный объём пробы,  $V_n$  – исходный объём раствора ДНК в данной пробе. Значение концентрации, посчитанное по вышеприведённой формуле, имеет размерность мкг/мл.

Для определения молярного коэффициента экстинкции, а следовательно, и степени нативности ДНК использовали следующую формулу:

$$\epsilon_{260} = \frac{31 \cdot D_{269} V_k}{0,099 \cdot C V_n},$$

где концентрация раствора выражена в мг/мл. Значение  $\epsilon_{260}$  лежит в диапазоне от 6500 до 6800 для нативного состояния ДНК.

## 2. Плавление

Для изучения вторичной структуры ДНК часто применяют метод плавления – термоиндуцированный переход спираль-клубок, схема которого приведена на рис. 11.

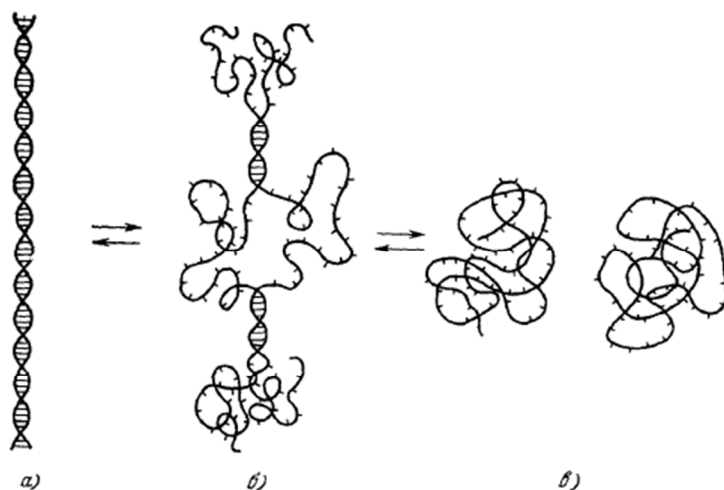


Рис. 11. Схема перехода спираль-клубок в ДНК: а) спиральное состояние; б) частично расплавленное состояние; в) полностью расплавленное состояние [20]

Нативная высокомолекулярная ДНК в растворе представляет собой набухший клубок, который может быть описан с помощью модели свободно-сочленённой цепи. Расстояние между концами цепи при отсутствии набухания (в  $\Theta$ -растворителе) описывается гауссовым распределением, поэтому полученный клубок называют гауссовым или статистическим клубком. При повышении температуры происходит разрыв водородных связей между основаниями, в результате чего двойная спираль расплетается. Образовавшиеся полинуклеотиды (с молекулярной массой, равной половине молекулярной массы исходной двуспиральной ДНК) также имеют клубкообразную форму [20, 21].

Процесс плавления наблюдают различными методами, но наибольшее распространение получил метод измерения поглощения раствора. При переходе спираль-клубок происходит резкое увеличение поглощения ДНК – гиперхромный эффект (рис. 12).

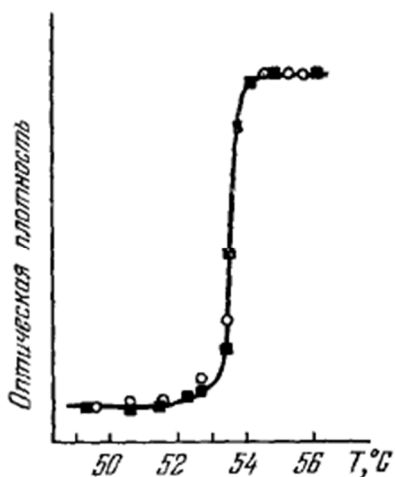


Рис. 12. Кривая плавления гомополинуклеотида [20]

Основными характеристиками кривой плавления являются температура плавления  $T_{пл}$  и ширина интервала плавления  $\Delta T$ .  $T_{пл}$  соответствует точка перегиба кривой, а  $\Delta T$  определяется как разность температур, при которых  $\theta=0$  и  $\theta=1$ , где  $\theta$  – степень спиральности – доля звеньев, находящихся в спиральном состоянии [20, 21].

Температура плавления ДНК сильно зависит от концентрации соли в растворе, в котором находятся молекулы, и, как видно из рис. 13, линейно зависит от количества ГЦ-пар [20].

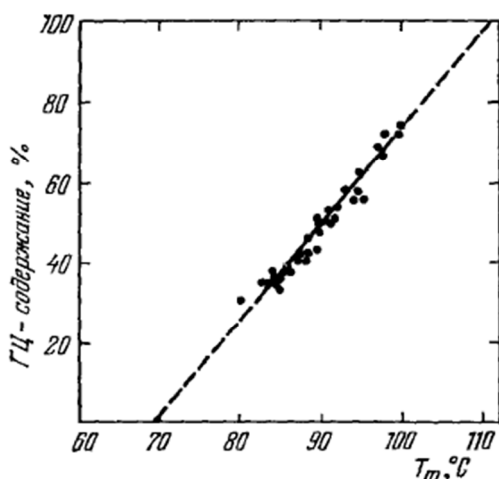


Рис. 13. Зависимость количества ГЦ-пар от температуры плавления [20]

Следовательно, зная концентрацию раствора и его температуру плавления  $T_{пл}$ , можно найти концентрацию ГЦ-пар по следующей формуле:

$$T_{пл} = 176 - (2,6 - x_0)(36 - 7,04 \lg[Na^+]),$$

где  $x_0 = (Г+Ц)/(А+Т+Г+Ц)$  – концентрация ГЦ-пар,  $[Na^+]$  – концентрация ионов натрия в растворе. Данная формула справедлива при нейтральном рН и малых концентрациях соли [21].

АТ- и ГЦ-пары имеют разные температуры плавления ( $T_{ГЦ} = 107$  °С,  $T_{АТ} = 67$  °С) [20, 21]. Поэтому их процентное содержание в цепи влияет на температуру плавления всей молекулы. Этот факт необходимо учитывать при рассмотрении плавления реальной ДНК, содержащей как АТ-, так и ГЦ-пары. Причём необходимо учитывать не только процентное содержание пар, но и их взаимное расположение (см. рис. 14).

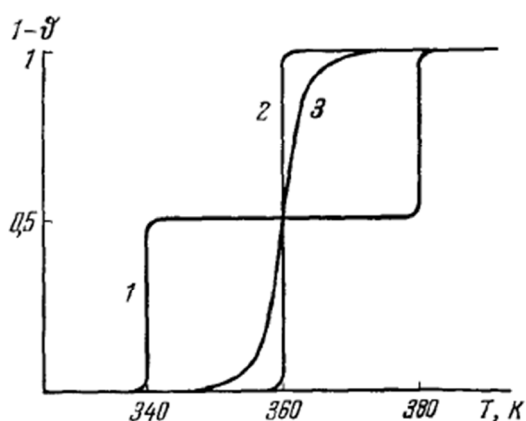


Рис. 14. Гипотетические кривые плавления молекул ДНК, состоящих на 50% из ГЦ-пар:

- 1 – одну половину молекулы составляют АТ-пары, вторую – ГЦ-пары;
- 2 – строгое чередование АТ- и ГЦ-пар;
- 3 – случайная последовательность пар оснований [20]

Если в цепи присутствуют большие участки АТ- и ГЦ-звеньев, то сначала будут плавиться АТ-, а затем – ГЦ-участки (1). При чередовании АТ- и ГЦ-пар температура плавления рассчитывается как среднее температур плавления АТ- и ГЦ-звеньев. При строгом чередовании пар оснований должен наблюдаться резкий переход спираль-клубок (2), но в природной молекуле ДНК последовательность АТ- и ГЦ-пар случайна (3), и переход происходит в некотором интервале температур  $\Delta T$ .

Связывание низкомолекулярных лигандов (красителей, антибиотиков, ионов металлов) с молекулой ДНК влияет на структуру макромолекулы и сказывается на величине температуры плавления и форме кривой плавления [20]. В работе [22] было рассмотрено плавление молекулы ДНК, связанной с красителем YO-PRO. Было обнаружено, что увеличение концентрации красителя приводит к повышению температуры плавления. По мнению авторов, это связано с тремя физическими явлениями. Во-первых, в результате интеркаляции ароматических колец красителя между парами оснований ДНК усиливаются стэкинг-взаимодействия. Во-вторых,



положительно заряженные молекулы красителя экранируют отрицательно заряженные фосфатные группы ДНК. В-третьих, в результате удлинения спирали ДНК, вызванного интеркаляцией красителя, происходит уменьшение плотности заряда молекулы ДНК [22].

В данной работе измерения проводили на приборе Specord 200 plus с приставкой Пельтье. Использовали кварцевые кюветы толщиной 1 см. В экспериментах измерялось оптическое поглощение раствора ДНК в максимуме спектра  $D_{260}$  в зависимости от температуры. Скорость нагрева составляла  $2^\circ/\text{мин}$  для ДНК и комплекса Zn8 с ДНК. Концентрация ДНК составляла  $2,7 \cdot 10^{-5}$  М. Для точного определения температуры плавления  $T_{пл}$  полученные зависимости  $D_{260}(T)$  дифференцировали по  $T$  и значение  $T_{пл}$  определяли по положению максимума на кривой  $dD_{260}(T)/dT$ .

### 3. Флуоресценция

Флуоресценция – физический внутримолекулярный процесс, при котором молекула переходит из возбужденного состояния в основное с испусканием кванта света. Явление флуоресценции иллюстрирует диаграмма Яблонского (рис. 15).

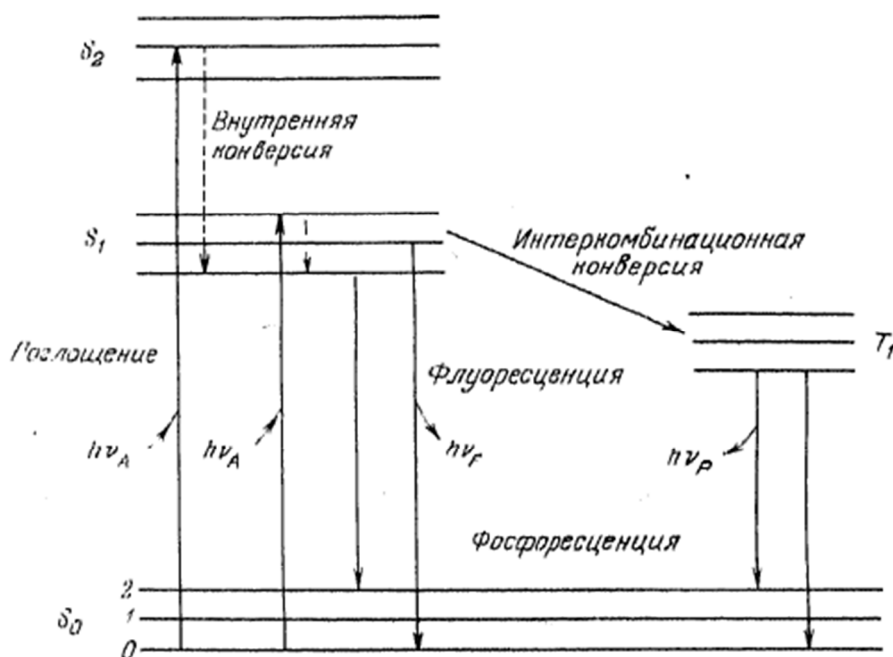


Рис. 15. Диаграмма Яблонского.  $S_0$ ,  $S_1$  и  $S_2$  – основное, первое и второе состояния, каждое из которых состоит из нескольких энергетических уровней (0, 1, 2 и т. д.) [23]

После поглощения света у большинства флуорофоров происходит внутренняя конверсия – быстрая релаксация ( $\sim 10^{-12}$  с) на нижний колебательный уровень первого возбужденного состояния  $S_1$ . При переходе из состояния  $S_1$  в основное состояние  $S_0$  наблюдается

флуоресценция. Молекулы, находящиеся в состоянии  $S_1$ , могут релаксировать в первое триплетное состояние  $T_1$  (интеркомбинационная конверсия), испускание из которого сдвинуто в сторону меньших частот по сравнению с флуоресценцией [23].

Основными характеристиками флуоресценции являются спектры испускания и возбуждения, а также квантовый выход и время жизни [24]. Спектр испускания – зависимость интенсивности испускания от длины волны, при этом длина волны возбуждающего света фиксирована. Спектр возбуждения – зависимость интенсивности испускания от длины волны возбуждения при определённой длине волны из спектра испускания [23]. Спектры флуоресценции подчиняются правилам Стокса и Левшина. Согласно правилу Стокса, энергия кванта флуоресценции меньше энергии кванта возбуждающего света, поэтому спектры сдвинуты в длинноволновую область по сравнению с длинноволновой полосой поглощения. Граница между спектрами испускания и поглощения – частота  $\nu_0$  – соответствует разности энергий между нулевыми колебательными подуровнями основного и первого возбужденного электронных состояний:  $E_0 = h\nu_0$ . Правило Левшина означает зеркальную симметрию спектров испускания и поглощения относительно частоты электронного перехода. Оно выполняется в тех случаях, когда структуры колебательных подуровней основного и первого возбужденного электронных состояний сходны [23, 24].

Квантовый выход флуоресценции, определяющийся отношением количества высвеченных квантов к поглощённым, является постоянной величиной, не зависящей от длины волны облучающего света. Этот факт позволяет определять спектры поглощения по спектрам возбуждения для систем, сильно рассеивающих свет. Время жизни возбуждённого состояния определяется вероятностью излучательного перехода [24].

В данной работе все измерения флуоресценции проводились на спектрофлуориметре Lumina. Источником излучения служила ксеноновая лампа мощностью 150 Вт. Такая лампа обеспечивает непрерывный спектральный выход в широком диапазоне длин волн (190-900 нм). Абсолютная погрешность прибора составляет 0,5 нм.

## 4. Материалы

В данной работе использовали ДНК тимуса теленка фирмы Sigma молекулярной массы  $M=9$  MDa. Препарат ДНК растворяли в бидистиллированной воде, с добавлением соли NaCl, ионная сила во всех исследуемых растворах составляла 0.003 M.

В данной работе изучали два новых комплексных соединения Zn(II) с производными 1,10-фенантролина: бис-(1,10-фенантролин)-(1,10-фенантроцианин)-дицинк(II) ацетат (условное

обозначение Zn7) и его предшественник – бис-(1,10-фенантролин)-цинка(II) ацетат (условное обозначение Zn8) (рис. 16). Данные металлокомплексы были предоставлены д.х.н. В.Н.Демидовым. Концентрации исходных растворов соединений:  $C_{исх}(Zn7)=10^{-2}$  М,  $C_{исх}(Zn8)=4,7 \cdot 10^{-2}$  М. Соединение Zn7 изначально было растворено в уксусной кислоте, поэтому содержит ацетат. Для того чтобы исследовать взаимодействие Zn7 с ДНК при нейтральных pH, к раствору Zn7 добавляли раствор  $4 \cdot 10^{-4}$  М NaOH, добиваясь нейтрального значения  $pH=6,0 \pm 0,1$ . При взаимодействии NaOH с ацетатом  $CH_3COOH$  образовывался ацетатный буфер. Внесенное при этом количество ионов  $Na^+$  было пренебрежимо мало по сравнению с ионной силой раствора ДНК.

