

УДК 541.49:547.963.32:543.422:543.545.2

ВЛИЯНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА РАСТВОРОВ КОМПЛЕКСОВ Pd(II) И Pt(II) С АРОМАТИЧЕСКИМИ ЛИГАНДАМИ

© 2025 г. Е. В. Демидов¹, М. В. Абрамова-Немеш¹, Т. А. Новикова¹,
А. Ю. Плеханов², В. А. Феокистова³, М. В. Пузык^{1,*}

¹Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

²Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

³Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: puzyk@mail.ru

Поступила в редакцию 08.10.2024 г.

После доработки 22.11.2024 г.

Принята к публикации 22.11.2024 г.

Методом электронной абсорбционной спектроскопии и гель-электрофореза исследовано взаимодействие нуклеиновых кислот (ДНК тимуса теленка и плазмиды pCY В3, РНК дрожжей) и этилендиаминовых комплексов Pd(II) и Pt(II), содержащих ароматические гетероциклические лиганды (2,2'-бипиридил, 1,10-фенантролин, 2-фенилпиридин, 2-(2'-тиенил)пиридин, 7,8-бензохинолин, метил-2-фенил-4-хинолинкарбоксилат, кумарин-6 и нильский красный. Показана применимость электронной абсорбционной спектроскопии для установления интеркаляции металлоорганических комплексов в ДНК. Из исследованных комплексов только комплексы Pd(II) с нильским красным и кумарином-6 оказались способны к интенсивному взаимодействию с РНК. Эффективное расплетание вторичной скрученности плазмидной ДНК, выявляемое гель-электрофорезом, говорит о том, что эти же комплексы активнее других интеркалируются в ДНК.

Ключевые слова: комплексы Pd(II) и Pt(II), РНК, ДНК, интеркаляция, гель-электрофорез

DOI: 10.31857/S0023119325020057 **EDN:** ALKZDI

ВВЕДЕНИЕ

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) установила, что рак является одной из ведущих причин смерти в мире. За последнее время ВОЗ ежегодно фиксирует около 20 млн человек, впервые заболевших раком, и около 10 млн человек, скончавшихся от него. Причем около 50 млн человек остаются в живых в течение пяти лет после постановки онкологического диагноза. В химиотерапии по механизму действия на ДНК цитотоксиканты разделяют на несколько типов, в том числе ковалентно-связывающиеся и интеркалирующие. Цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин и их аналоги являются представителями соединений Pt(II) с одним или несколькими лабильными лигандами и поэтому их применяют в химиотерапии как ковалентно-связывающиеся вещества с ДНК [1, 2]. Все используемые в настоящее время противоопухолевые препараты на основе Pt(II) наряду с высокой эффективностью обладают серьезными побочными эффектами: высокая токсичность, неизбирательность, а также со временем возникающая невосприимчивость [3]. В связи с этим актуальным является поиск новых веществ, обладающих высокой противоопухолевой активностью, не только среди соеди-

нений Pt(II), но и nd^{8-} -электронного аналога – Pd(II), имеющего также плоско-квадратную структуру [4]. Также альтернативой ковалентно-связывающимся являются вещества, интеркалирующие за счет π - π -стекинга с азотистыми основаниями ДНК. Ранее было установлено [3, 5], что катионные комплексы Pt(II) с дииминными лигандами интеркалируют в ДНК по правилу исключения ближайшего соседа. В качестве стандарта для нашего исследования мы выбрали хлорид (2,2'-бипиридин)этилендиаминплатины (II) (далее – [PtEnBipy]Cl₂), интеркаляция которого в ДНК доказана множеством современных методов: дифракцией рентгеновских лучей и упругих нейтронов, гель-электрофорезом, изотермической титриметрической калориметрией, ИК линейным дихроизмом, двумерным ЯМР [6, 7]. Поэтому цель данной работы – исследование влияния нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) на спектральные свойства этилендиаминовых комплексов Pd(II) и Pt(II) с ароматическими лигандами (Bipy – 2,2'-бипиридил, Phen – 1,10-фенантролин, Ppy – 2-фенилпиридин, Tpy – 2-(2'-тиенил)пиридин, Bhq – 7,8-бензохинолин, Mrqs – метил-2-фенил-4-хинолинкарбоксилат, C-6 – кумарин-6, NR – нильский красный (рис. 1).

