

УДК 577.323.2

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АЦИДОКОМПЛЕКСОВ ПАЛЛАДИЯ $[L_n]_m[PdX_4]$
НА КОНФОРМАЦИЮ ДНК *IN VITRO***© 2009 Н.А. Касьяненко¹, Е.В. Левыкина^{1*}, О.С. Ерофеева², Н.А. Иванова²,
И.А. Ефименко²¹Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет²Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва

Статья поступила 21 июня 2008 г.

Взаимодействие катионно-анионных соединений палладия $(C_4H_{10}NO)_2[PdCl_4]$, $K_2[PdCl_4]$, $K_2[PdBr_4]$ с ДНК в растворах 0,005 М NaCl и 0,15 М NaCl исследовано методами спектрофотометрии, кругового дихроизма, вискозиметрии, динамического двойного лучепреломления и атомной силовой микроскопии. Показано, что взаимодействие осуществляется в первую очередь за счет координации донорных атомов оснований ДНК палладием. Конечный продукт взаимодействия с ацидокомплексами палладия не зависит от макромолекулы и природы галогена X в $[PdX_4]^{2-}$. Значительные изменения конформации ДНК в комплексах с палладием являются результатом как внутримолекулярных, так и межмолекулярных сшивок, индуцированных палладием.

Ключевые слова: ДНК, морфодон, ацидокомплексы палладия, атомная силовая микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Среди большого числа противоопухолевых препаратов значительное место занимает группа координационных соединений на основе платины — цисплатин (*цис*-ДДП, *цис*- $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ (I)), карбоплатин, оксалиплатин [1—5]. Все используемые в настоящее время противоопухолевые препараты на основе платины наряду с высокой эффективностью обладают серьезными побочными эффектами. Они высокотоксичны, действуют неизбирательно, а вследствие развития резистентности организма к этим соединениям лечение часто приходится прерывать досрочно.

В связи с этим широким фронтом проводится поиск новых соединений, обладающих высокой противоопухолевой активностью, не только среди соединений платины [6], но также среди соединений других платиновых металлов и, в частности, палладия. В литературе описано большое число соединений палладия [7—15], обладающих достаточно высокой противоопухолевой активностью. Однако до настоящего времени не удалось найти аминатных комплексов палладия, превышающих противоопухолевую активность *цис*-ДДП. Вместе с тем, в литературе появились сведения о высокой противоопухолевой активности тетраацидокомплексов палладия с протонированными азотсодержащими лигандами в катионе $(LH_n)_m[PdCl_4]$, при этом соединения палладия характеризуются значительно меньшей токсичностью [16, 17]. Открыт класс тетраацидокомплексов палладия с протонированными гетероциклическими лигандами, обладающих высокой противоопухолевой активностью, в ряде случаев превосходящей активность *цис*-ДДП. К числу таких комплексов относятся, например, комплексы с протонированным морфолином — $(C_4H_{10}NO)_2[PdCl_4]$ (II) и метилморфолином — $(C_5H_{12}NO)_2[PdCl_4]$ (III) [18]. Так, ацидокомплекс палладия с протонированным метилморфолином (морфозол) проявляет канцеростатическую

* E-mail: llevykina@gmail.com

активность в отношении широкого спектра экспериментальных опухолей, превосходящую в ряде случаев не только *цис*-ДДП, но и карбоплатин [19]. Повышение противоопухолевой активности и снижение побочного действия используемых в онкологической практике противоопухолевых препаратов (циклофосфана, *цис*-ДДП), а также уменьшение последствий радиационного воздействия на организм при лечении злокачественных опухолей достигается применением другого комплекса этого класса, $(C_{10}H_{16}NO)_2[PdCl_4]$ (IV) с протонированным 1-фенил-2-метиламинопропанолом в катионе, обладающего к тому же высокой радиопротекторной активностью [20]. Использование этого комплекса [21, 22] в комбинации с локальным облучением приводило к уменьшению объема опухоли, прекращению процессов метастазирования (например, меланомы В-16), снижению гематотоксического действия облучения и цитостатиков [23—25]. Показано, что такое действие комплекса IV является результатом его способности корректировать состояние вторичного иммунодефицита, возникающего при использовании противоопухолевых препаратов или облучения [26].