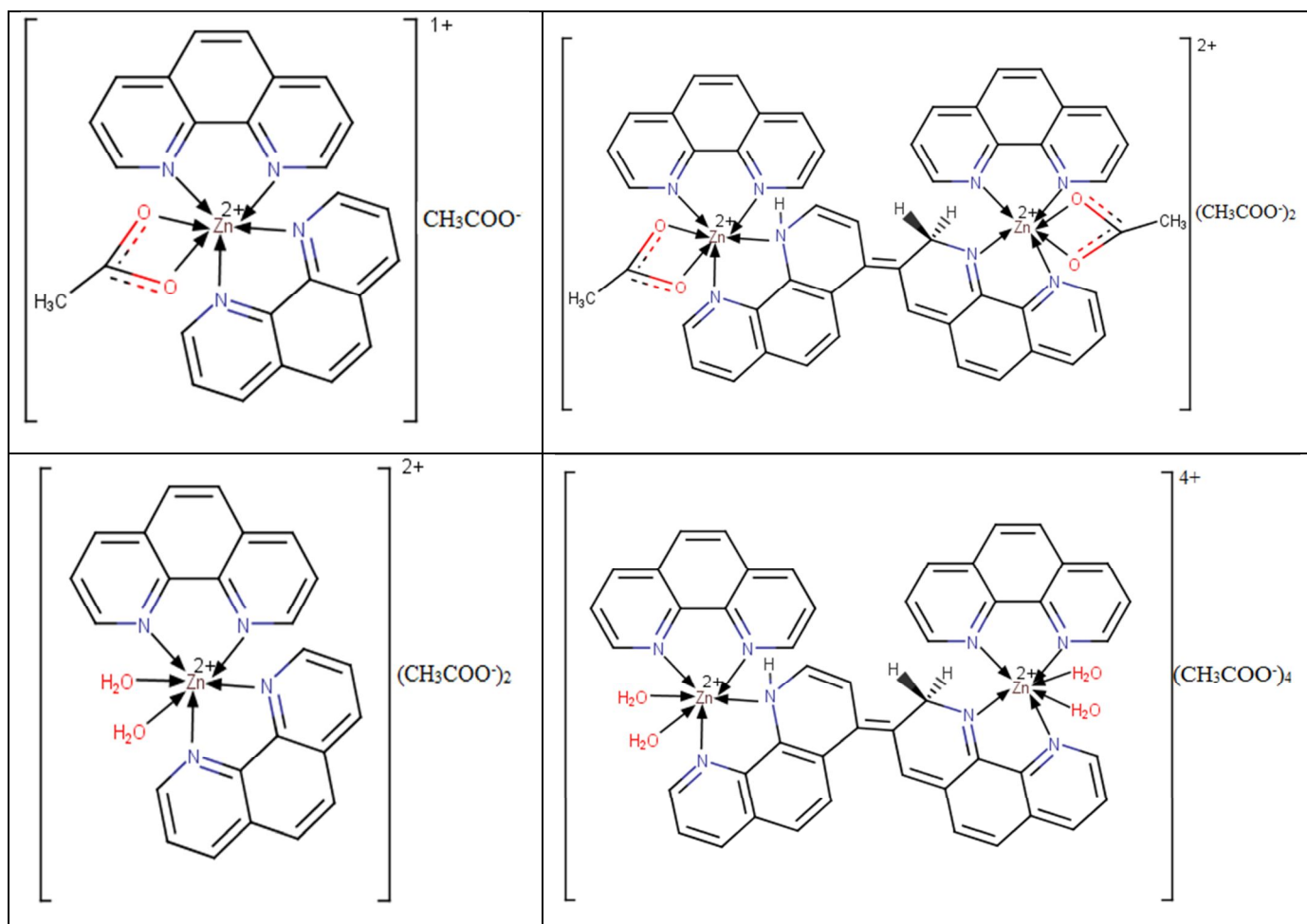


Рис. 16. Соединения Zn(II) с производными 1,10-фенантролина: в твердом состоянии – сверху, в водном растворе – внизу. Слева – Zn8, справа – Zn7.

Zn7 представляет собой аморфное вещество красно-бурого цвета, Zn8 – бесцветное вещество. В твердом состоянии в состав комплексов во внутренней координационной сфере входит 1 ацетат-ион в Zn8 и 2 ацетат-иона в Zn7, которые при растворении соединений замещаются молекулами воды.

### III. Результаты и обсуждение

На рис. 17 представлены спектры поглощения Zn8 при различных концентрациях, которые имеют максимумы при  $\lambda=225$  нм,  $\lambda=270$  нм,  $\lambda=292$  нм и длинноволновое плечо при  $300 \text{ нм} < \lambda < 350 \text{ нм}$ . На рис. 18 показаны спектры поглощения Zn7 при различных концентрациях. Эти спектры имеют два максимума: при  $\lambda = 227$  нм и  $\lambda = 271$  нм. Кроме того, в диапазоне  $\lambda = 290 \div 450$  нм наблюдается два длинноволновых плеча, обусловленные наличием неразрешенных полос.

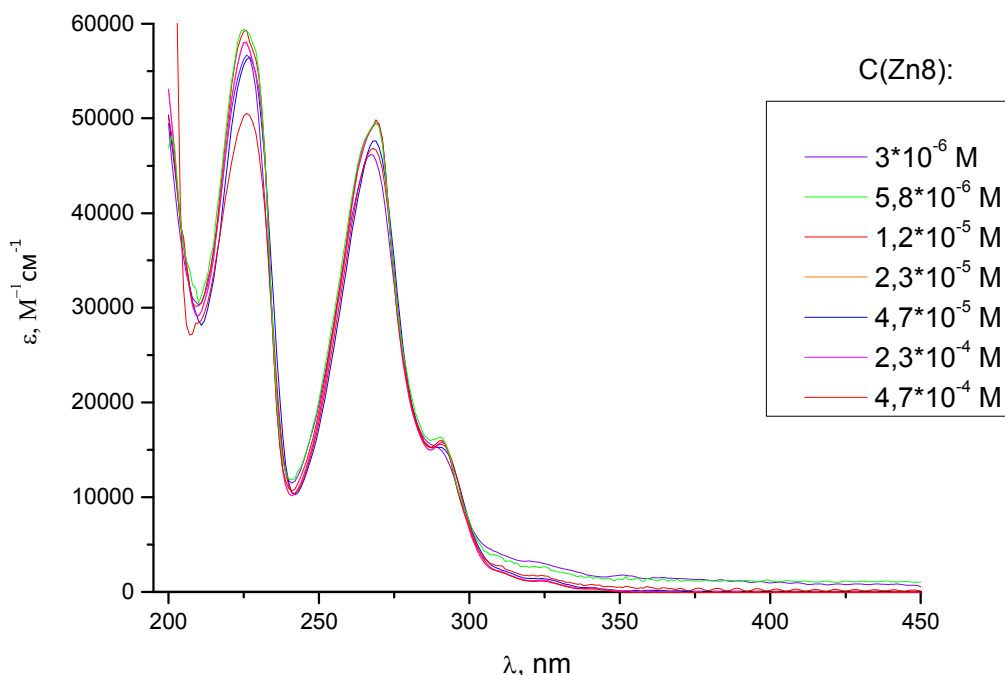


Рис. 17. Спектры поглощения Zn8 при различных концентрациях.

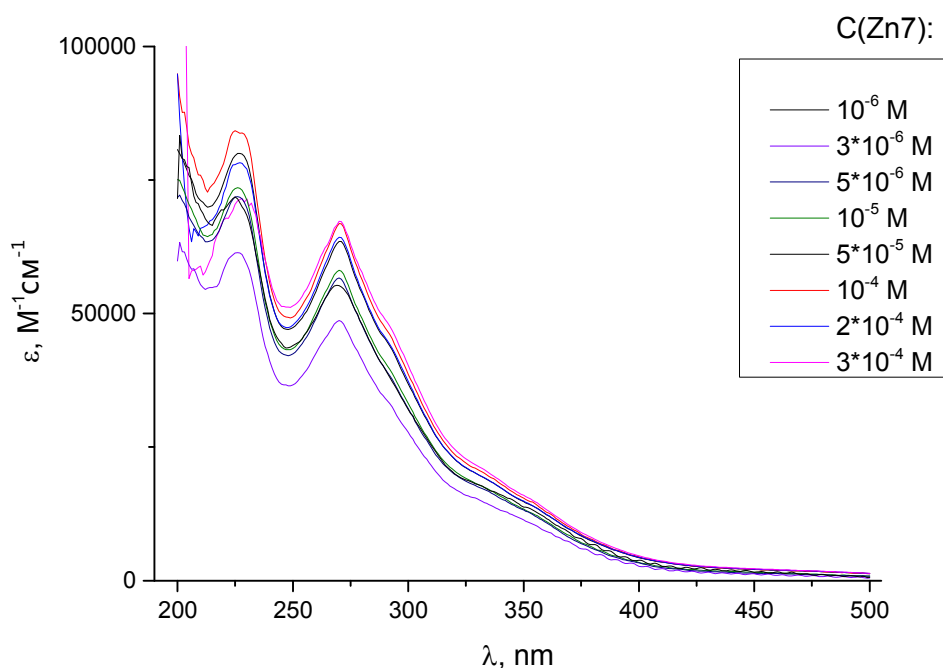


Рис. 18. Спектры поглощения Zn7 при различных концентрациях.

В предыдущем исследовании [25] было обнаружено, что некоторые соединения на основе Zn(II) и фталоцианиновых производных образуют ассоциаты в растворе. Поэтому для полученных спектров Zn7 и Zn8 была проведена проверка закона Бугера-Ламберта-Бэра, результаты которой приведены на рис. 19-20.

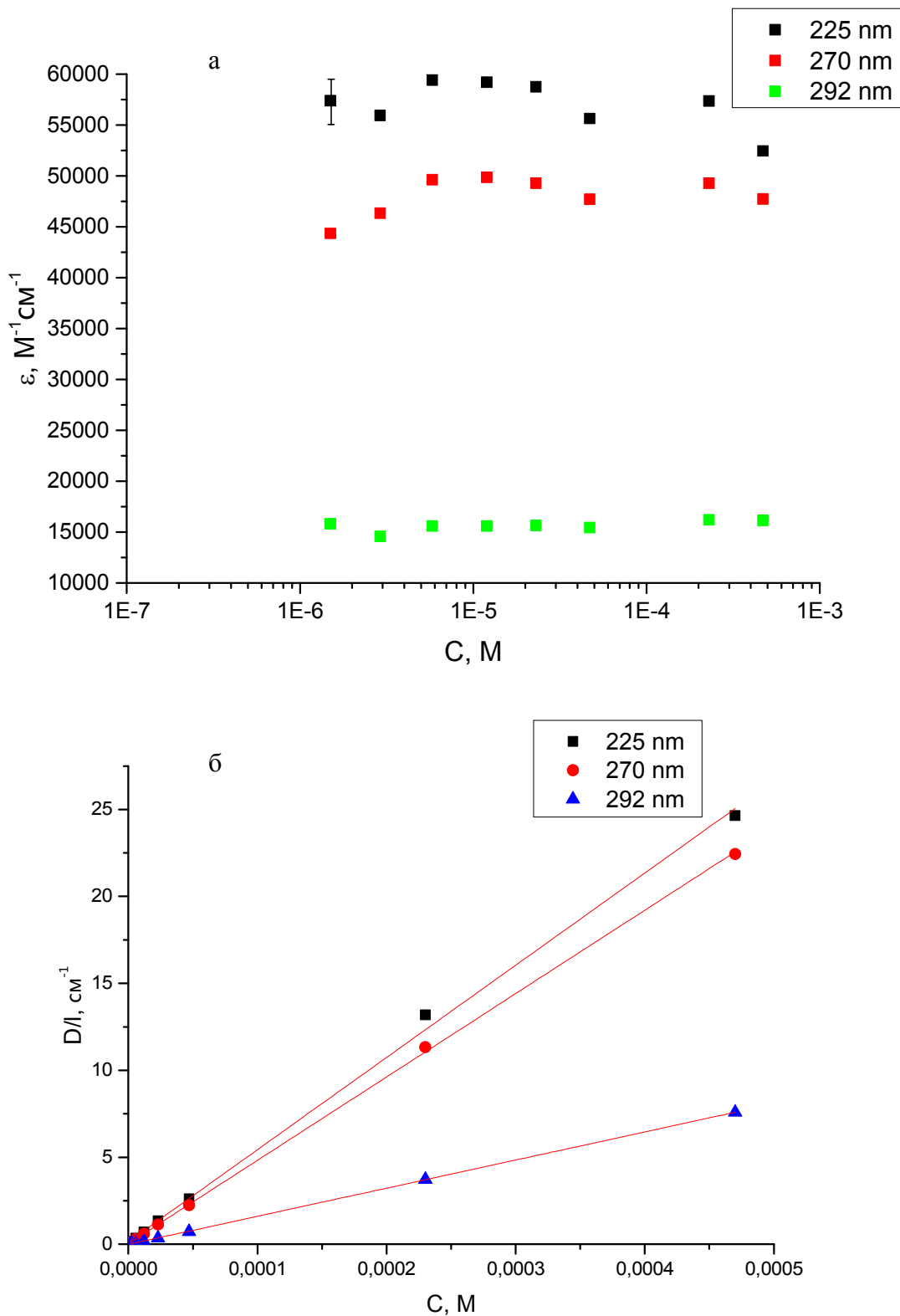


Рис. 19. Зависимости молярного коэффициента экстинкции Zn8 (а) и оптической плотности (б) от концентрации на разных длинах волн.

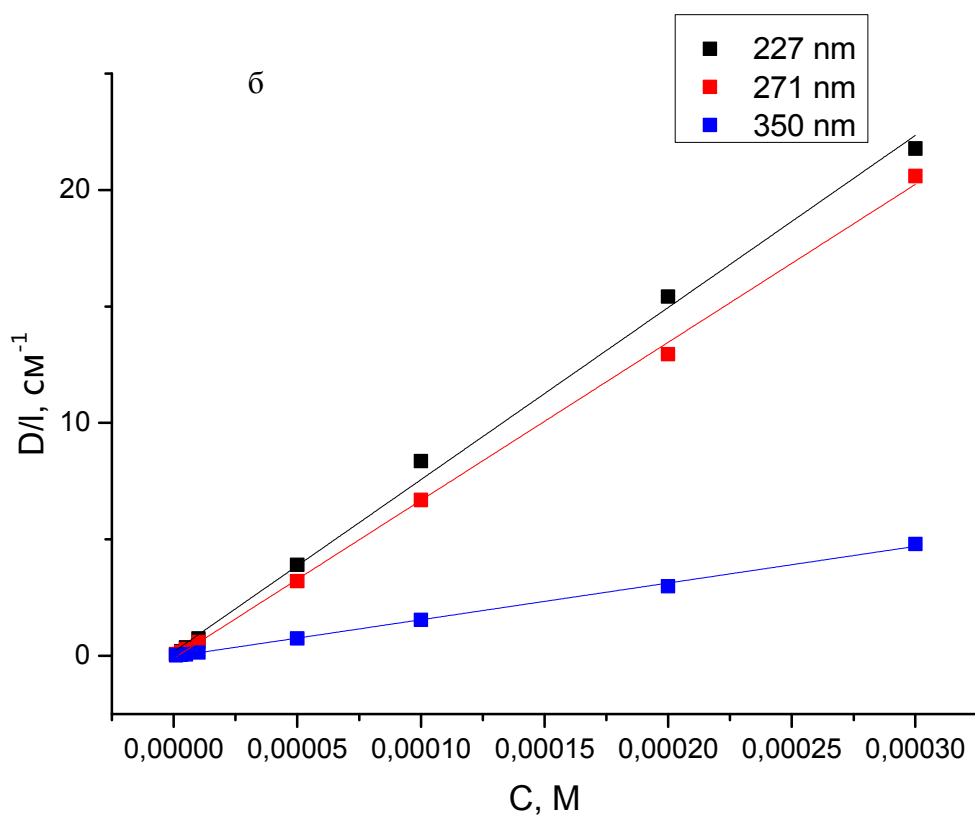
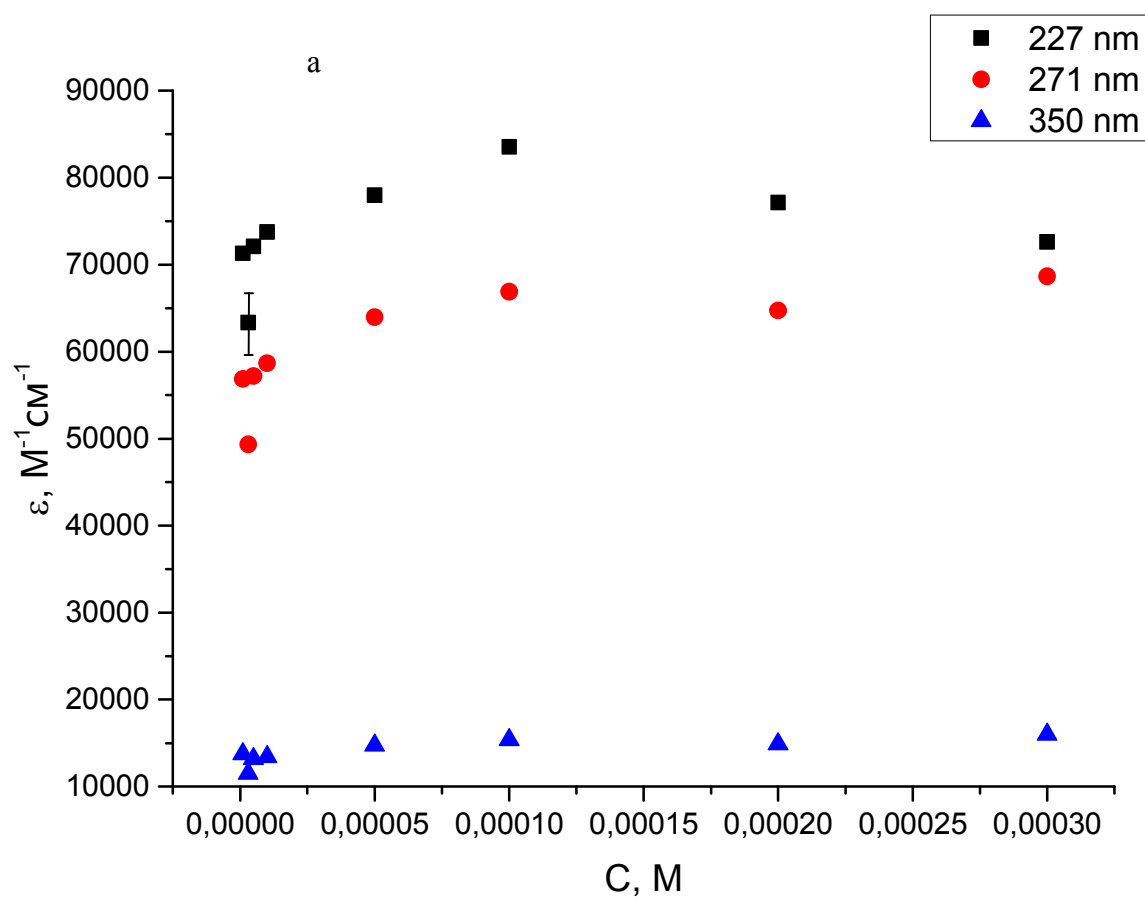


Рис. 20. Зависимости молярного коэффициента экстинкции Zn7 (а) и оптической плотности (б) от концентрации на разных длинах волн.