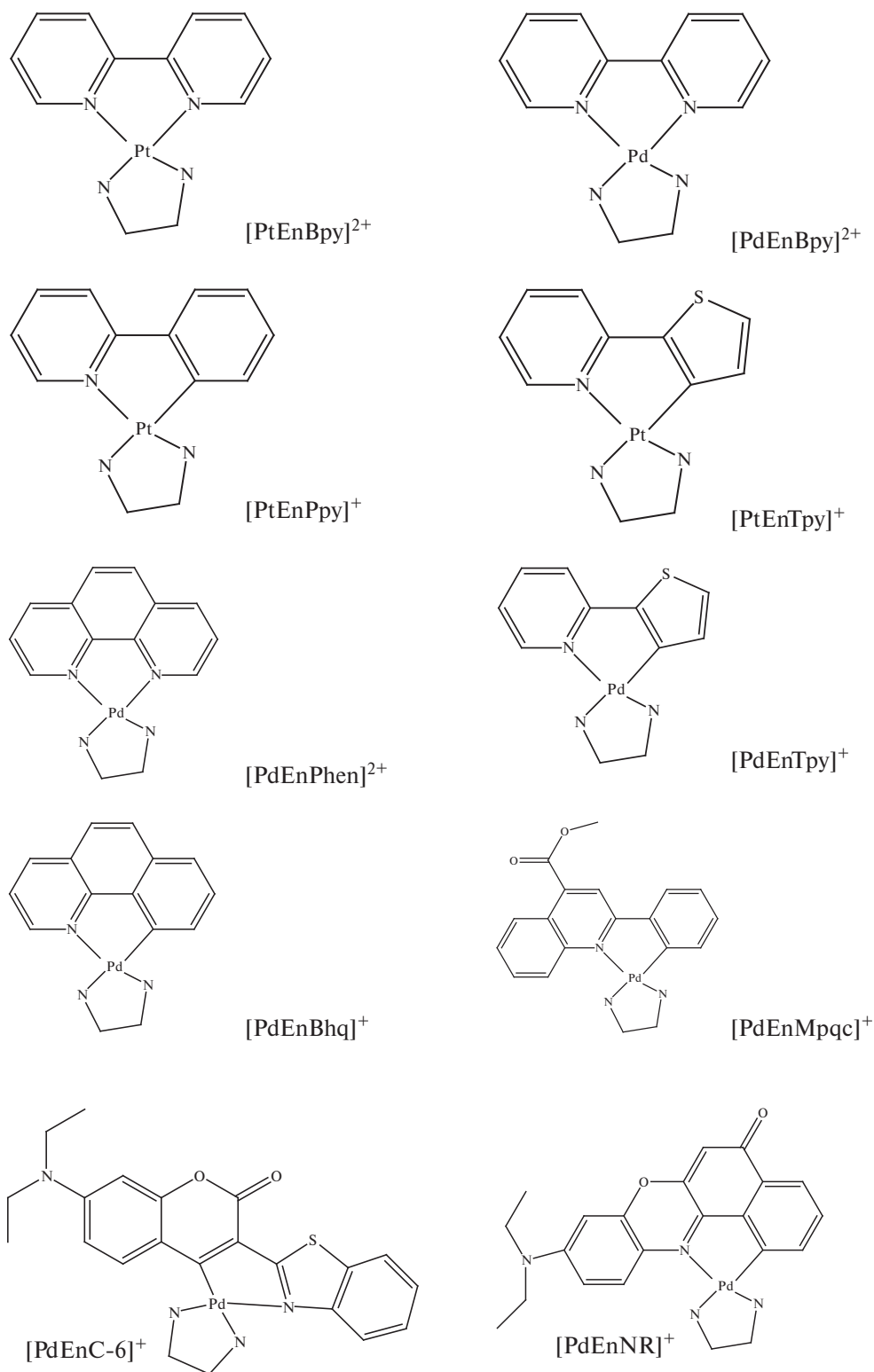


Рис. 1. Структурные формулы комплексов без внешнесферных ионов и их обозначения в тексте.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез и идентификация комплексов $[PtEnBpy]Cl_2$, $[PdEnBpy]Cl_2$, $[PtEnPpy]Cl$, $[PtEnTpy]Cl$, $[PdEnTpy]ClO_4$, $[PdEnPhen](ClO_4)_2$, $[PdEnBhq]ClO_4$, $[PtEnC-6]ClO_4$, $[PtEnMpqc]BF_4$, $[PdEnNR]OAc$ осу-

ществлены по ранее опубликованным методикам [8–13].