Соединения палладия характеризуются значительно меньшей токсичностью по сравнению с комплексами платины [16]. Следует подчеркнуть, что все соединения платины обладают сильным иммуносупрессорным действием, в то время как у соединений палладия, и в частности у эфазола, такое воздействие на организм отсутствует.

Следует иметь в виду, что соединения палладия с ацидоанионом $[PdCl_4]^{2-}$ обладают повышенной реакционной способностью по сравнению с комплексами аминатного типа при контакте с биологическими системами, так как в этом случае может реализовываться возможность координации палладия с азот- и серосодержащими фрагментами биологической системы по четырем координационным местам в отличие, например, от *цис*-ДДП, где для взаимодействия с биологической системой открыты только два координационных места. Подтверждением этого служат результаты сравнительных исследований действия ацидо- и аминатных комплексов палладия(II) и платины(II) на различные биологические объекты [27] и процессы (бактериофаги, Са, Mg-зависимую АТФ-азу, артериальное давление и др.)

Изучение взаимодействия соединений палладия с ДНК в растворе представляет значительный интерес для понимания противоопухолевого действия таких комплексов и выявления их сходства или различия по сравнению с действием известных препаратов платины с точки зрения особенностей их влияния на генетический материал клетки. Известно, что повреждения ДНК, индуцированные соединениями палладия, репарируются труднее, чем вызванные воздействием *цис*-ДДП [28].

Так, исследования процессов комплексообразования в системах ДНК—соединение палладия позволят, с одной стороны, выявить характер взаимодействия палладия с ДНК в зависимости от лигандного окружения, а с другой — получить сведения о структурных изменениях ДНК, индуцированных комплексами палладия.

В работе [29] для систем *in vitro* было показано, что, как в случае комплекса III, так и при использовании $K_2[PdCl_4]$ (V) происходит образование межнитевых сшивок ДНК за счет координации палладия преимущественно с гуанином и аденином, хотя в небольшой степени возможна координация палладия с тиминном и цитозинном. Следует отметить, что при наличии одного и того же комплексного иона $[PdCl_4]^{2-}$ в комплексах III и V скорость образования сшивок выше в случае взаимодействия с $K_2[PdCl_4]$ по сравнению с комплексом III. Этот результат может быть объяснен различным характером связывания аниона $[PdCl_4]^{2-}$ с катионом: в случае комплекса III связь осуществляется за счет образования водородных связей $Cl...H...N$, несколько затрудняющих процесс гидролиза аниона $[PdCl_4]^{2-}$ и дальнейшее его взаимодействие с ДНК.

В настоящей работе представлены результаты изучения *in vitro* влияния на конформацию молекулы ДНК комплексов II, V и VI.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И МАТЕРИАЛЫ

Вискозиметрия. Относительную вязкость растворов $\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0}$ (где η — вязкость раствора, η_0 — вязкость растворителя) определяли с помощью ротационного низкоградиентного виско-

зиметра типа Зимма-Крозера при разных градиентах скорости g . Использовали экстраполированные к нулевому градиенту скорости значения η_r . Величину характеристической вязкости $[\eta]$ определяли экстраполяцией к нулевой концентрации $c = 0$ концентрационной зависимости приведенной вязкости $\frac{(\eta_r - 1)}{c}$:

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

Величина $[\eta]$ пропорциональна удельному объему полимерного клубка в растворе. Для макромолекул достаточно большой молекулярной массы справедлива формула Флори:

$$[\eta] = \frac{\Phi \langle h^2 \rangle^{3/2}}{M} = \frac{\Phi (LA)^{3/2}}{M} \alpha^3, \quad (2)$$

где $\langle h^2 \rangle^{3/2}$ — среднеквадратичное расстояние между концами полимерной цепи, которое характеризует линейный размер молекулярного клубка в растворе; M — молекулярная масса; Φ — параметр Флори, в общем случае зависящий от объемных эффектов и жесткости полимера; α — коэффициент линейного набухания макромолекулы; L — длина полностью вытянутой макромолекулы; A — длина статистического сегмента, характеризующего изгибную жесткость цепи; $A = 2a$, где a — персистентная длина ДНК.

Спектральные методы. Спектры кругового дихроизма (КД) ДНК регистрировали на приборе Mark 4 (Jobin Ivon, Франция). Оптическую плотность растворов и спектры поглощения соединений изучали на спектрофотометрах СФ-26 и СФ-56 (Россия).