Как видно из рис. 19, 20, отклонений от закона Бугера-Ламберта-Бэра в растворах Zn8 практически не наблюдается, в отличие от Zn7. Как видно из рис. 20, при малых концентрациях растворов Zn7 ( $C < 10^{-4}$  М) происходят существенные отклонения от закона Бугера-Ламберта-Бэра. Для максимумов спектров поглощения при малых концентрациях молярный коэффициент экстинкции растёт. При больших концентрациях молярный коэффициент экстинкции можно считать постоянным на длине волны 271 нм, но при  $\lambda = 227$  нм он снижается, что говорит об изменении формы спектра. Отклонения от закона Бугера-Ламберта-Бэра свидетельствуют об ассоциации молекул Zn7 в растворе, хотя, следует отметить, что она не столь ярко выражена, как для аналогичных фталоцианиновых комплексов Zn(II) [25]. Возникающая в растворах Zn7 ассоциация не приводит к появлению рассеяния (т.е. не наблюдается рост оптической плотности растворов вдали от полосы поглощения).

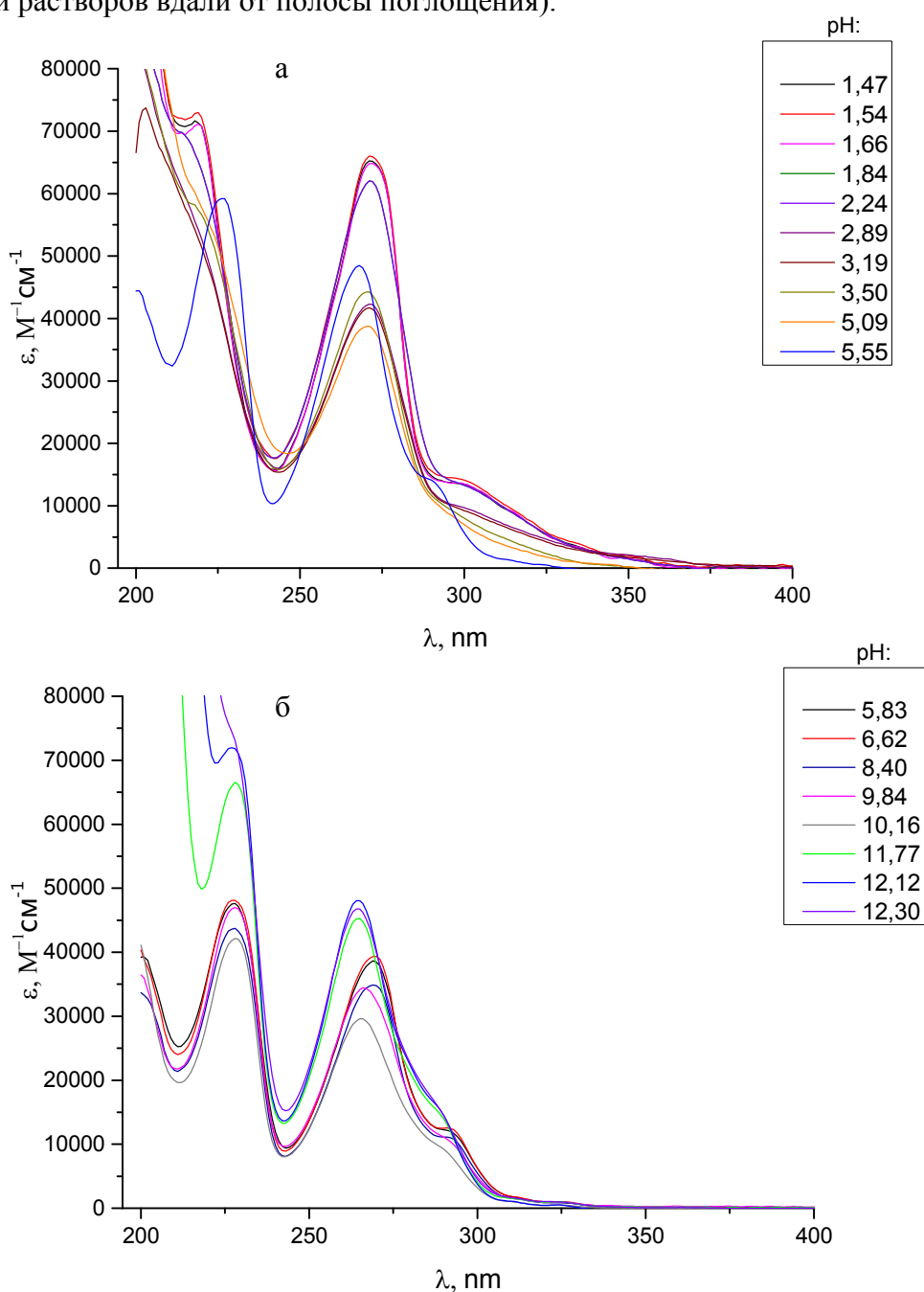


Рис. 21. Спектры поглощения Zn8 при кислых (а) и щелочных (б) значениях pH.

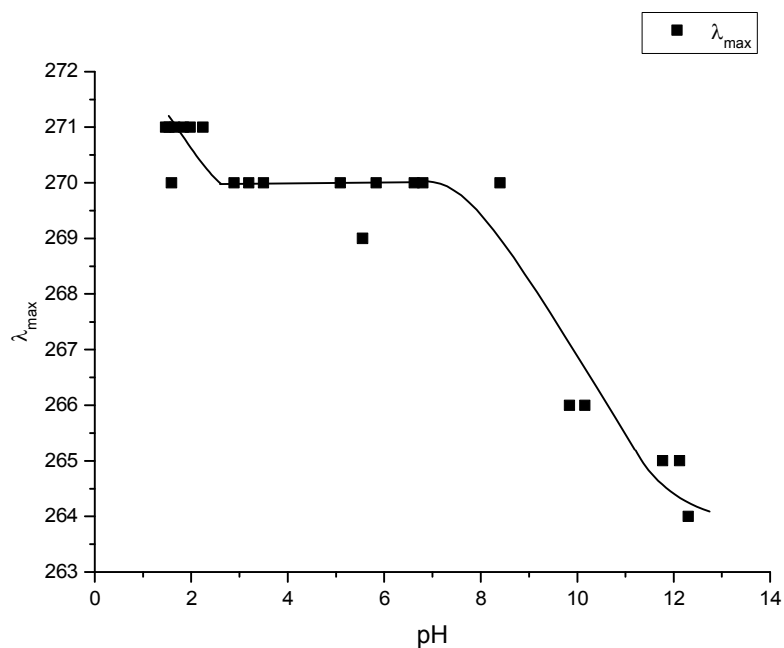


Рис. 22. Зависимость положения максимума Zn8 от pH.

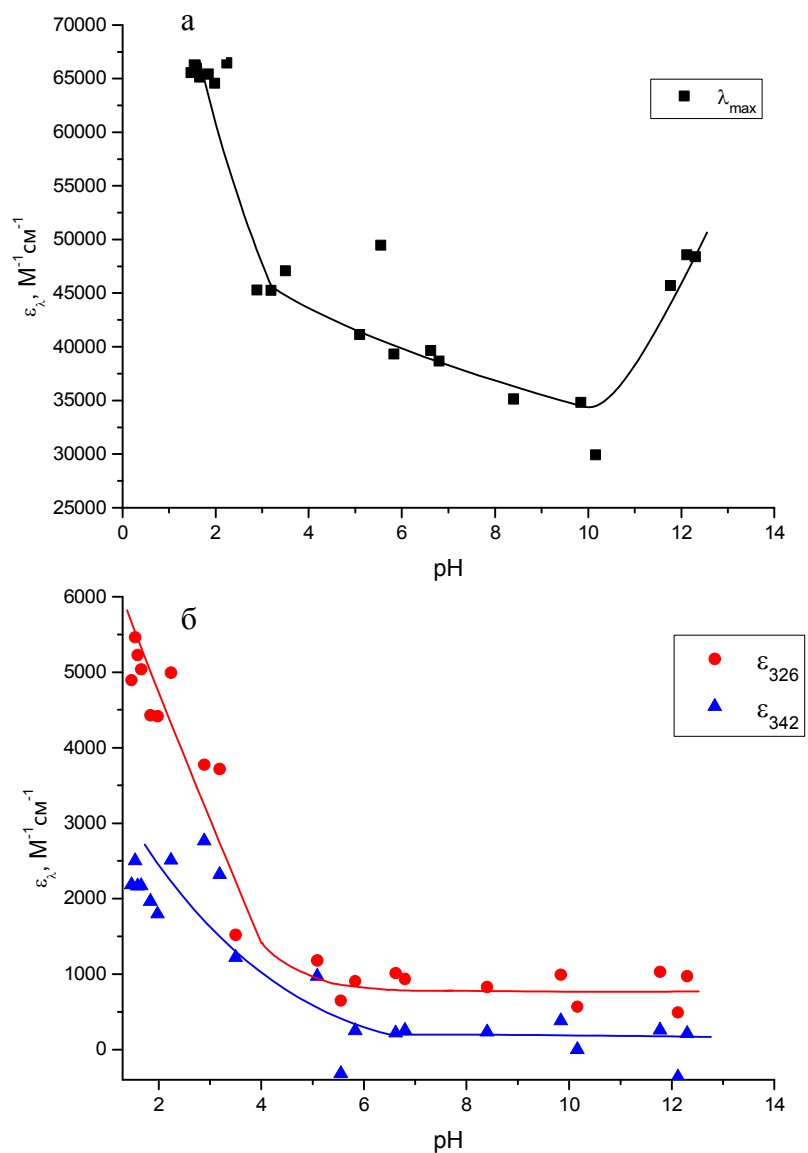


Рис. 23. Зависимость молярного коэффициента экстинкции Zn8 от pH в максимуме в окрестности 270 нм (а) и при разных длинах волн (б).



Спектры поглощения исследуемых металлокомплексов весьма чувствительны к значению pH раствора. На рис.21 (а) показаны спектры поглощения Zn8 при кислых значениях pH, на рис.21 (б) – при щелочных значениях pH. На рис.22, 23 суммированы спектральные изменения Zn8 при варьировании pH: изменение положения максимума в окрестности 270 нм и изменение коэффициентов экстинкции при разных длинах волн. При pH=4–8 спектральные свойства меняются незначительно, что может свидетельствовать о том, что степень ионизации вещества существенно не меняется. При снижении pH от 3 до 1,5 наблюдаются сдвиг полосы поглощения фенантролина в длинноволновую область (с 270 нм до 271 нм), рост оптической плотности на этой полосе, а также в длинноволновой области. Это может быть связано с диссоциацией одной из молекул фенантролина из металлокомплекса и ее протонированием. При повышении pH от 8 до 12 наблюдаются резкое смещение максимума в коротковолновую область (с 270 нм до 264 нм) и увеличение оптической плотности в максимуме. При этом оптическая плотность в длинноволновой области остается постоянной в пределах допустимой погрешности. Можно предположить, что эти спектральные изменения вызваны тем, что молекулы воды в составе металлокомплекса замещаются ионами OH<sup>-</sup>.

На рис.24 (а) представлены спектры поглощения Zn7 при кислых значениях pH, на рис.24 (б) – при щелочных значениях pH. По полученным спектрам были проанализированы спектральные изменения Zn7 при варьировании pH: смещение максимума в окрестности 271 нм и изменение коэффициентов экстинкции при разных длинах волн (см. рис. 25, 26). При pH=3–6 спектральные свойства практически не меняются, что может быть связано с постоянством степени ионизации соединения. При pH=6–8 полоса поглощения фенантролина не сдвигается, в то время как коэффициент экстинкции в максимуме и в длинноволновой области значительно понижается. При повышении pH от 8 до 12 наблюдаются значительный сдвиг максимума в коротковолновую область (с 271 нм до 267 нм) и резкий рост коэффициента экстинкции как в максимуме поглощения, так и в длинноволновой части спектра. Это может быть связано с замещением молекул воды в составе металлокомплекса на ионы OH<sup>-</sup>. При снижении pH от 3 до 1 наблюдаются резкое смещение максимума в длинноволновую область (с 271 нм до 278 нм), рост коэффициента экстинкции в максимуме и в длинноволновой части спектра. Можно предположить, что подобные спектральные изменения могут проявиться в результате диссоциации двух молекул фенантролина из металлокомплекса и их протонирования.

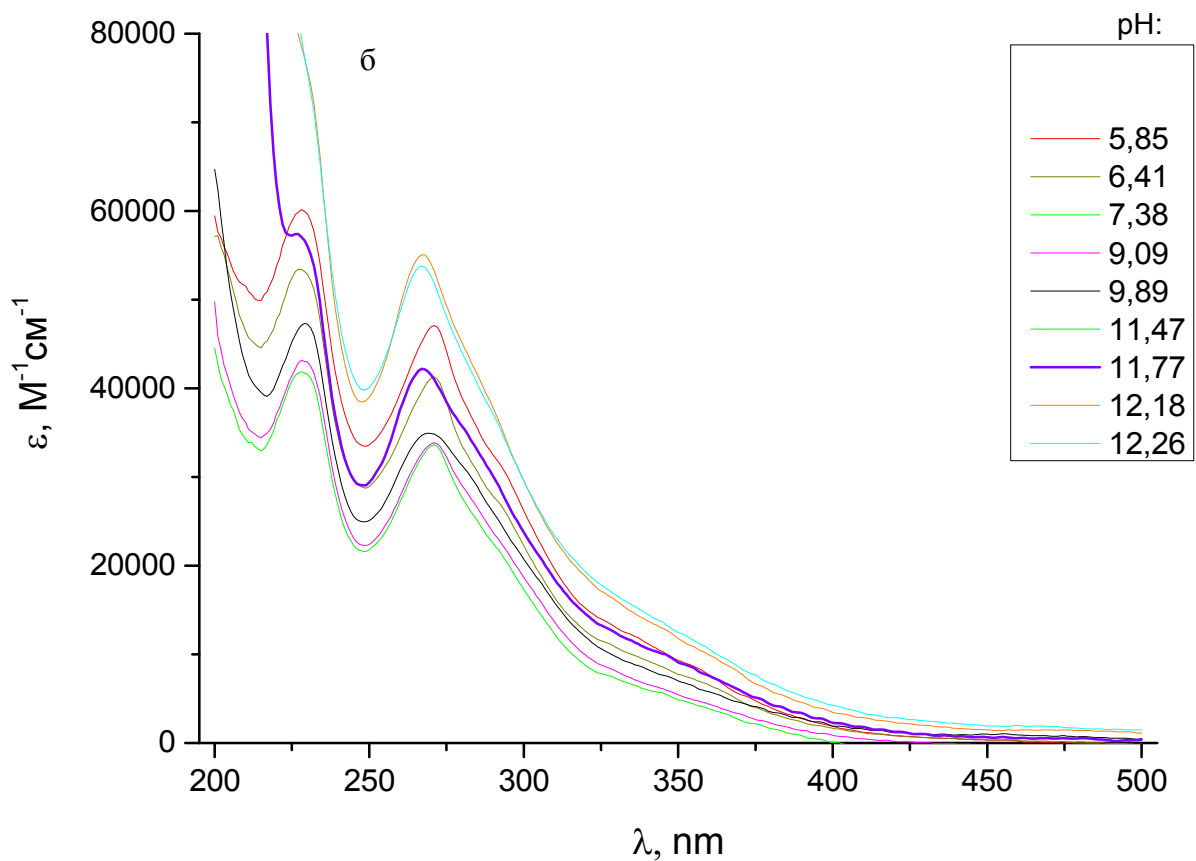
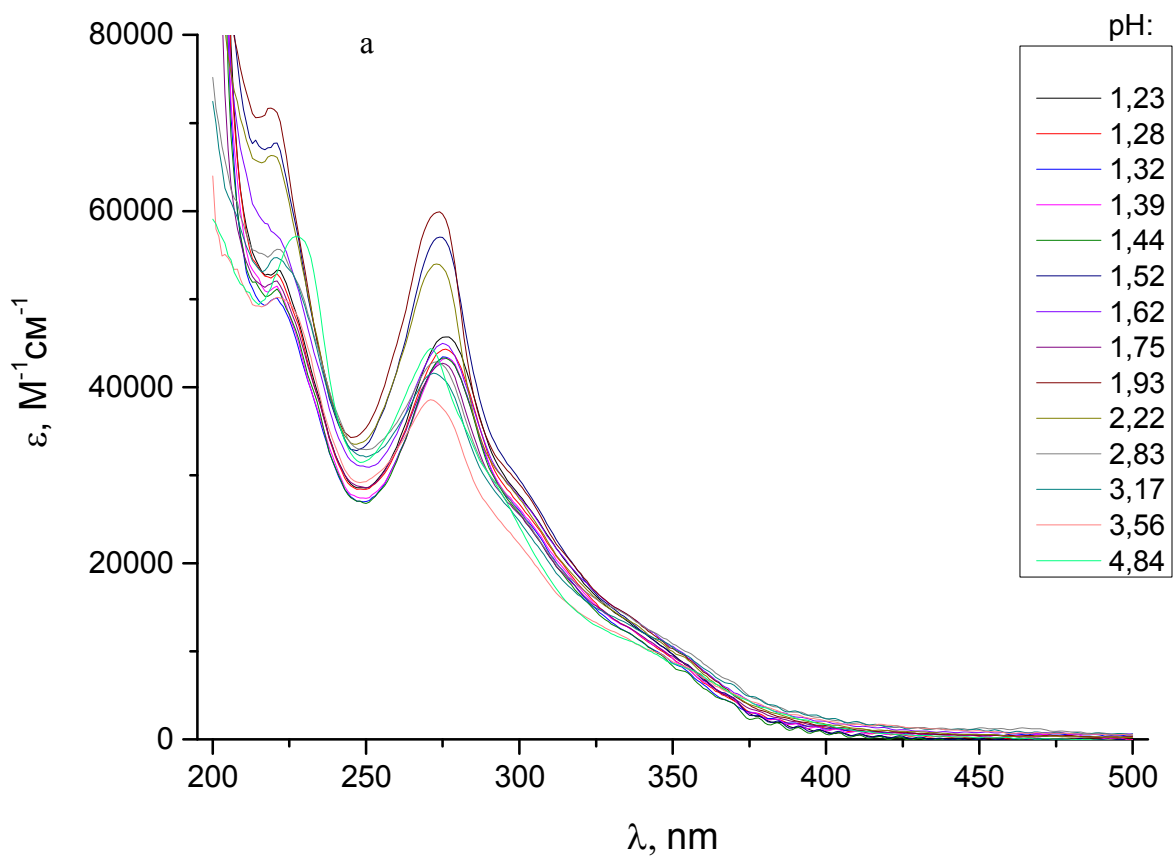