Для электронной абсорбционной спектроскопии использовали ДНК из тимуса телят (далее ДНК) и РНК из дрожжей (далее РНК), все SnapGene. Все

растворы готовили на дистиллированной воде. Спектральные исследования выполнены в Центре коллективного пользования факультета химии Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена при комнатной температуре в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см на СФ-2000 («ОКБ Спектр», Санкт-Петербург, Россия) в диапазоне 200–860 нм с шагом 0.1 нм.

Для доказательства интеркаляции комплексов Pt(II) и Pd(II) в нуклеиновые кислоты применяли методику спектрофотометрического титрования. К 2 мл раствора координационного соединения (концентрация $\sim 10^{-5}$ mol/dm³) порционно добавляли по 10 мкл 0.06% раствора ДНК или РНК ($\sim 10^{-3}$ mol/dm³ раствор в расчете на среднюю молярную массу нуклеотида), смесь перемешивали и последовательно фиксировали спектры поглощения.

Гель-электрофорез осуществляли в 0.05 М Трис-ацетатном буферном растворе (pH 8.3), содержащем ЭДТА ($c = 0.1$ mol/dm³) и 1.0% агарозном геле при напряженности электрического поля 4 В/см. На старт электрофореза наносили 6 мкл того же буферного раствора, содержащего 1 мкг плазмиды pCY В3 (длина $5 \cdot 10^3$ б.р.), 10% глицерина; по 0.01% бром-фенолового синего и ксилотрианола; 1 мкл испытуемого комплекса ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol/dm³). Флуоресценцию электрофоретических зон ДНК фиксировали с помощью прибора ChemiDoc (BioRad), предварительно вымачивая гель в растворе бромистого этидия (с концентрацией 5 мг/л, Helicon) в течение 5 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ДНК и РНК в своем составе содержат ароматические соединения – пуриновые и пиримидиновые основания (далее азотистые основания), поэтому максимум их поглощения находится в области 258 нм, обусловленный электронными переходами ¹(π - π^*)-типа (рис. 2а, б соответственно) [14].

Апробацию методики спектрофотометрического титрования нуклеиновыми кислотами проводили на комплексе [PtEnBipy]Cl₂. При добавлении ДНК (рис. 3а) наблюдали повышение оптической плотности раствора в области 258 нм, обусловленное наличием азотистых оснований в ДНК. Однако в длинноволновой области (300–320 нм) фиксировали снижение оптической плотности раствора, обусловленное внутрелигандными электронными переходами ¹(π - π^*)-типа, локализованными на 2,2'-бипиридиле. Об образовании единственного продукта взаимодействия ДНК-[PtEnBipy] в представленной серии спектров поглощения (рис. 3а) указывают изосбестические точки в районе 296 и 325 нм. Также

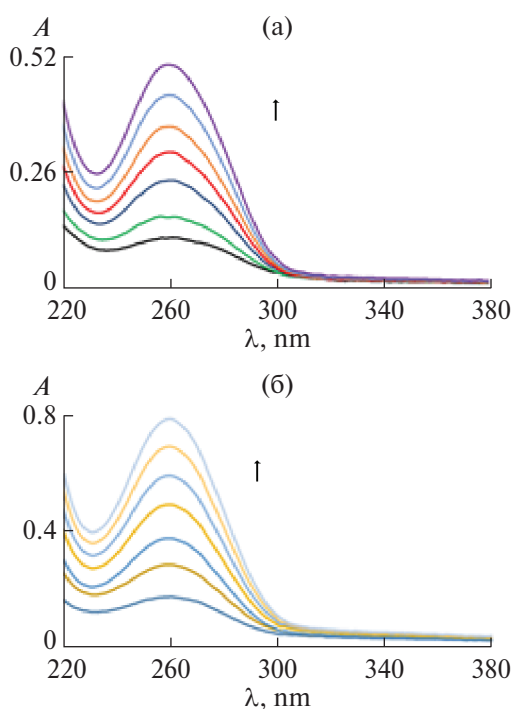


Рис. 2. Спектры поглощения водных растворов (а) ДНК, (б) РНК. Спектральные изменения, вызванные увеличением концентрации нуклеиновой кислоты, указаны стрелками.

убедительным доказательством в пользу интеркаляции комплекса в ДНК служат дифференциальные спектры поглощения (рис. 3с), полученные вычитанием из спектра поглощения продукта интеркаляции спектра поглощения комплекса с нулевой концентрацией ДНК. Так, полученные дифференциальные спектры ДНК-[PtEnBipy] в области 260–300 нм не совпадают со спектром чистой ДНК, а в более длинноволновой области значения оптической плотности отрицательны.