Динамическое двойное лучепреломление. Зависимость величины двойного лучепреломления Δn растворов ДНК от градиента скорости g определяли на установке с полутеневым эллиптическим компенсатором. Величину $(\Delta n/g)_0$, определенную при $g \rightarrow 0$, использовали для вычисления приведенного двойного лучепреломления $\frac{(\Delta n/g)_0}{(\eta_r - 1)\eta_0}$, которое для ДНК не зависит от

концентрации раствора и совпадает с отношением $[n]/[\eta]$ (где $[n]$ — динамооптическая постоянная). В этом случае справедливо [30]:

$$\frac{\Delta n}{g(\eta - \eta_0)} = \frac{[n]}{[\eta]} = \frac{4\pi}{45kT} \frac{(n_s^2 + 2)^2}{n_s} \Delta\alpha, \quad (3)$$

где n_s — показатель преломления растворителя; T — абсолютная температура; k — постоянная Больцмана; $\Delta\alpha$ — разность главных поляризуемостей статистического сегмента цепной молекулы. Таким образом, измеряя величину $\frac{\Delta n}{g(\eta - \eta_0)}$, можно определить $\Delta\alpha = S\Delta\beta$. Здесь S —

число нуклеотидных пар в сегменте; $\Delta\beta$ — разность поляризуемостей пары нуклеотидов вдоль оси спирали ДНК и перпендикулярно ей.

Атомная силовая микроскопия. АСМ изображения ДНК и продуктов ее взаимодействия с соединениями палладия (комплекс ДНК—Pd) были получены с помощью микроскопа NanoScope 4a (Veeco). При приготовлении образцов использовали способ самопроизвольной адсорбции ДНК из раствора на поверхность слюды в присутствии ионов магния Mg^{2+} ($C_{Mg^{2+}} = 5 \cdot 10^{-4}$ М). Раствор $MgCl_2$ добавляли в исследуемые растворы ДНК и ее комплексов непосредственно перед фиксацией. После этого каплю раствора ДНК помещали на свежеослолотую поверхность слюды, после выдержки в течение 5 мин слюду промывали дистиллированной водой, удаляя незафиксированные компоненты, высушивали струей воздуха, а затем в вакуумном сушильном шкафу. Использовали методы прямого сканирования и прерывистого контакта сухих образцов на воздухе.

Материалы. Использовали плазмидную ДНК pFL 44/EcoRI ($4,4 \cdot 10^3$ пар оснований) и ДНК тимуса теленка фирмы Sigma, молекулярная масса которой $M = 8 \cdot 10^6$ Да была определена из значения характеристической вязкости ДНК в 0,15 М NaCl по формуле Доти—Эйгнера

$[\eta] = 6,9 \cdot 10^4 M^{0,7}$ (для величины $[\eta]$, выраженной в дл/г). Концентрация ДНК в тексте везде указана в весовых процентах. Соединения V и VI синтезированы по методикам [31]. Соединение II синтезировано по методике [18]. Из этого же патента взято условное наименование этого соединения — морфодон, которое для простоты и употребляется в статье.

Соединения палладия растворяли в дистиллированной воде или 0,005 М NaCl при комнатной температуре. Их комплексы с ДНК готовили сливанием равных объемов растворов соответствующих соединений палладия и ДНК заданной ионной силы, при этом исходные растворы досаливали до необходимой концентрации NaCl (исследование взаимодействия компонентов проводили в 0,005 М NaCl и 0,15 М NaCl). Концентрацию ДНК и соединений палладия при приготовлении комплексов варьировали.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование взаимодействия комплексов палладия с ДНК проводили при физиологической ионной силе раствора 0,15 М NaCl и в 0,005 М NaCl. Содержание NaCl во внутриклеточной жидкости примерно в 25 раз ниже, чем в плазме крови, поэтому важно изучение взаимодействия соединений палладия с ДНК и в растворах с низким содержанием NaCl. Использование концентрации 0,005 М NaCl при изучении системы ДНК—Pd позволило сопоставить конформационные изменения ДНК в этой системе и системе ДНК—Pt [32—35].