Рис. 24. Спектры поглощения Zn7 при кислых (а) и щелочных (б) значениях pH.

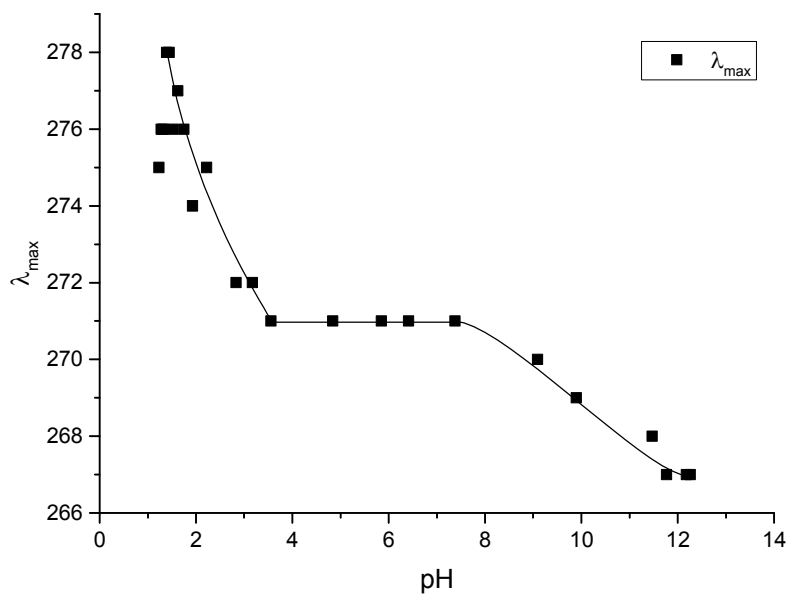


Рис. 25. Зависимость положения максимума Zn7 от pH.

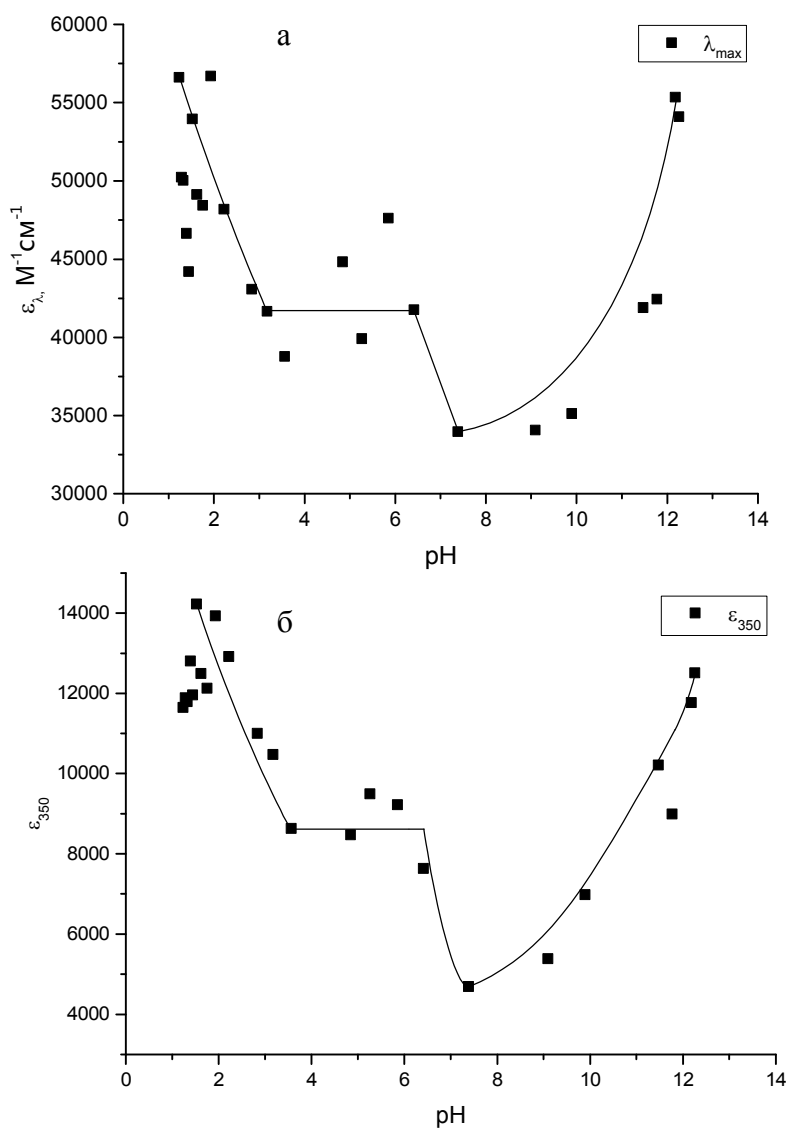


Рис. 26. Зависимость молярного коэффициента экстинкции Zn7 от pH в максимуме в окрестности 270 нм (а) и в длинноволновой части спектра при λ=350 нм (б).

Высказанные предположения о причинах наблюдаемых изменений в спектрах поглощения металлокомплексов при варьировании pH подтверждаются данными о спектральных свойствах фенантролина при разных pH (рис. 27). В кислой области наблюдается сдвиг УФ-полосы в длинноволновую область и рост поглощения, аналогичные наблюдаемым для Zn8 и Zn7, что свидетельствует о том, что и в случае металлокомплексов спектральные изменения обусловлены именно ионизацией фенантролина. В случае же щелочных pH поведение металлокомплексов и фенантролина существенно различаются: в спектре фенантролина не наблюдается гипсохромный сдвиг УФ-полосы. Это свидетельствует о том, что в щелочной области происходит значительное изменение структуры металлокомплекса (его внутренней координационной сферы).

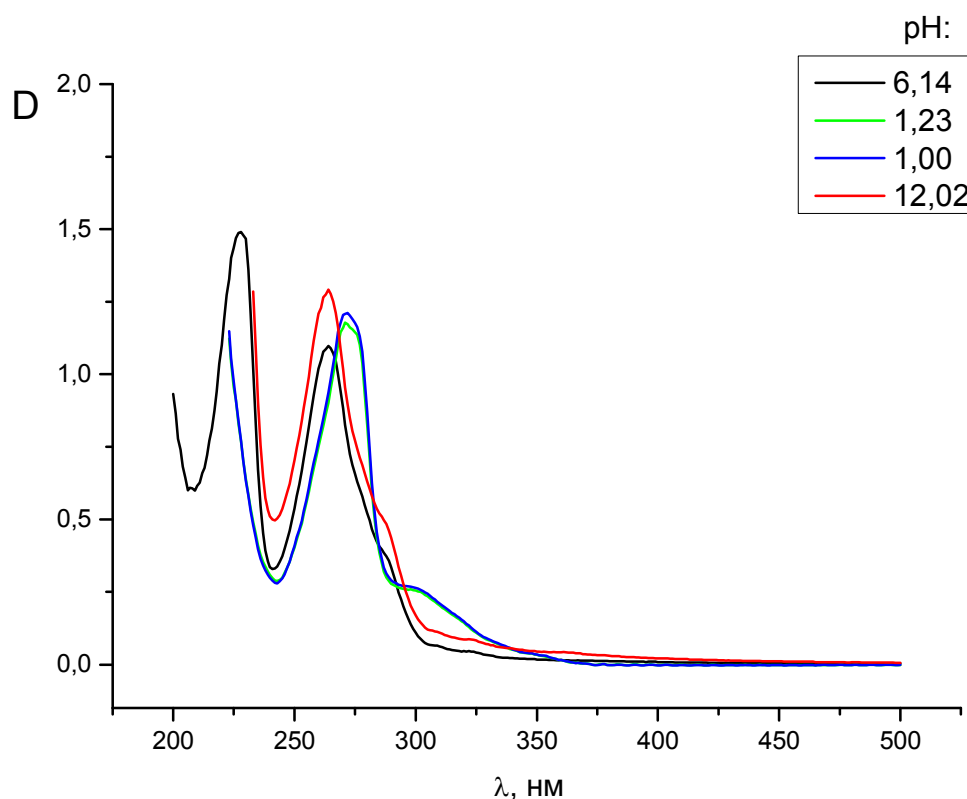


Рис. 27. Спектры поглощения фенантролина при разных pH раствора.

В предыдущем исследовании [25] было показано, что некоторые соединения на основе Zn(II) и фталоцианиновых производных в растворе нестабильны, что, по-видимому, связано с изменением характера самоассоциации молекул металлокомплексов. Поэтому в данной работе была проведена проверка стабильности растворов Zn7 при различных pH, результаты которой представлены на рис. 28.

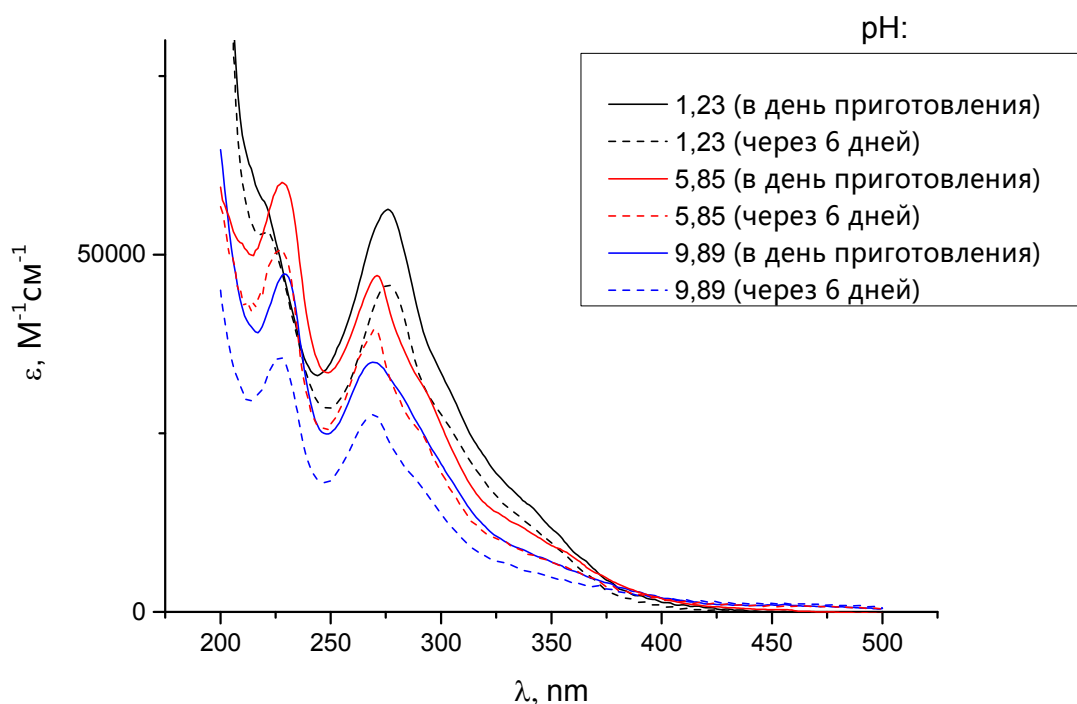


Рис. 28. Спектры поглощения Zn7 при различных pH в день приготовления и через 6 дней.

Как видно из рис. 28, спектры поглощения Zn7 значительно меняются со временем (снижается поглощение на всех длинах волн, однако осадок не образуется), что может свидетельствовать о том, что металлокомплексы в растворе претерпевают изменения с течением времени, или/и меняется характер самоассоциации молекул. При этом снижение поглощения с течением времени проявляется для всех значений pH. Следует отметить, что наблюдаемые изменения при нейтральном и щелочном значениях pH менее выражены, чем при кислом pH.

Металлокомплексы Zn7 и Zn8 являются флуорофорами. На рис. 29 показаны спектры флуоресценции этих соединений при нейтральном значении pH. Возбуждение проводилось на длине волны  $\lambda=270$  нм, соответствующей максимуму поглощения. Пики, полученные в спектрах возбуждения, наблюдались ранее в спектрах поглощения. В спектре возбуждения Zn8 видны максимумы при  $\lambda=270$  и 292 нм. В спектре возбуждения Zn7 наблюдаются максимумы при  $\lambda=270$  и 292 нм, а также можно заметить длинноволновое плечо при  $300 < \lambda < 350$  нм.