В случае титрования [PtEnBipy]Cl₂ раствором РНК в области 258 нм наблюдали аналогичные изменения – повышение оптической плотности (рис. 3б). Однако в длинноволновой области (300–350 нм) отсутствуют и изосбестические точки и изменение оптической плотности. Дифференциальные спектры поглощения (рис. 3г) подобны спектрам поглощения чистой РНК (рис. 2б).

Таким образом, совокупность полученных спектральных данных позволяет утверждать, что метод электронной абсорбционной спектроскопии дает возможность установить интеркаляцию катиона [PtEnBipy]²⁺ в двухцепочечную ДНК, и отсутствие его интеркаляции в одноцепочечную РНК.

Исследование спектральных свойств взаимодействия других этилендиаминовых комплексов Pt(II)

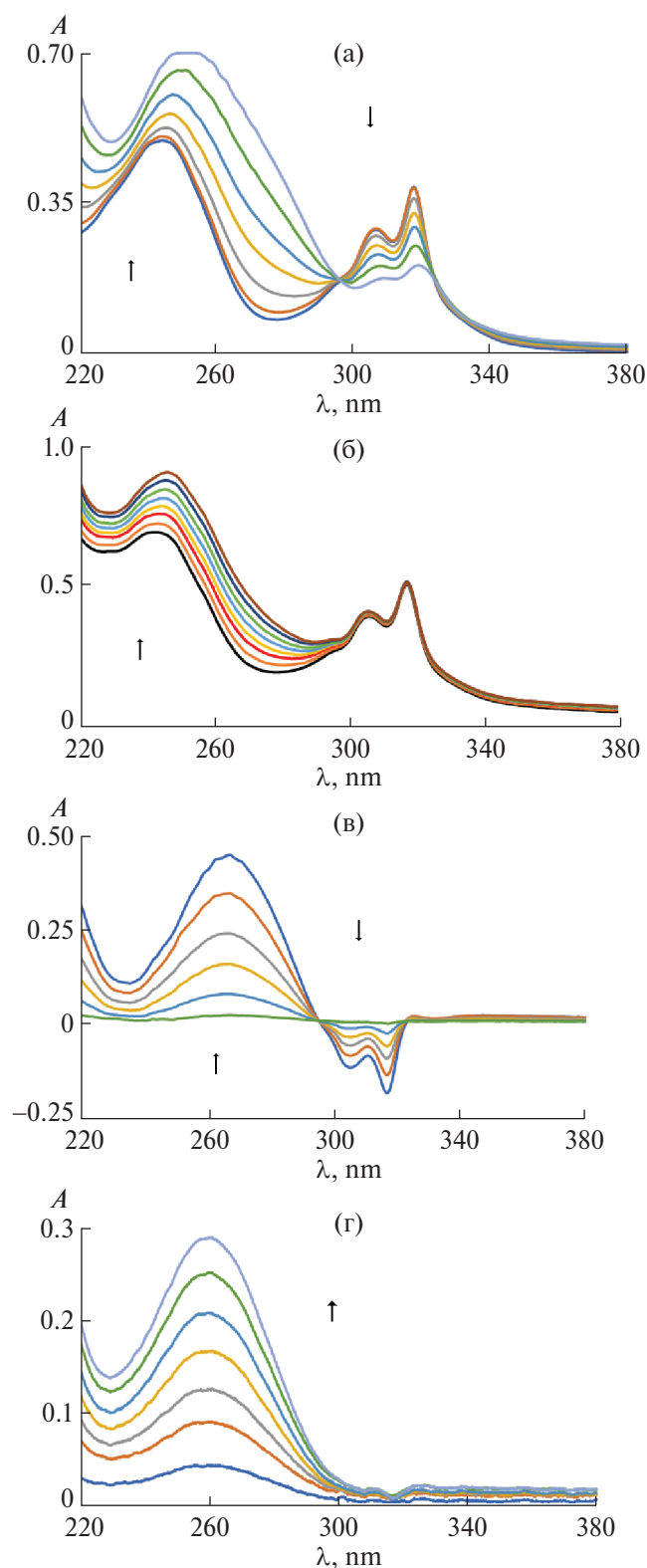


Рис. 3. (а) спектры поглощения $[\text{PtEnBipy}]^{2+}$ при добавлении раствора ДНК, (б) спектры поглощения $[\text{PtEnBipy}]^{2+}$ при добавлении раствора РНК, (в) дифференциальные спектры ДНК- $[\text{PtEnBipy}]^{2+}$, (г) дифференциальные спектры РНК- $[\text{PtEnBipy}]^{2+}$. Спектральные изменения, вызванные увеличением концентрации нуклеиновой кислоты, указаны стрелками.