Известно, что многие комплексные соединения платины не взаимодействуют с молекулой ДНК в условиях высокой ионной силы [32, 33], что объясняется подавлением процессов гидролиза соединений платины в таких растворах, предотвращающим их последующее взаимодействие с ДНК; гидролиз соединений палладия осуществляется и в растворах высокой ионной силы (0,15 М NaCl). При растворении $K_2[PdCl_4]$ в 0,15 М NaCl идет процесс замещения одного атома хлора на молекулу воды [36].

Процесс гидролиза $[PdCl_4]^{2-}$ подробно изучали главным образом на примере $K_2[PdCl_4]$ по электронным спектрам поглощения растворов в воде. Ниже приведены спектральные характеристики продуктов гидролиза $[PdCl_4]^{2-}$ [37—39], которые будут использованы при рассмотрении результатов взаимодействия ДНК с соединениями палладия в растворах малой ионной силы.

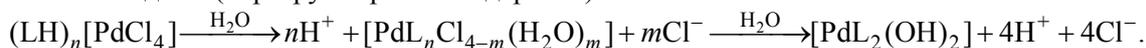
Комплекс	Полоса поглощения, нм
$[PdCl_4]^{2-}$	474
$[PdCl_3(H_2O)]^-$	431
$[PdCl_2(H_2O)_2]$	426
$[PdCl(H_2O)_3]^+$	406,5
$[Pd(H_2O)_4]^{2+}$	379

Гидролиз $[PdCl_4]^{2-}$ сопровождается изменением pH раствора, что следует иметь в виду при изучении взаимодействия комплексов палладия с ДНК, поскольку значительное увеличение концентрации H^+ в растворе может вызвать конформационные изменения макромолекулы, что хорошо иллюстрируют работы [32, 40]. Увеличение кислотности раствора ДНК до определенных значений pH, которые зависят от ионной силы, приводит к протонированию азотистых оснований макромолекулы. Известно, что протонирование ДНК протекает в несколько стадий и оказывает влияние на конформационные параметры макромолекулы. На первом этапе появление положительного заряда на азотистых основаниях не сопровождается нарушением вторичной структуры ДНК. Напротив, можно видеть гипохромный, а не гиперхромный эффект при $\lambda = 260$ нм [40]. В этих условиях ДНК становится полиамфолитом, уменьшается ее равновесная жесткость (персистентная длина), происходит компактизация молекулярного клубка. При дальнейшем уменьшении pH из-за разрушения водородных связей между основаниями открываются более сильные протоноакцепторные центры (N1 аденина и N3 цитозина), в результате чего происходит лавинообразное протонирование оснований, приводящее к кислотной денатурации ДНК. При $pH < 1,5$ ДНК выпадает в осадок, так как в результате потери фосфат-

ной группой отрицательного заряда ДНК теряет гидрофильность. Следует подчеркнуть, что процесс протонирования ДНК в значительной степени зависит от ионной силы раствора [40].

pH водных растворов $K_2[PdCl_4]$ с концентрацией в них соединения $C = 4 \cdot 10^{-4}$ М уменьшается с течением времени (до 3,20 через 24 ч после растворения в дистиллированной воде), при этом раствор становится бесцветным, а весь палладий выпадает в осадок в виде $K_2[Pd(OH)_4]$. Процесс гидролиза $K_2[PdCl_4]$, растворенного в 0,005 М NaCl, идет несколько медленнее. Так, через сутки pH снижается до 3,53, при этом образования осадка гидроксокомплексов не наблюдается. Повышение концентрации NaCl до 0,15 М NaCl (физиологический раствор) позволяет практически останавливать процесс гидролиза на стадии образования аквакомплексов [41], при этом pH растворов меняется от 5,86 до 5,65 (через 24 ч) при значении pH дистиллированной воды 6,30. Исследование pH водных растворов $K_2[PdCl_4]$ с концентрацией соединения $C = 4 \cdot 10^{-6}$ М показало, что столь значительное разбавление приводит к нивелированию кислотности: pH растворов колеблется в пределах 5,65—5,85 и не зависит от времени выдерживания раствора.