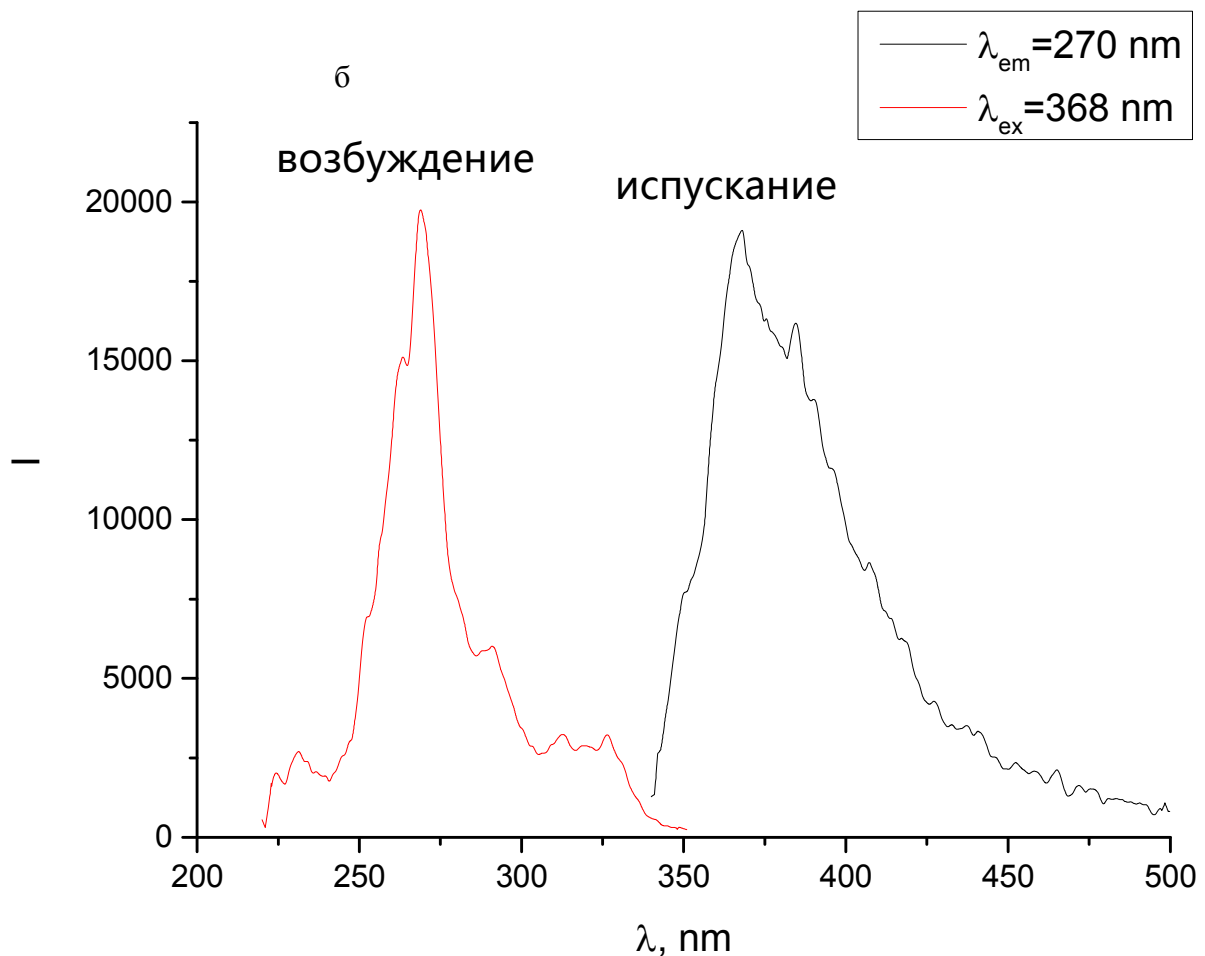
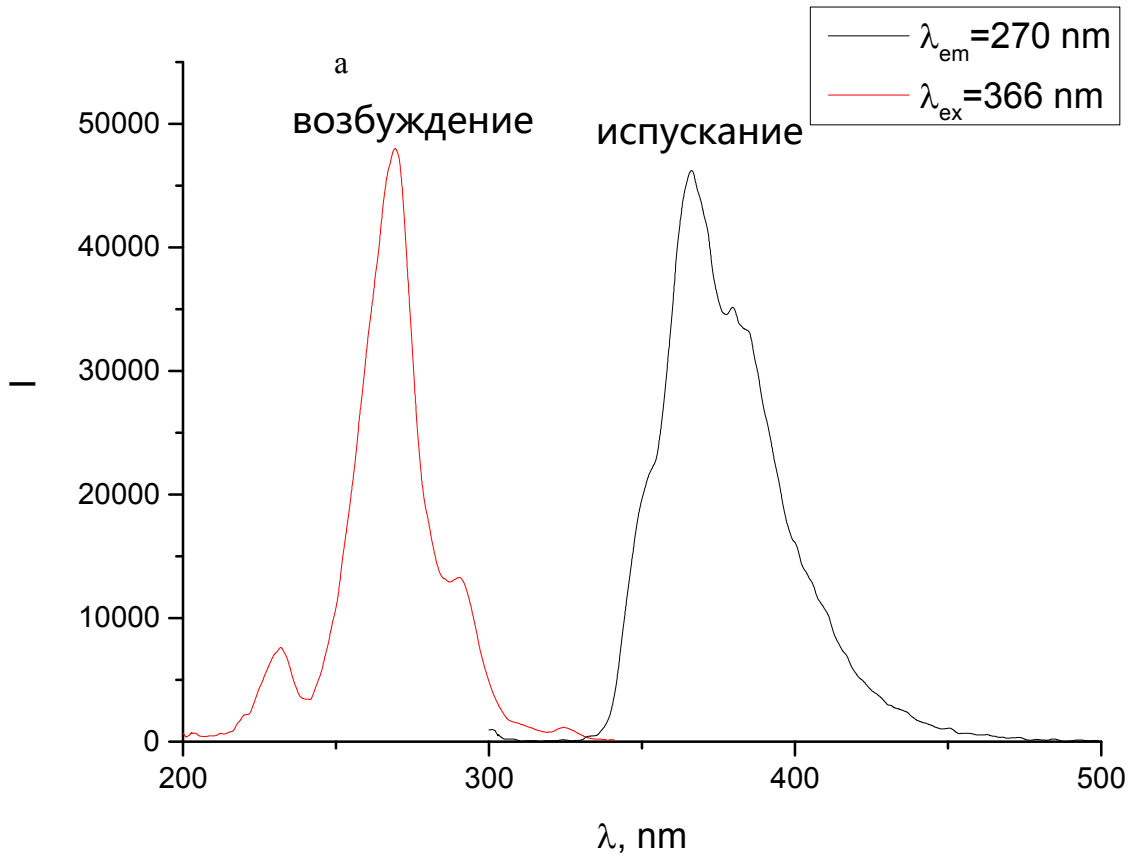


Рис. 29. Спектры флуоресценции Zn8 (а) и Zn7 (б).

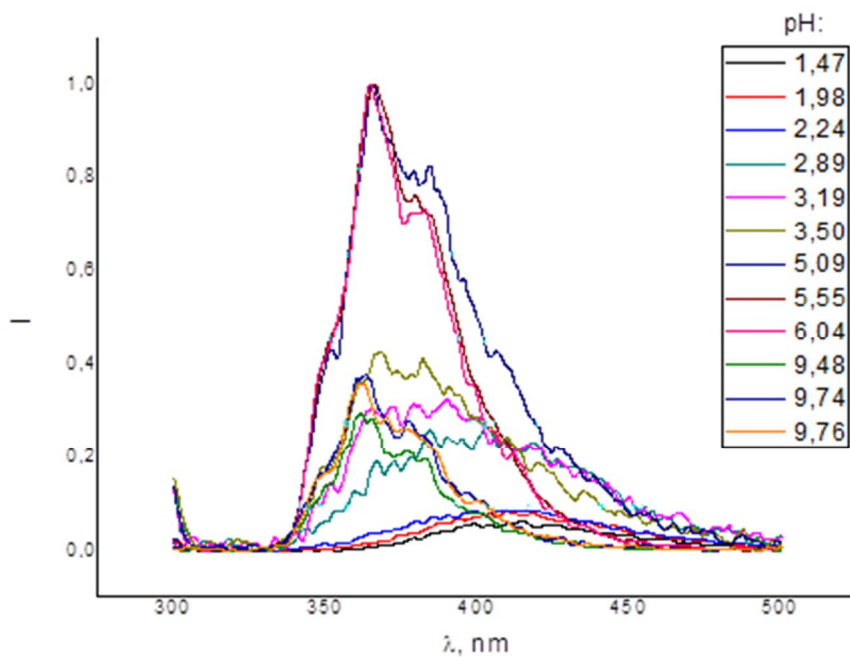


Рис. 30. Спектры испускания Zn8 при разных pH.

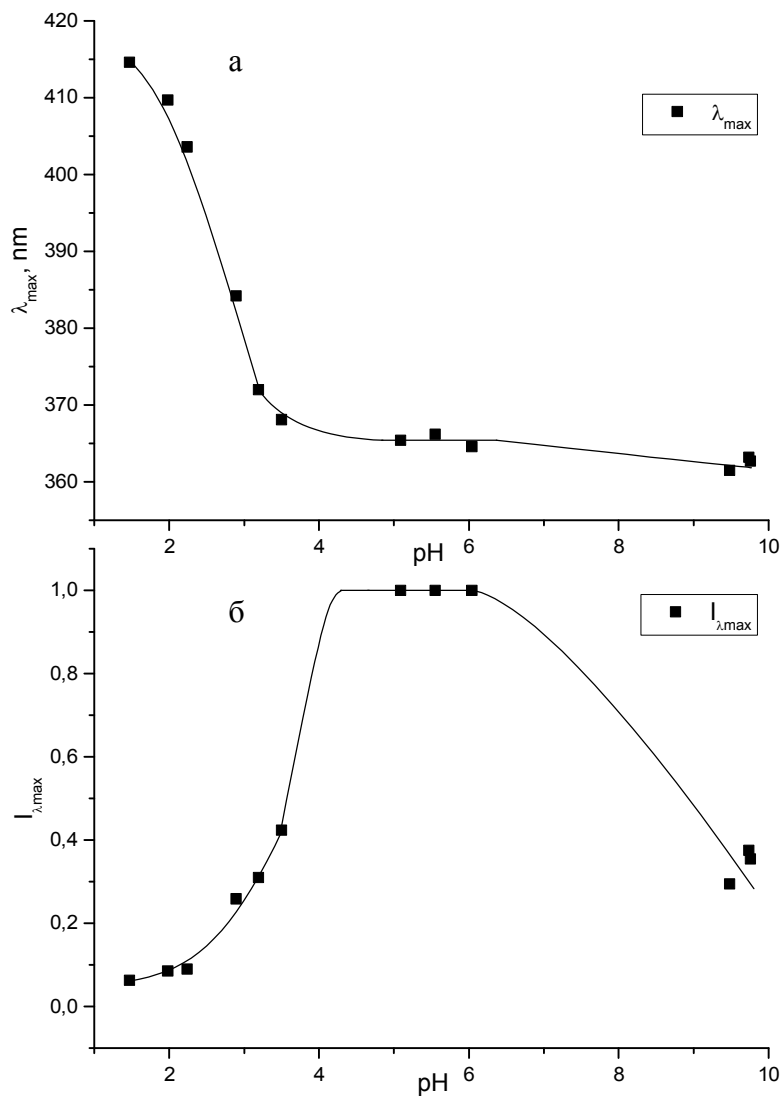


Рис. 31. Зависимости длины волны максимума испускания (а) и интенсивности испускания в максимуме (б) от pH.

Для Zn8 были рассмотрены спектры испускания при варьировании рН. На рис. 30 показаны нормированные спектры испускания Zn8, так как в ходе эксперимента менялись размеры щелей во флуориметре. Для анализа полученных спектров были построены зависимости длины волны максимума испускания и интенсивности испускания в максимуме от рН, приведенные на рис. 31. При рН=4–6 максимум и интенсивность испускания меняются незначительно, что может быть связано с тем, что степень ионизации соединения практически не меняется. При снижении рН от 4 до 1,5 наблюдается сдвиг максимума испускания в длинноволновую область (с 365 нм до 415 нм). При повышении рН от 6 до 10 можно заметить небольшое смещение максимума испускания в коротковолновую область (с 365 нм до 363 нм). При кислых (<4) и щелочных (>6) рН происходит тушение флуоресценции. В области кислых рН интенсивность испускания уменьшается приблизительно в 10 раз. Это может быть вызвано диссоциацией одной из молекул фенантролина из металлокомплекса и ее протонированием. В области щелочных рН интенсивность испускания уменьшается примерно в 3 раза. Как известно, любой заряженный лиганд способствует тушению флуоресценции. Поэтому наблюдаемые спектральные изменения могут свидетельствовать о том, что при недостатке протонов в области щелочных рН молекулы воды в составе металлокомплекса замещаются ионами ОН<sup>-</sup>. Зависимость флуоресцентных свойств соединения от рН – полезное свойство с точки зрения применения данного вещества для исследования микросреды в клетках и тканях.

Были проведены исследования взаимодействия Zn7 и Zn8 с ДНК в нейтральных растворах. Эти исследования проводились двумя способами. В первом эксперименте (рис. 32 – 33, 36 - 37). варьировалась концентрация металлокомплекса, а концентрация ДНК оставалась постоянной, анализировали спектры поглощения в коротковолновой области. В качестве растворителя был выбран раствор металлокомплекса такой же концентрации, что и в растворе с ДНК, и измерение спектра раствора ДНК с соединением проводилось против соответствующего растворителя. Таким образом, в эксперименте измерялось поглощение ДНК в комплексе. Затем, для более наглядного представления спектральных изменений при комплексообразовании, спектр ДНК также был вычтен. При отсутствии взаимодействия в результате получился бы 0. Во втором эксперименте (рис. 34 – 35, 38 – 39) – наоборот, при неизменной концентрации металлокомплекса варьировали концентрацию ДНК и анализировали длинноволновую часть спектра соединений вне полосы поглощения ДНК. Поглощение ДНК в этой области ( $\lambda > 300$  нм) исчезающе мало, тем не менее, оно было вычтено из полученных спектров. Таким образом, в длинноволновой области есть возможность наблюдать проявления взаимодействия с ДНК в спектре соединения. Значение  $r$  на приведенных рисунках равно отношению концентрации металлокомплекса к концентрации ДНК в парах оснований:  $r = \frac{[Zn]}{[ДНК_{bp}]}$ .



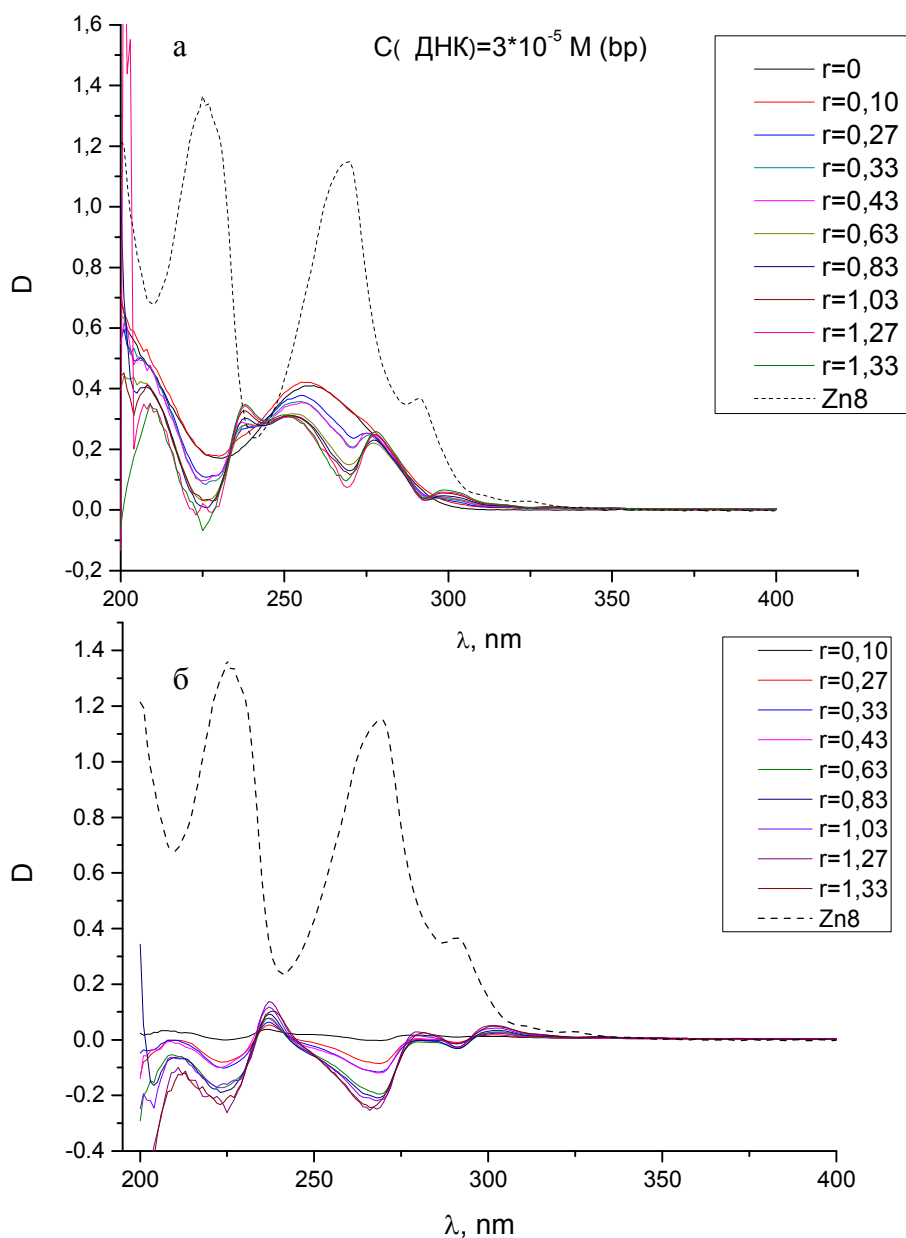


Рис. 32. Спектры поглощения ДНК в комплексе с Zn8 (а) и после вычитания спектра ДНК (б).