и Pd(II) , содержащих ароматические лиганды, с ДНК показало сходные результаты (спектры представлены в дополнительных материалах к статье):

- увеличение оптической плотности раствора в области 258 нм;
- снижение оптической плотности внутрителигандных полос ароматического лиганда $^1(\pi-\pi^*)$ -типа в длинноволновой области спектра;
- наличие изобестических точек: по две точки для комплексов $[\text{PdEnBipy}]\text{Cl}_2$, $[\text{PtEnPpy}]\text{Cl}$, три точки — для $[\text{PdEnTpy}]\text{ClO}_4$, четыре точки — $[\text{PtEnTpy}]\text{Cl}$, по пять точек — $[\text{PdEnBhq}]\text{ClO}_4$ и $[\text{PtEnMrqc}]\text{BF}_4$;
- в дифференциальных спектрах (спектры представлены в дополнительных материалах к статье) наличие отрицательной области, обусловленной взаимодействием ароматического лиганда с азотистыми основаниями ДНК.

В случае титрования комплекса $[\text{PdEnPhen}](\text{ClO}_4)_2$ раствором ДНК в серии спектров поглощения не зафиксированы изобестические точки, но дифференциальный спектр не совпадает со спектром ДНК (спектры представлены в дополнительных материалах к статье). Эти факты позволяют предположить наличие взаимодействия с ДНК.

Следовательно, имеет место интеркаляция в ДНК всех исследованных комплексов Pd(II) и Pt(II) .

Титрование этилендиаминовых комплексов Pt(II) и Pd(II) , содержащих ароматические лиганды (Bipy, Ppy, Tpy, Phen, Bhq и Mrqc), раствором РНК прошло аналогично выбранному стандарту ($[\text{PtEnBipy}]^{2+}$): повышение оптической плотности в области 258 нм, отсутствие и изобестических точек, и снижения оптической плотности в области длинноволновых полос поглощения, обусловленных внутрителигандными $\pi-\pi^*$ -переходами в ароматических лигандах. Дифференциальные спектры комплексов подобны спектрам поглощения РНК (спектры представлены в дополнительных материалах к статье).

Однако для двух комплексов $[\text{PdEnC-6}]^+$ и $[\text{PdEnNR}]^+$ установлено снижение поглощения в длинноволновой области и возникновение изобестических точек при возрастании концентрации ДНК и РНК в растворе (рис. 4). Их дифференциальные спектры взаимодействия с ДНК и РНК схожи: имеют в длинноволновой области отрицательную оптическую плотность. Известно [15], что в составе РНК встречаются так называемые “стебли со шпильками” — двунитевые участки, образованные двумя комплементарными последовательностями