При изучении соединений палладия с протонированным азотсодержащим катионом следует иметь в виду, что наряду с процессом гидролиза $[PdCl_4]^{2-}$ происходит депротонирование катиона с последующей возможной координацией образовавшегося в растворе нейтрального амина с палладием (перегруппировка Андерсона) по схеме:



Суммарный процесс гидролиза морфодона сопровождается изменением pH в зависимости от концентрации раствора и времени выдержки. Так, pH водных растворов морфодона при его концентрации $C = 4 \cdot 10^{-4}$ М изменяется от 4,0 до 3,24 (временной интервал 10 мин—24 ч) с выпадением при этом осадка гидроксокомплекса палладия. В 0,005 М NaCl pH растворов изменяется от 4,5 до 3,46, т.е. и в этих условиях преимущественным является процесс образования аква- и гидроксокомплексов. pH растворов морфодона в 0,15 М NaCl в зависимости от изменения его концентрации в растворе от $4 \cdot 10^{-4}$ до $4 \cdot 10^{-6}$ М меняется от 3,95 до 6,25.

По данным [38, 39] в водных растворах $[PdCl_4]^{2-}$ в процессе гидролиза трансформируется в $[PdCl_3(H_2O)]^-$, $[PdCl_2(H_2O)_2]$, $[PdCl(H_2O)_3]^+$, $[Pd(H_2O)_4]^{2+}$.

Известно, что для соединений палладия характерна большая лабильность в процессах замещения ионов хлора в координационной сфере на другие лиганды, чем в соответствующих соединениях платины: скорость замещения ионов хлора в комплексах палладия в 10^5 раз выше, чем в соединениях платины. Замещение ионов хлора на бром еще больше ускоряет этот процесс. Вместе с тем использование в качестве катиона протонированных азотсодержащих лигандов, каким, в частности, является морфолин, несколько затрудняет процесс гидролиза, поскольку вместо ионного взаимодействия, как в $K_2[PdCl_4]$, имеет место образование водородных связей ионов хлора в $[PdCl_4]^{2-}$ с протонированным атомом азота лиганда.

На рис. 1 представлено изменение спектра поглощения раствора морфодона в 0,005 М NaCl при комнатной температуре и изменение интенсивности максимума поглощения и его сдвиг в зависимости от времени выдержки растворов. Для изучения изменений, происходящих в $[PdCl_4]^{2-}$ в растворах морфодона в 0,005 М NaCl, в качестве исходной использовали полосу $d-d$ -перехода при 475 нм.

Трансформация спектра раствора морфодона со временем отражает изменение в лигандном окружении комплексобразователя (см. рис. 1, а). Максимум полосы смещается с 416 нм (5 мин после растворения) к 398 нм (после 24 ч), при больших временах изменений в смещении положения максимума нет, изменяется лишь его интенсивность (б). Приведенные данные свидетельствуют о том, что к концу вторых суток происходит почти полное замещение ионов хлора в координационной сфере палладия и нарастание его аква-гидроксо-форм, достигающее максимума к 50 ч, о чем свидетельствует выход кривой изменения интенсивности максимума на плато на рис. 1, б. Это может быть связано с наличием в растворе форм палладия триаква- $[PdCl(H_2O)_3]^+$ и тетрааква- $[Pd(H_2O)_4]^{2+}$ [37—39].

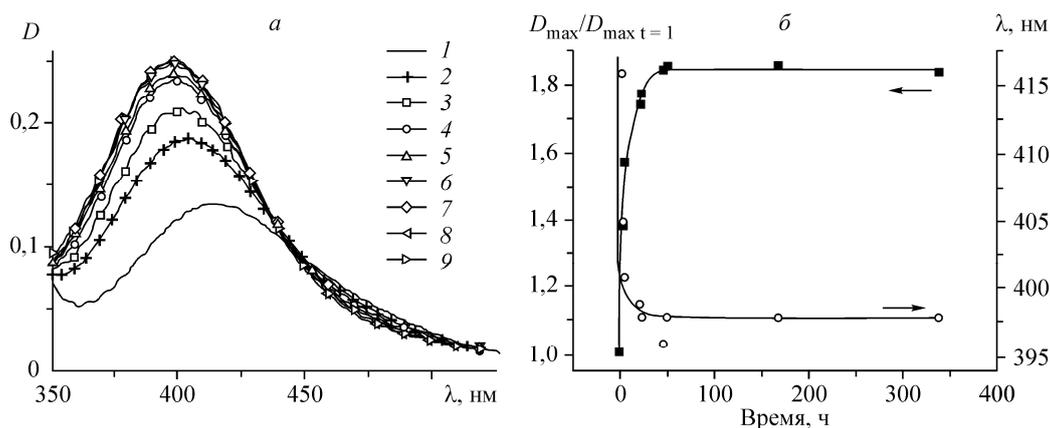


Рис. 1. Изменение спектра поглощения морфодона в 0,005 М NaCl (а), изменение амплитуды и положения соответствующих максимумов (б) в зависимости от времени после растворения.