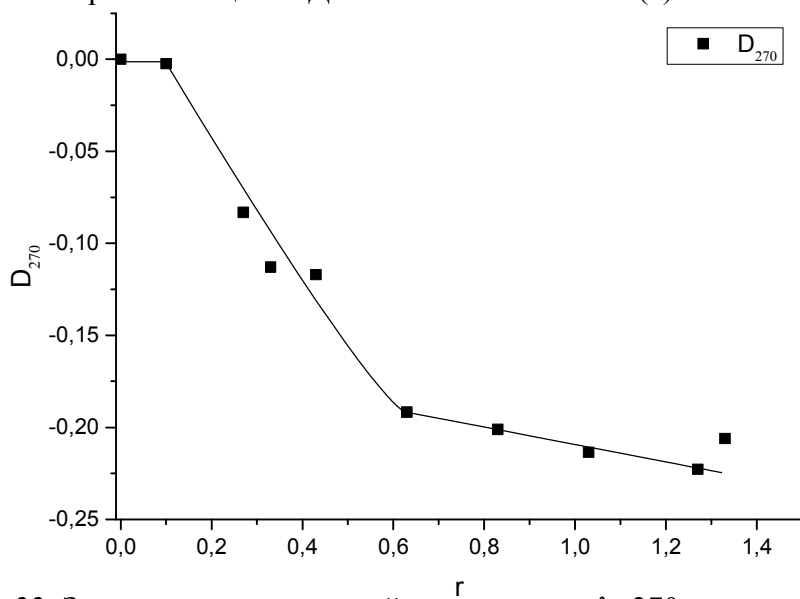


Рис. 33. Зависимость оптической плотности на  $\lambda=270$  нм от  $r$ , полученная из рис. 32 (б).

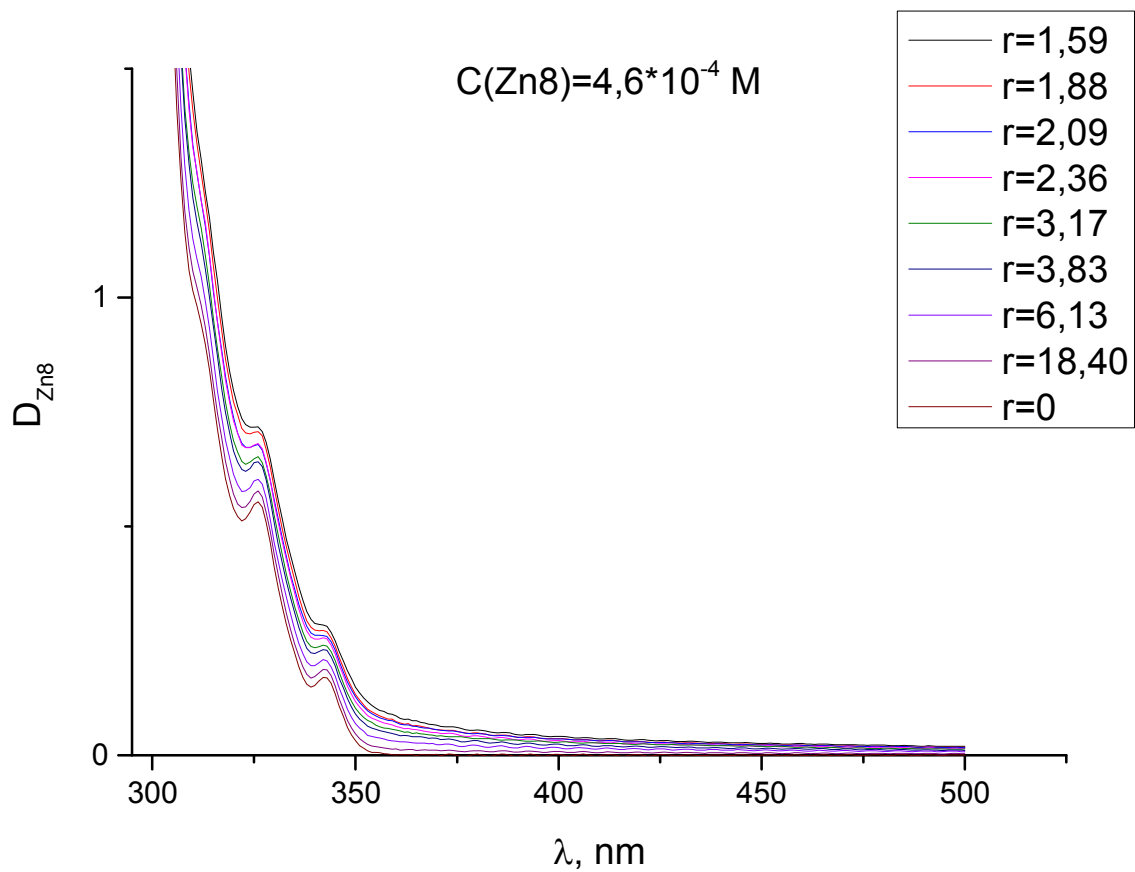


Рис. 34. Спектры поглощения Zn8 в комплексе с ДНК.

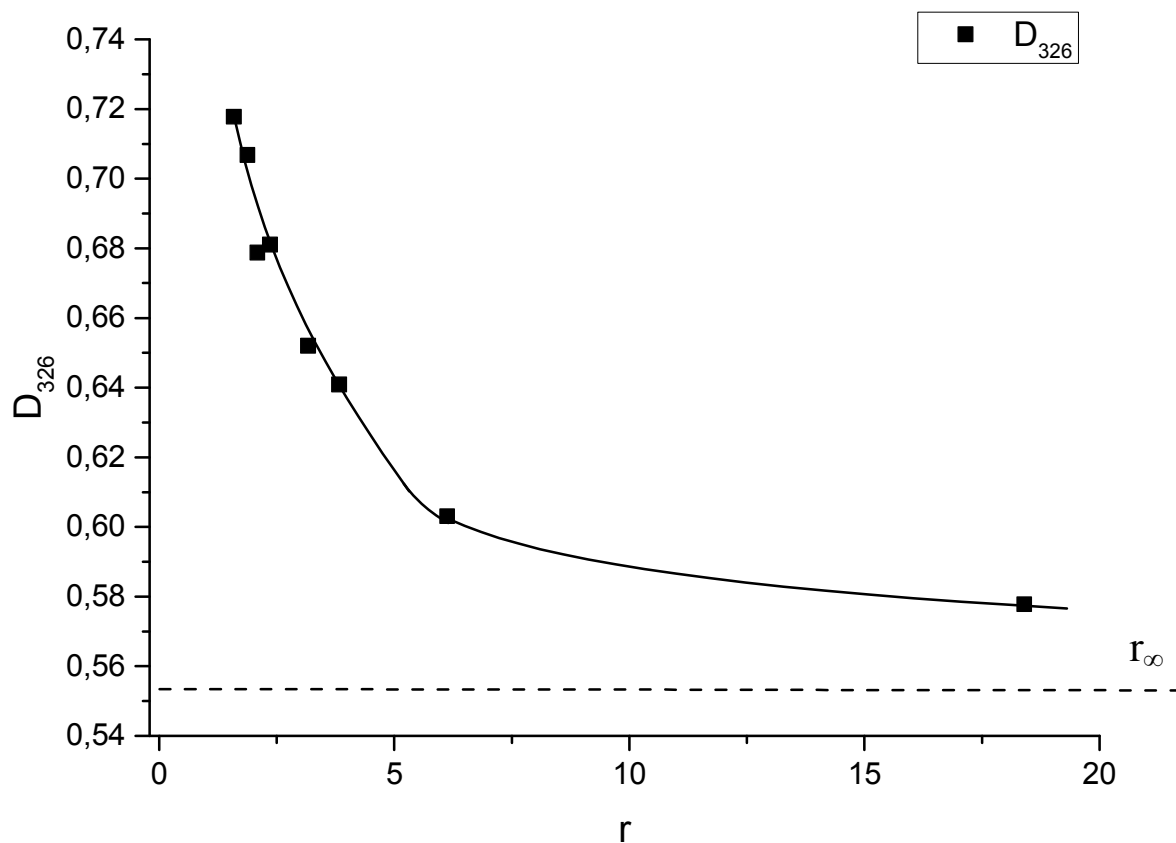


Рис. 35. Зависимость оптической плотности на  $\lambda=326$  нм от  $r$ , полученная из рис. 34.

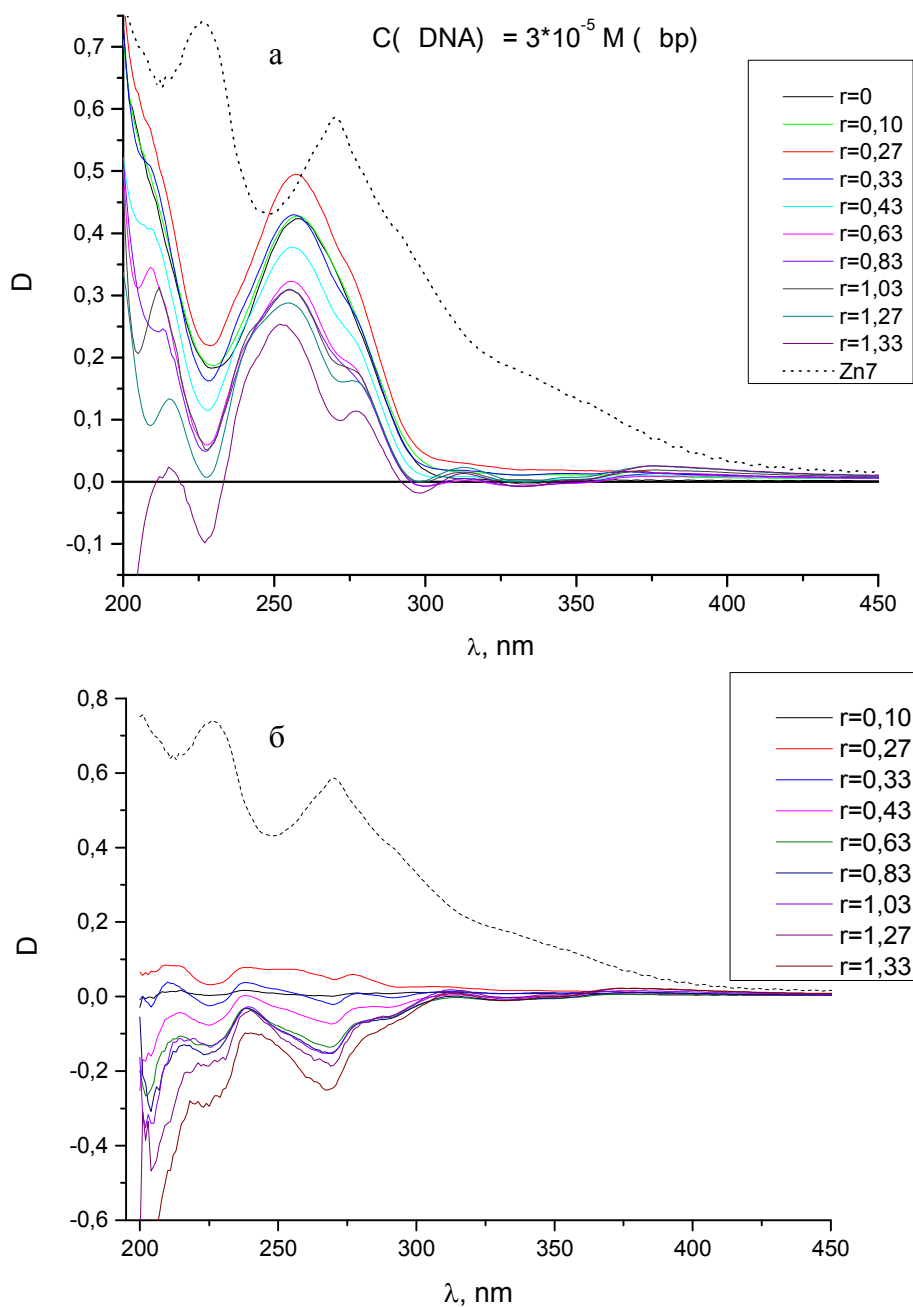


Рис. 36. Спектры поглощения ДНК в комплексе с Zn7 (а) и после вычитания спектра ДНК (б).

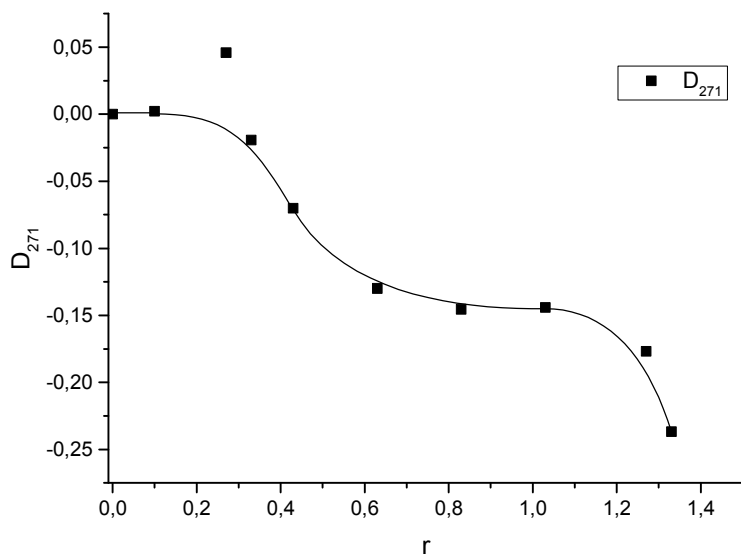


Рис. 37. Зависимость оптической плотности на  $\lambda=271$  нм от  $r$ , полученная из рис. 36 (б).

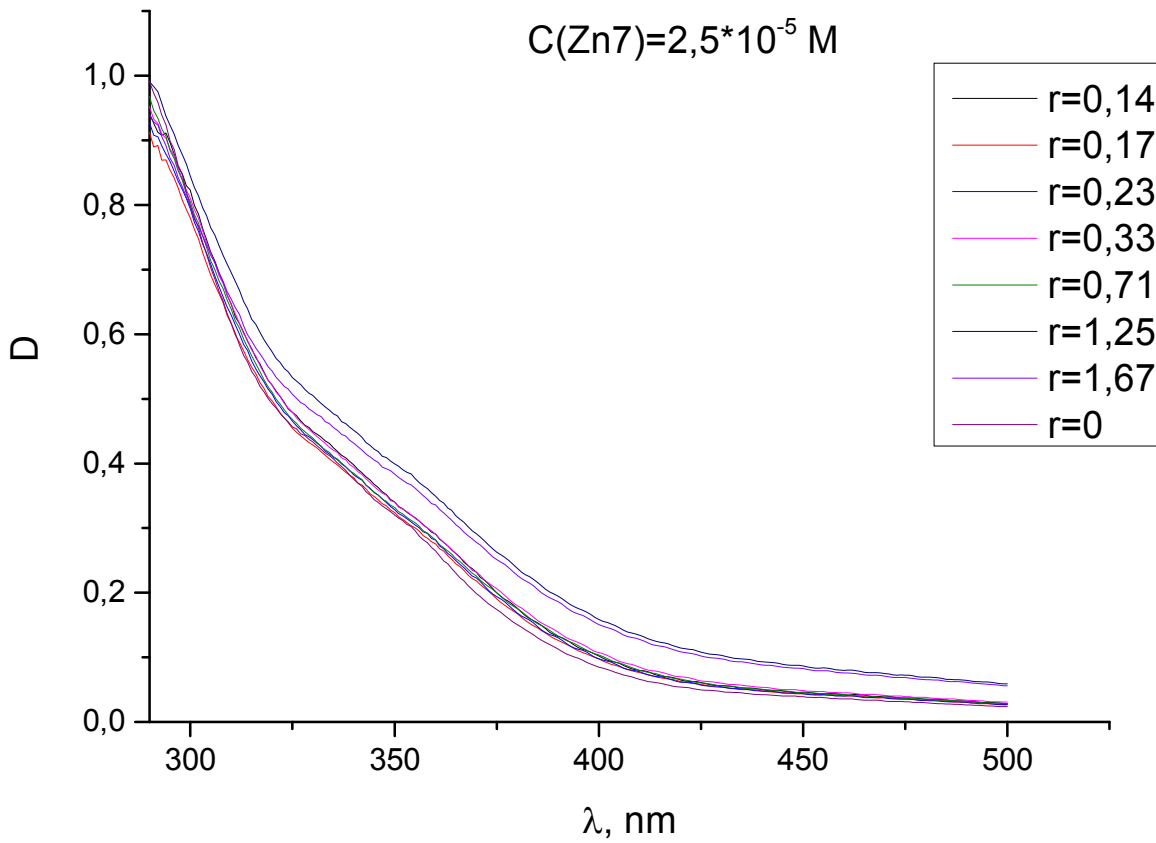


Рис. 38. Спектры поглощения Zn7 в комплексе с ДНК.