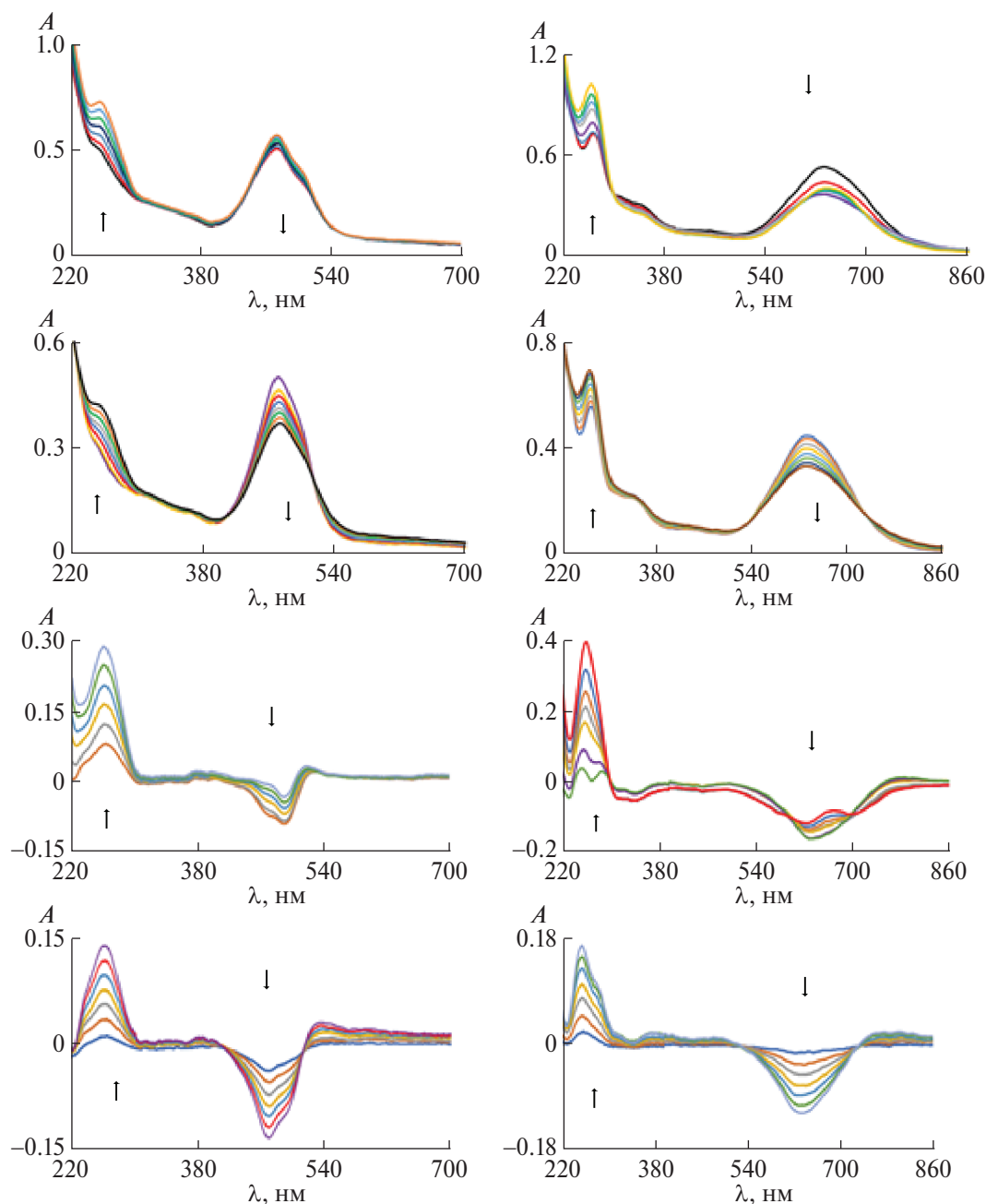


Рис. 4. (а) спектры поглощения $[\text{PdEnC-6}]^+$ при добавлении раствора ДНК, (б) спектры поглощения $[\text{PdEnC-6}]^+$ при добавлении раствора РНК, (в) дифференциальные спектры ДНК- $[\text{PdEnC-6}]^+$, (г) дифференциальные спектры РНК- $[\text{PdEnC-6}]^+$, (д) спектры поглощения $[\text{PdEnNR}]^+$ при добавлении раствора ДНК, (е) спектры поглощения $[\text{PdEnNR}]^+$ при добавлении раствора РНК, (ж) дифференциальные спектры ДНК- $[\text{PdEnNR}]^+$, (з) дифференциальные спектры РНК- $[\text{PdEnNR}]^+$. Спектральные изменения, вызванные увеличением концентрации нуклеиновой кислоты, указаны стрелками.

нуклеотидов на одной нити РНК. Ароматические лиганды C-6 и NR более протяжены по сравнению с другими: имеют 4 циклических ароматических фрагмента и диэтиламинный заместитель на периферии, тогда как лиганды Впу, Рпу, Тпу состоят из двух ароматических колец, Phen, Bhq и Мрqs – из трех (рис. 1). Вся эта совокупность полученных данных позволяет предположить, что среди исследо-

ванных комплексов интеркаляция $[\text{PdEnC-6}]^+$ и $[\text{PdEnNR}]^+$ в двунитевые участки нуклеиновых кислот настолько более эффективна, что дает возможность выявить даже незначительное количество двунитевых участков методом электронной абсорбционной спектроскопии.

Данные гель-электрофореза (рис. 5) также подтверждают более высокую интеркаляционную спо-

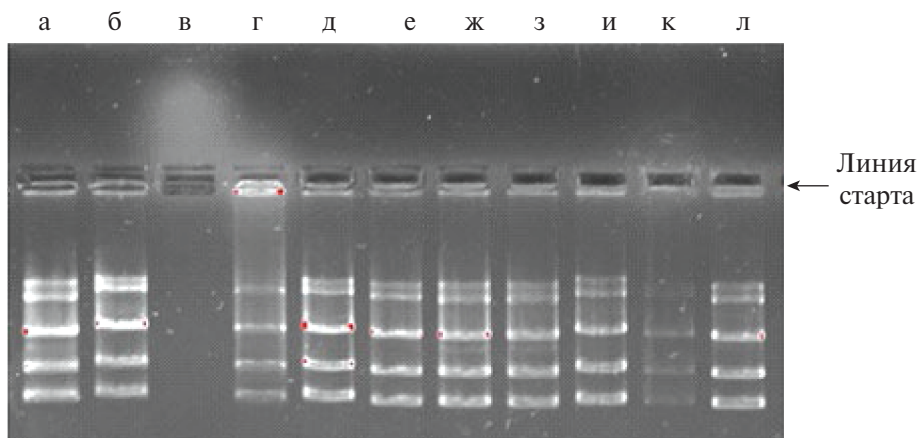


Рис. 5. Флуоресценция топоизомеров плазмиды pCY B3, окрашенных бромистым этидием, после электрофореза в присутствии комплексов. Буквы сверху соответствуют: (а) ДНК без добавления комплекса, (б) [PtEnBipy]Cl₂, (в) [PdEnNR]OAc, (г) [PtEnC-6]ClO₄, (д) [PdEnBipy]Cl₂, (е) [PtEnTpy]Cl, (ж) [PdEnTpy]ClO₄, (з) [PdEnPhen](ClO₄)₂, (и) [PtEnMrqc]BF₄, (к) [PdEnBhq]ClO₄, (л) [PtEnPpy]Cl. Красные точки соответствуют надпороговой люминесценции.

способность комплексов [PdEnC-6]⁺ и [PdEnNR]⁺. Так, из рис. 5 следует, что при обработке кольцевой ДНК плазмиды большинством из исследуемых комплексов (рис. 5б, д–л) сохраняется весь набор вторично скрученных (“суперскрученных”) форм плазмиды, свойственный исходному препарату (рис. 5а), претерпевающих в некоторых случаях (рис. 5б, д, и, к) лишь незначительное снижение электрофоретической подвижности, обусловленное положительным зарядом добавленного металлоорганического комплекса. Исходный набор вторично скрученных форм плазмиды сохраняется и при добавлении к последней комплекса [PdEnBhq]⁺ (рис. 5к), который, по-видимому, снижает эффективность окрашивания ДНК этидием.

При добавлении к плазмидной ДНК комплекса [PdEnC-6]⁺ (рис. 5г) заметно снижение концентрации вторично скрученных форм и значительное возрастание количества нескрученной (“релаксированной”) кольцевой формы. Это говорит об интеркаляции настолько значительного количества комплекса между парами азотистых оснований плазмидной ДНК, что сообщаемая при этом жесткость приводит к расплетанию вторичной скрученности плазмиды.

Тот же эффект наблюдается при добавлении к плазмидной ДНК комплекса [PdEnNR]⁺ (рис. 5в). Поскольку нам не удалось окрасить этидием плазмиду, обработанную [PdEnNR]⁺, мы инкубировали гель в растворе бромистого этидия с концентрацией (5 мг/мл), которая сообщает агарозному гелю легкую фоновую люминесценцию. На этом фоне на рис. 5в видна только одна более темная, не люминесцирующая электрофоретическая зона, соответствующая “релаксированной” форме плазмиды.

Итак, совокупность методов электронной абсорбционной спектроскопии и гель-электрофореза позволяет показать, что эффективность интеркаляции металлокомплекса в нуклеиновые кислоты зависит от количества ароматических ядер в молекуле лиганда. При наличии в последней четырех ароматических ядер способность металлокомплекса к интеркаляции скачкообразно возрастает.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания при финансовой поддержке Министерства просвещения Российской Федерации (проект VRFY-2023-0005).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вспомогательная информация включает спектры поглощения водных растворов комплексов [PdEnBipy]Cl₂, [PtEnPpy]Cl, [PtEnTpy]Cl, [PdEnTpy]ClO₄, [PdEnPhen](ClO₄)₂, [PdEnBhq]ClO₄, [PtEnMrqc]BF₄ при добавлении к ним водных растворов ДНК (рис. а) и РНК (рис. б), а также дифференциальные спектры ДНК-комплекс (рис. в) дифференциальные спектры РНК-комплекс (рис. г). Электронная версия содержит дополнительные материалы, доступные по адресу [https://doi.org/\[DOI\]](https://doi.org/[DOI])

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rosenberg B., van Camp L., Krigas T. // Nature. 1965. V. 205. P. 698; <https://doi.org/10.1038/205698a0>
2. Cohen S.M., Lippard S.J. // Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 2001. V. 67. P. 93; [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(01\)67026-0](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(01)67026-0)