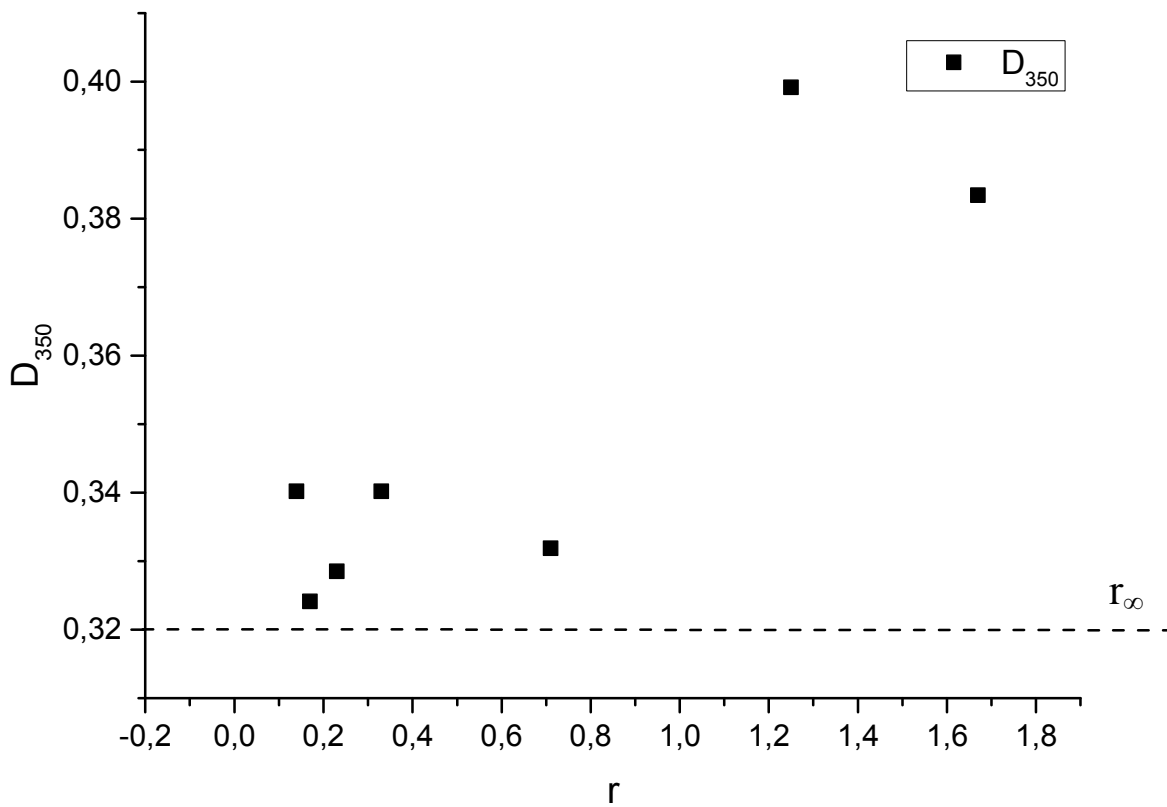


Рис. 39. Зависимость оптической плотности на  $\lambda=350 \text{ nm}$  от  $r$ , полученная из рис. 38.

Рассмотрим результаты исследования взаимодействия ДНК с Zn8. Следует отметить, что из-за перекрытия полос поглощения ДНК и Zn8 в этой спектральной области мы не можем учесть возможные изменения в спектре поглощения ДНК при комплексообразовании. Тем не менее, из рис.32 очевидно, что комплексообразование Zn8 с ДНК происходит: наблюдается ярко выраженный гипохромный эффект на полосах поглощения Zn8. Проанализируем изменение оптической плотности на наиболее четко измеримой полосе при  $\lambda=270$  нм (рис. 33). Видно, что с ростом  $\gamma$  гипохромный эффект монотонно растет, однако, при  $\gamma>0,6$  скорость его нарастания снижается, что может свидетельствовать либо о насыщении связывания, либо о наличии второго типа связывания. При исследовании спектров растворов ДНК с Zn8 в длинноволновой области (рис. 34, 35) при  $1,59<\gamma<18,54$  также наблюдается монотонное падение интенсивности поглощения с ростом  $\gamma$ . При больших  $\gamma$  наблюдается некоторое выполаживание зависимости  $D_{326}(\gamma)$ , однако насыщение не достигается.

Исследование растворов, содержащих Zn7 также однозначно показало наличие комплексообразования (рис. 36-39). На коротковолновых полосах в спектре Zn7 также наблюдается гипохромный эффект, причем зависимость этого эффекта от  $\gamma$  указывает на наличие более одного типа связывания (рис.37), а поглощение Zn7 в длинноволновой области растет с увеличением  $\gamma$  (в отличие от аналогичного эксперимента с Zn8).

Взаимодействие с ДНК приводит к тушению флуоресценции Zn8 и Zn7 (рис.40, 41). Это свидетельствует о переносе возбуждения с молекул металлокомплексов на ДНК. Этот эффект требует дополнительного изучения, он позволяет рассматривать возможность применения данных соединений для фотодинамической терапии.

Комплекс ДНК с Zn8 был исследован методом плавления. Само соединение Zn8 при нагревании до  $95^{\circ}\text{C}$  изменяет интенсивность поглощения на 260 нм незначительно (рис.42), однако при нагревании и последующем охлаждении в растворе Zn8 возникает рассеяние, что свидетельствует о возросшей агрегации молекул металлокомплекса. Спектры поглощения ДНК и комплекса ДНК с Zn8 в процессе плавления показаны на рис. 43. Видно, что после нагревания до  $95^{\circ}\text{C}$  (которое сопровождается гиперхромным эффектом) и последующего охлаждения до  $25^{\circ}\text{C}$  наблюдается частичная ренатурация ДНК, причем в комплексе с Zn8 – практически полная. Кроме того, в комплексе с ДНК не наблюдается выпадения Zn8 в осадок при нагревании. Кривые плавления ДНК и комплекса ДНК с Zn8, а также их первые производные показаны на рис. 44 – 45. Температура плавления ДНК  $T_{\text{пл}}=62^{\circ}\text{C}$  (что согласуется с литературными данными для тимусной ДНК при ионной силе 0.003М NaCl [20]), ДНК в комплексе с Zn8  $T_{\text{пл}}=75^{\circ}\text{C}$ . Таким образом, при комплексообразовании ДНК с Zn8 стабильность двойной спирали существенно увеличилась.

Из полученных данных однозначно следует, что происходит комплексообразование ДНК с изучаемыми соединениями. Это вполне ожидаемо, т.к. оба металлокомплекса заряжены

положительно: Zn8 имеет заряд 2+, Zn7 – заряд 4+. Для соединения Zn8 исследование проведено при  $0,1 < r < 18,4$ , для Zn7 при  $0,1 < r < 1,67$ , для обоих соединений насыщение связывания не зарегистрировано. Для однозначного вывода о типе связывания полученных результатов пока недостаточно, можно лишь высказать некоторые предварительные предположения, опираясь на аналогичные данные, имеющиеся в литературе [6, 9-17, 25, 26]. Можно предположить, что и для Zn8, и для Zn7 один из типов комплексообразования – интеркаляция. На это указывает гипохромный эффект на полосах поглощения соединений, а также сильное повышение температуры плавления ДНК в комплексе с Zn8. Известно, что фенантролиновый лиганд интеркалирует в двойную спираль ДНК [17]. Далее, отсутствие насыщения связывания при соотношении более, чем 1 молекула соединения на 1 пару оснований (а в случае Zn8 более 10 молекул соединения на пару оснований) может говорить о том, что при больших концентрациях осуществляется вторичное связывание молекул соединения с молекулами, уже связанными с ДНК, с образованием димеров (или n-меров) [26]. Для более определенных выводов о типе связывания исследуемых соединений с ДНК и их влиянии на конформацию макромолекулы требуются дополнительные исследования.

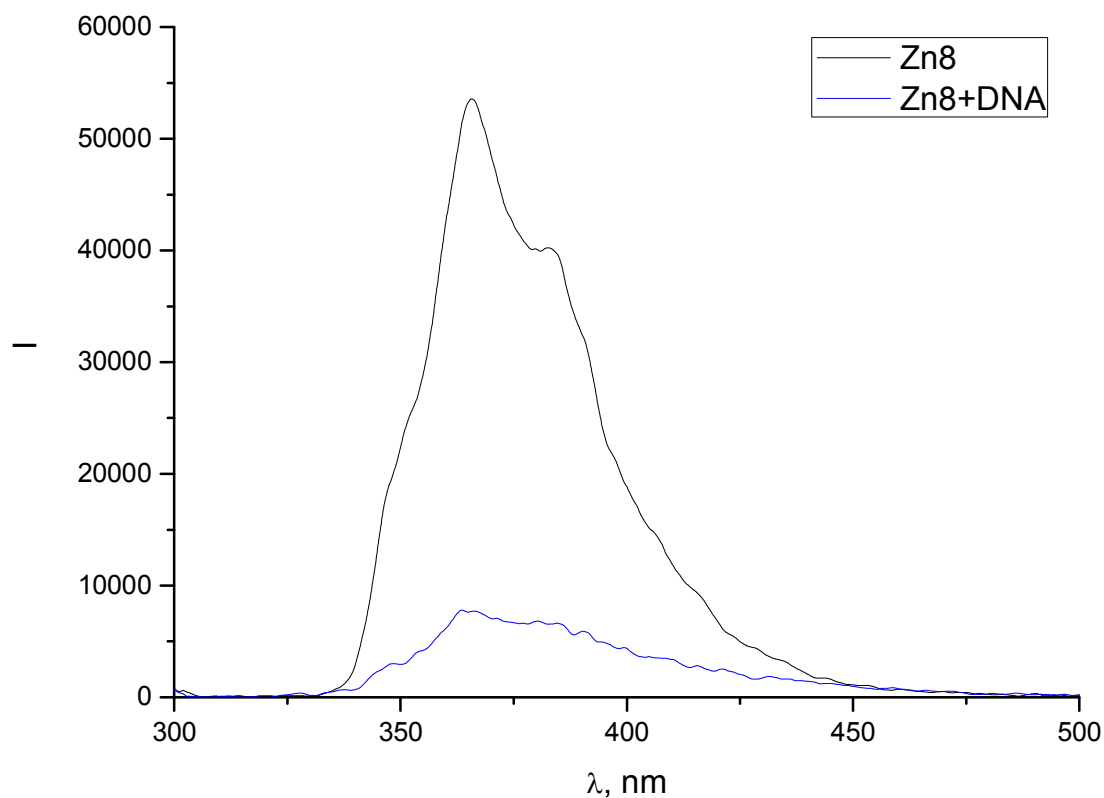


Рис. 39. Спектры испускания Zn8 и его комплекса с ДНК. Возбуждение проводилось на длине волны  $\lambda=270$  нм, соответствующей максимуму поглощения Zn8.

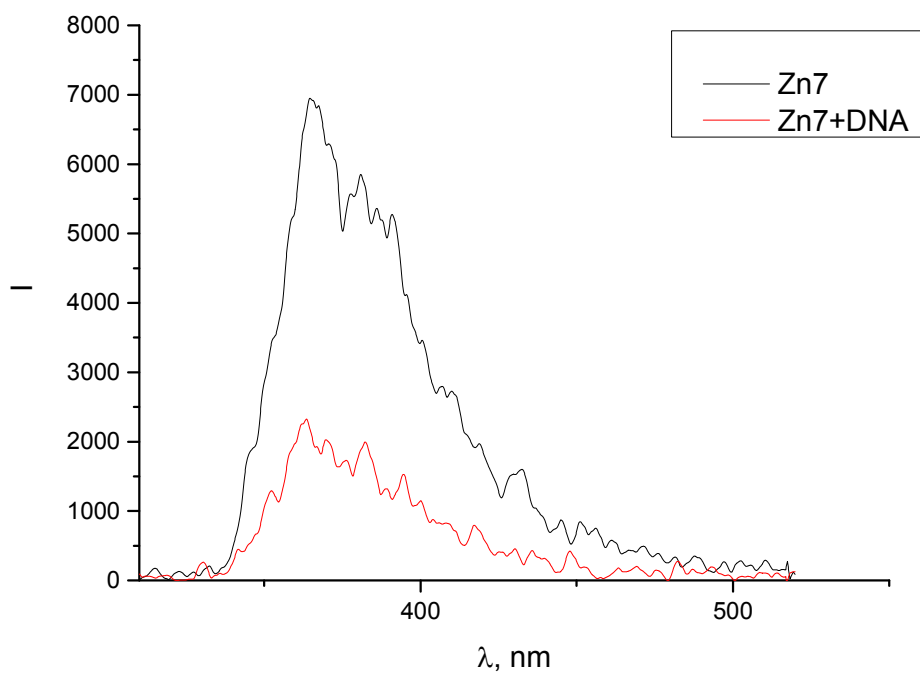


Рис. 40. Спектры испускания Zn7 и его комплекса с ДНК. Возбуждение проводилось на длине волны  $\lambda=270$  нм, соответствующей максимуму поглощения Zn7.

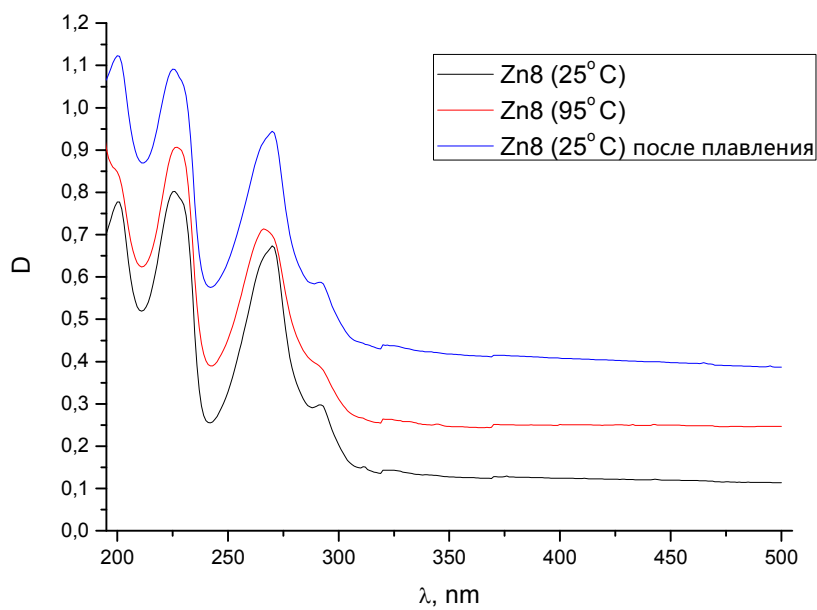


Рис. 41. Спектры поглощения Zn8 в процессе плавления.

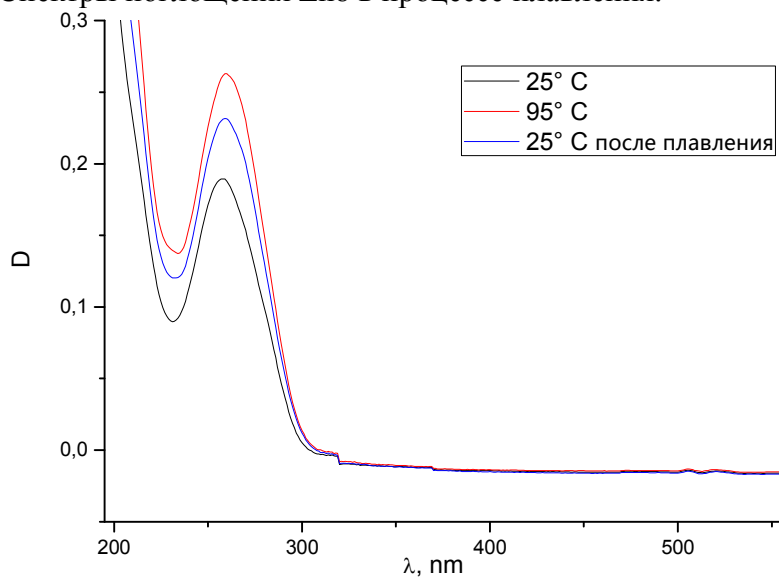


Рис. 42 (а). Спектры поглощения ДНК в процессе плавления.

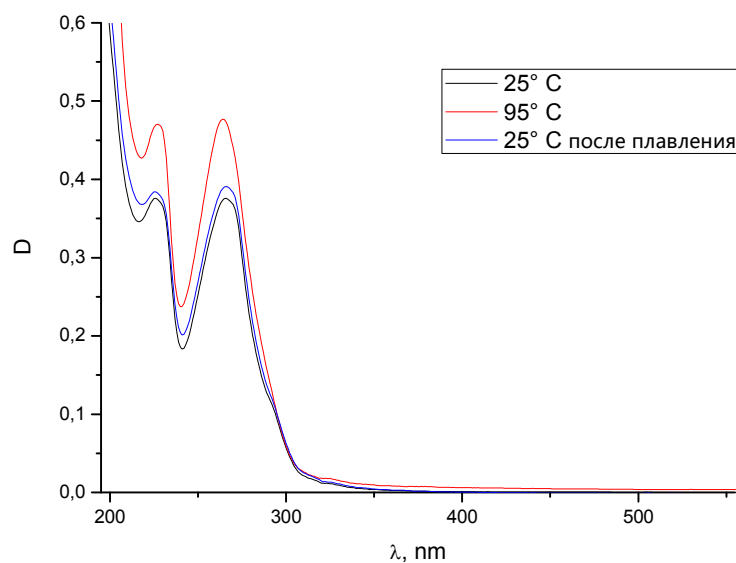


Рис. 42 (б). Спектры поглощения раствора ДНК с Zn8 в процессе плавления.



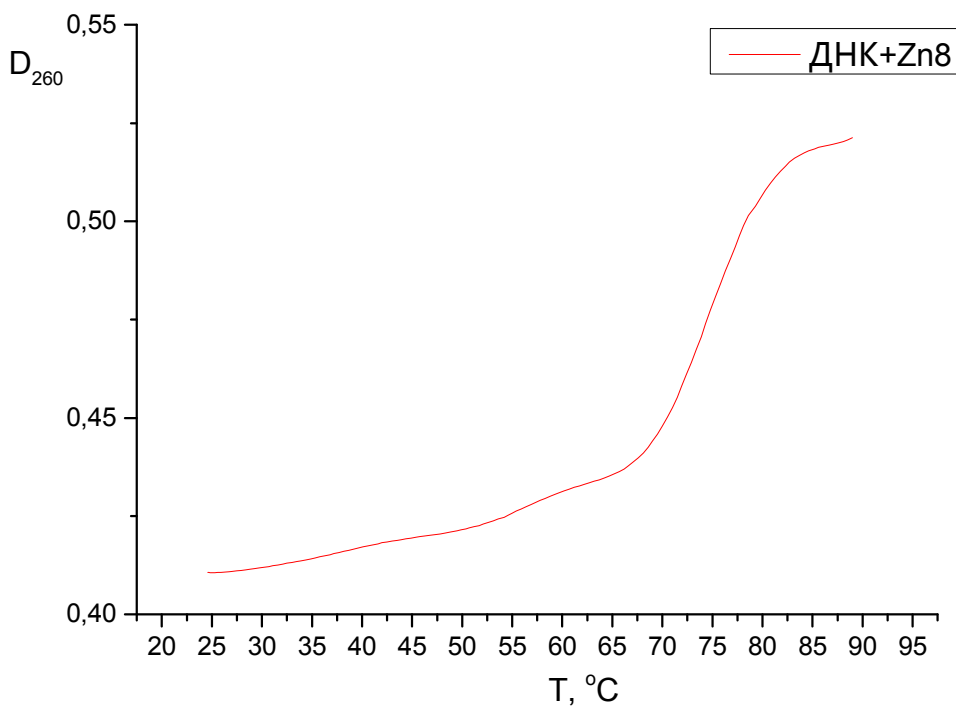
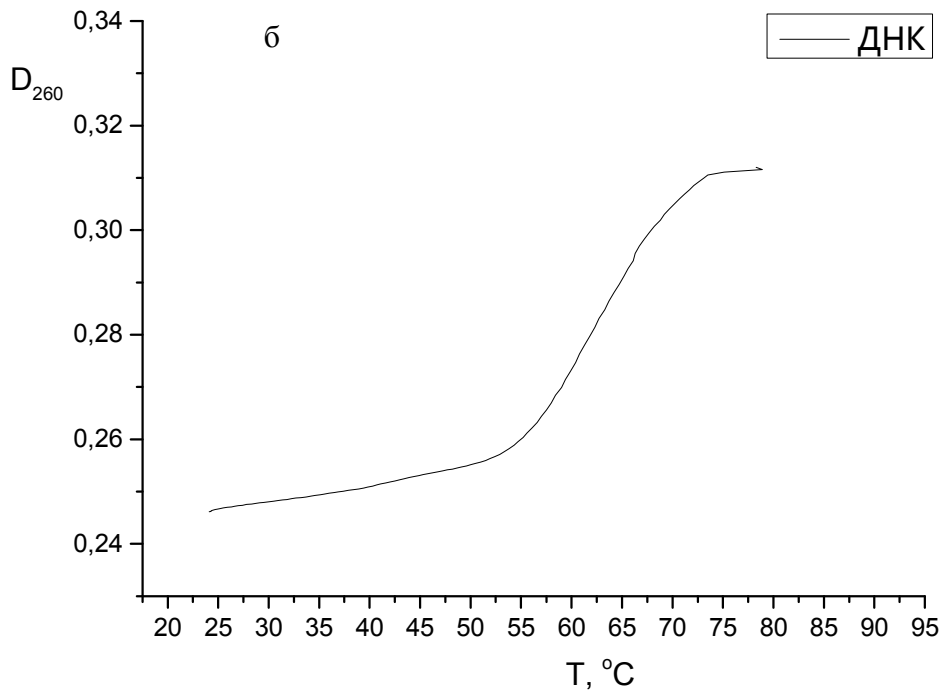


Рис. 43. Кривые плавления ДНК (а) и комплекса ДНК с Zn8 (б).

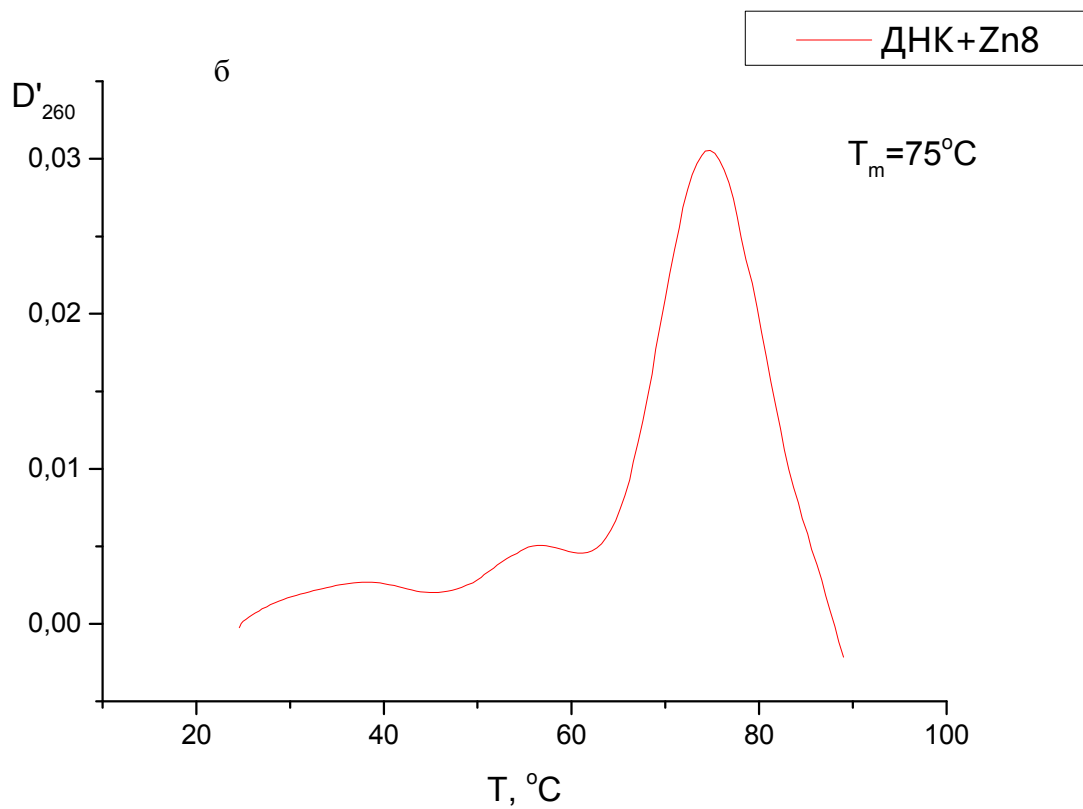
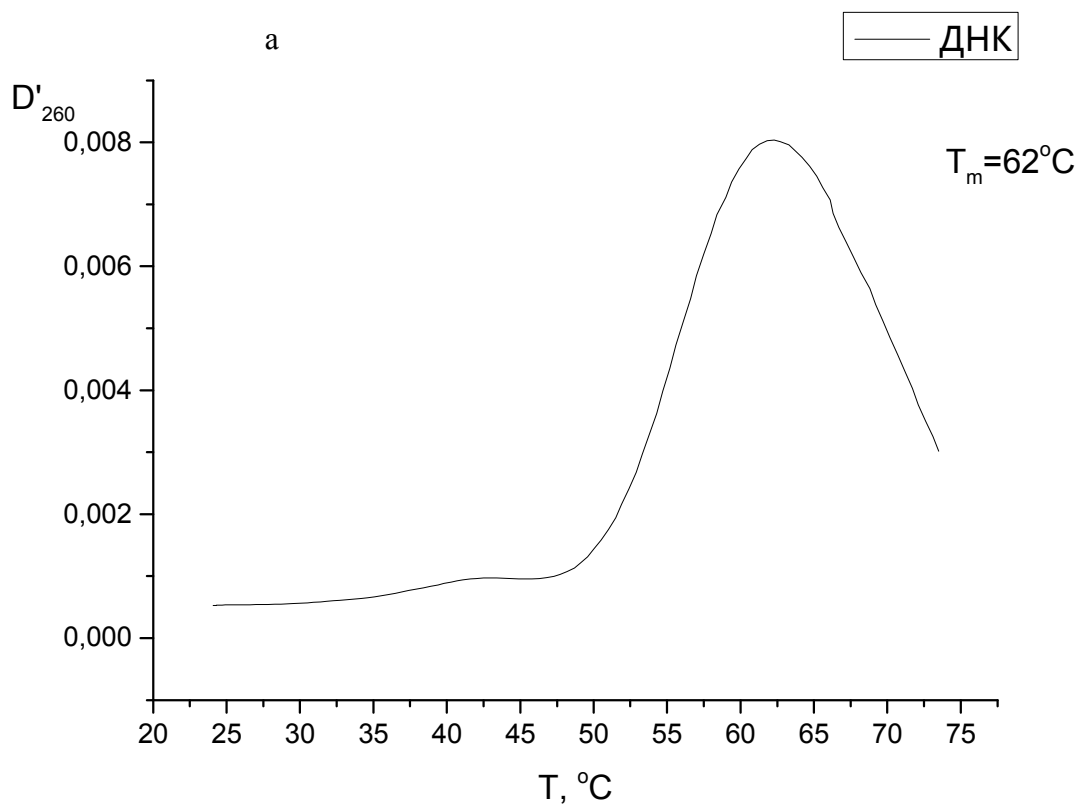


Рис. 44. Первые производные кривых плавления ДНК (а) и комплекса ДНК с Zn8 (б).

## Выводы

1. Исследованы спектры поглощения и флуоресценции двух новых соединений – комплексов Zn(II) с производными 1,10-фенантролина: бис-(1,10-фенантролин)-(1,10-фенантроцианин)-дицинка(II) ацетата (условное обозначение Zn7) и его предшественника – бис-(1,10-фенантролин)-цинка(II) ацетата (условное обозначение Zn8).
2. Изменения спектральных свойств соединений при pH 3–5 могут быть вызваны диссоциацией молекул фенантролина из металлокомплексов и протонированием фенантролина, а при pH 8–12 – замещением молекул воды в составе металлокомплексов ионами OH<sup>-</sup>.
3. Спектральные данные свидетельствуют о комплексообразовании исследуемых соединений с ДНК. Один из предполагаемых типов связывания – интеркаляция. Насыщения связывания не происходит при  $0,1 < r < 18,4$  для Zn8 и при  $0,1 < r < 1,67$  для Zn7. Возможно образование вторичных (димерных) комплексов исследуемых соединений на ДНК.
4. Образование комплекса с ДНК приводит к тушению флуоресценции Zn7 и Zn8. Это позволяет рассматривать возможность применения данных соединений для фотодинамической терапии.

## Список использованной литературы

1. Касьяненко Н. А. Методическое пособие. Конформация биополимеров в растворе – СПб, 2005 – 80 с.
2. Березов Т. Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия – 3-е изд., перераб. и доп.– М: Медицина, 1998 – 704 с.
3. В. Зенгер. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот – М: Мир, 1987 – 584 с.
4. Овчинников Ю.А., Биоорганическая химия – М., 1987 – с. 295-397.
5. Северин Е. С. Биохимия – 2003 – Режим доступа: [http://biochemistry.ru/biohimija\\_severina](http://biochemistry.ru/biohimija_severina)
6. Nina Kasyanenko, Zhang Qiushi, Vladimir Bakulev, Mikhail Osolodkov, Petr Sokolov and Viktor Demidov. DNA Binding with Acetate Bis(1,10-phenanthroline) silver(I) Monohydrate in a Solution and Metallization of Formed Structures - Polymers 2017, 9, 211.
7. Georgi D. Dimitrov, Maria S. Atanassova. Synthesis and Spectroscopic Characterization of a Complex of 1,10-Phenanthroline with Magnesium – Z. Anorg. Allg. Chem. 2003, 629 – pp. 12 –14.
8. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, and S. R. Crouch, Analytical Chemistry: An Introduction, 7th ed., Chapters 21 and 22, pp. 547-592.
9. Natarajan Raman, Rajkumar Mahalakshmi. Bio active mixed ligand complexes of Cu(II), Ni(II) and Zn(II): Synthesis, spectral, XRD, DNA binding and cleavage properties - Inorganic Chemistry Communications 40 (2014), pages 157–163.
10. R.N. Jadeja, Mitesh Chhatrola, Vivek K. Gupta. Zn(II) coordination compounds derived from 4-acyl pyrazolones and 1,10 phenanthroline: Syntheses, crystal structures, spectral analysis and DNA binding studies - Polyhedron 63 (2013), pp. 117–126.
11. N. Raman, R. Mahalakshmi, L. Mitu. Bio-sensitive activities of coordination compounds containing 1,10-phenanthroline as co-ligand: Synthesis, structural elucidation and DNA binding properties of metal(II) complexes - Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 131 (2014), pp. 355–364.
12. Changlin Liu, Ming Wang, Tianle Zhang, Hongzhe Sun. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes - Coordination Chemistry Reviews 248 (2004), pp. 147–168.
13. Hong Xu, Yi Liang, Peng Zhang, Fen Du Bing-Rui Zhou, Jun Wu, Jian-Hong Liu Zhi-Gang Liu, Liang-Nian Ji. Biophysical studies of a ruthenium(II) polypyridyl complex binding to DNA and RNA prove that nucleic acid structure has significant effects on binding behaviors - J Biol Inorg Chem (2005), pp. 529–538.
14. Bao-Yan Wu, Li-Hua Gao, Zhi-Ming Duan, Ke-Zhi Wang. Syntheses and DNA-binding studies of two ruthenium(II) complexes containing one ancillary ligand of bpy or phen:

- [Ru(bpy)(pp[2,3]p)<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> and [Ru(phen)(pp[2,3]p)<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> - *Journal of Inorganic Biochemistry* 99 (2005), pp. 1685–1691.
15. Mudasir, Karna Wijaya, Endang Tri Wahyuni, Hidenari Inoue, Naoki Yoshioka. Base-specific and enantioselective studies for the DNA binding of iron(II) mixed-ligand complexes containing 1,10-phenanthroline and dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine - *Spectrochimica Acta Part A* 66 (2007), pp. 163–170.
  16. Морошкина Е. Б., Касьяненко Н. А. Взаимодействие макромолекул с лигандами – СПб, 1998 – 78 с.
  17. Albert Bolhuis, Janice R. DNA as a target for antimicrobials - *Bioorganic Chemistry* 55 (2014), pp. 51–59.
  18. Демидов В. Н. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора химических наук. Электрон-избыточные 1,10-фенантроцианиновые комплексы d-элементов: закономерности образования, спектральные свойства, структурно-термодинамическое подобие – СПб, 2010 – с. 30-31.
  19. Сибилева М. А., Морошкина Е. Б. Руководство к лабораторному практикуму по молекулярной биофизике – 2006.
  20. Веденов А. А., Дыхне А. М., Франк-Каменецкий М. Д. Переход спираль-клубок в ДНК – Том 107, вып. 3, 1971 – с. 479-519.
  21. Волькенштейн М. В. Биофизика – М.: Наука, 1988 – 593 с.
  22. Michael T. Bjorndal, D. Kuchnir Fygenon. DNA Melting in the Presence of Fluorescent Intercalating Oxazole Yellow Dyes Measured with a Gel-Based Assay - *Biopolymers* 65, 2002 – pp. 40–44.
  23. Дж. Лакович. Основы флуоресцентной спектроскопии – М.: Мир, 1986 – 488 с.
  24. Конев С. В., Волотовский И. Д. Фотобиология – М.: Изд-во БГУ им. Ленина, 1979 – 384с.
  25. Николаев А. И. Влияние металлокомплексов на структуру и фоточувствительность ДНК – СПб, 2015 – 128 с.
  26. Осинникова Д.Н. Взаимодействие молекулы ДНК с синтетическими аналогами антибиотиков и алкалоидов различной структуры. Диссертация на соискание ученой степени канд. физ.-мат.наук, СПбГУ, 2016.

## **Благодарности**

Автор благодарит д.х.н. В.Н. Демидова за предоставленные соединения и консультации, к.ф.-м.н. Е.Б. Морошкину за полезное обсуждение результатов.

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ "Методы анализа состава вещества", "Рентгенодифракционные методы исследования" и "Оптические и лазерные методы исследования вещества".