3. Hücke A., Park G.Y., Bauer O.B., Beyer G., Köppen C., Zeeh D. et al. // *Front. Chem., Sec. Chem. Biol.* 2018. V. 6. P. 1. Article 180; <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00180>
4. Din M.I., Ali F., Intisar A. // *Revue Roumaine de Chimie.* 2019. V. 64. № 1. P. 5; <https://doi.org/10.33224/rch.2019.64.1.01>
5. Howe-Grant M., Lippard S.J. // *Biochemistry.* 1979. V. 18. P. 5762; <https://doi.org/10.1021/bi00593a003>
6. Lee S.A., Grimm H., Pohle W., Scheiding W., van Dam L., Song Z. et al. // *Phys. Rev. E.* 2000. V. 62. № 5. P. 7044; <https://doi.org/10.1103/physreve.62.7044>
7. Szabo A., Lee S.A. // *J. Biomolec. Struct. Dynamics.* 2008. V. 26. № 1. P. 93; <https://doi.org/10.1080/07391102.2008.10507227>
8. Brodie C.R., Collins J.G., Aldrich-Wright J.R. // *Dalton Trans.* 2004. P. 1145; <https://doi.org/10.1039/B316511F>
9. Kvam P.-I., Songstad J. // *Acta Chem. Scand.* 1995. V. 49. P. 313; <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.49-0313>
10. Puzyk M.V., Kotlyar V.S., Antonov N.V., Ivanov Yu.A., Ivanov M.A., Balashev K.P. // *Optics Spectroscopy.* 2000. V. 89. № 5. P. 721; <https://doi.org/10.1134/1.1328126>
11. Rodionova O.A., Puzyk M.V., Balashev K.P. // *Optics Spectroscopy.* 2008. V. 105. № 1. P. 62; <https://doi.org/10.1134/S0030400X08070102>
12. Baichurin R.I., Dulanova I.T., Puzyk A.I., Puzyk M.V. // *Optics Spectroscopy.* 2022. V. 130. № 14. P. 2108; <https://doi.org/10.21883/EOS.2022.14.53995.2253-21>
13. Feoktistova V.A., Baichurin R.I., Novikova T.A., Plekhanov A.Yu., Puzyk, M.V. // *Optics Spectroscopy.* 2023. № 2. P. 247; <https://doi.org/10.21883/OS.2023.02.55018.4480-22>
14. Freifelder D. // *Physical biochemistry: applications to biochemistry and molecular biology.* San Francisco: W.H. Freeman, 1982.
15. Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R. *Molecular Biology of the Gene* (5th ed.). New York: Benjamin Cummings. 2003. ISBN 0-8053-4635-X.

IMPLICATION OF NUCLEIC ACIDS ON SPECTRAL PROPERTIES OF SOLVES OF COMPLEXES OF Pd(II) AND Pt(II) WITH AROMATIC LIGANDS

**E. V. Demidov^a, M. V. Abramova-Nemesh^a, T. A. Novikova^a,
A. Yu. Plekhanov^b, V. A. Feoktistova^c, M. V. Puzyk^{a, *}**

^a*The Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg, Russia*

^b*Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia*

^c*Information Technologies, Mechanics and Optics University, St. Petersburg, Russia*

*E-mail: puzyk@mail.ru

The interaction between nucleic acids (calf thymus DNA and plasmid pCY B3, yeast RNA) and ethylenediamine complexes of Pd(II) and Pt(II) containing aromatic heterocyclic ligands (2,2'-bipyridyl, 1,10-phenanthroline, 2-phenylpyridine, 2-(2'-ethyl)pyridine, 2-phenylpyridine, 2-(2'-ethyl)pyridine) was studied by electron absorption spectroscopy and gel electrophoresis, containing aromatic heterocyclic ligands (2,2'-bipyridyl, 1,10-phenanthroline, 2-phenylpyridine, 2-(2'-thienyl)pyridine, 7,8-benzoquinoline, methyl-2-phenyl-4-quinoline carboxylate, coumarin-6 and Nile red. The applicability of electron absorption spectroscopy to establish the intercalation of organometallic complexes in DNA was demonstrated. Of the investigated complexes, only complexes of Pd(II) with Nile red and coumarin-6 were found to be capable of intensive interaction with RNA. The effective unraveling of the secondary stranding of plasmid DNA detected by gel electrophoresis suggests that these same complexes intercalate into DNA more actively than others.

Keywords: Pd(II) and Pt(II) complexes, RNA, DNA, intercalation, gel electrophoresis