1 — 5 мин; 2 — 2 ч; 3 — 3 ч; 4 — 20 ч; 5 — 22 ч; 6 — 44 ч; 7 — 47 ч; 8 — 166 ч; 9 — 336 ч. $C(\text{морф}) = 6 \cdot 10^{-4}$ М

На рис. 2 показано изменение характера спектра поглощения растворов морфодона в 0,005 М NaCl в зависимости от концентрации ДНК. Комплексы готовили спустя 1 ч после растворения морфодона (положение максимума спектра поглощения морфодона при этом соответствует 404 нм).

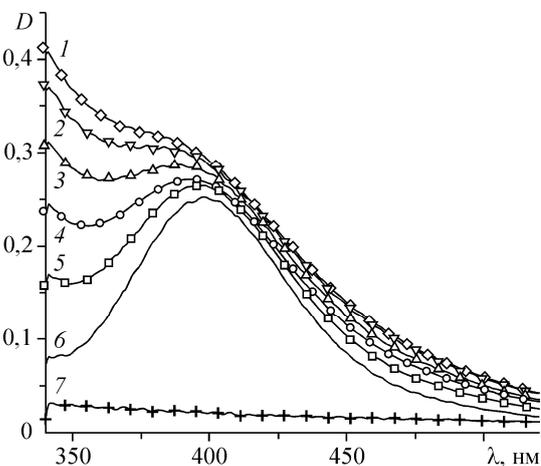
Представленные данные свидетельствуют о том, что при взаимодействии с ДНК происходит изменение координационной сферы палладия и сдвиг полосы поглощения, как результат изменения симметрии $[PdX_4]^{2-}$. Действительно, если полоса поглощения чистого раствора морфодона через 2 суток выдерживания сдвигается с 404 до 398 нм, то взаимодействие с ДНК влечет за собой смещение максимума до 388 нм с последующим его исчезновением при увеличении концентрации ДНК до 0,01 %.

Заметим, что аналогичные изменения на полосе $d-d$ -перехода наблюдаются в системе ДНК— $K_2[PdCl_4]$ —0,005 М NaCl (рис. 3). Величины сдвигов растворов морфодона и $K_2[PdCl_4]$ в 0,005 М NaCl при их сходных концентрациях в растворах и временах выдерживания (15—20 мин) оказываются близкими и лежат в пределах 7—8 нм, что может свидетельствовать в пользу отсутствия влияния катионов на процессы взаимодействия $[PdX_4]^{2-}$ с ДНК.

Сравнительное рассмотрение спектров поглощения растворов ДНК с морфодоном и $K_2[PdCl_4]$ (рис. 4) показало, что при этом взаимодействии в обоих случаях происходит сдвиг полосы поглощения ДНК с 260 нм (чистая ДНК) до 270 (273) нм (вычисленный спектр ДНК в комплексе с соединениями), что свидетельствует об идентичности продуктов взаимодействия ДНК с обоими соединениями палладия. Заметим, что в области максимума ДНК у соединений палладия лежит нехарактеристичная полоса, которую в данном эксперименте вычитали из спектров комплексов ДНК—Pd с целью выявления максимума полосы поглощения палладированной ДНК. Рассмотрение спектров на рис. 4 позволяет сделать вывод о сохранении ДНК двуспиральной структуры, о чем свидетельствует отсутствие гиперхромизма на полосе поглощения ДНК.

Рис. 2. Изменение спектра поглощения раствора морфодона от концентрации ДНК через 2 суток после растворения морфодона и приготовления ДНК—Pd комплекса в 0,005 М NaCl.

$C(\text{морф}) = 6 \cdot 10^{-4}$ М, $C(\text{ДНК}) = 0,01\%$ (1), 0,008 % (2), 0,006 % (3), 0,04 % (4), 0,002 % (5), 0 (6). Здесь же приведены данные для раствора ДНК без морфодона $C = 0,01\%$ (7)



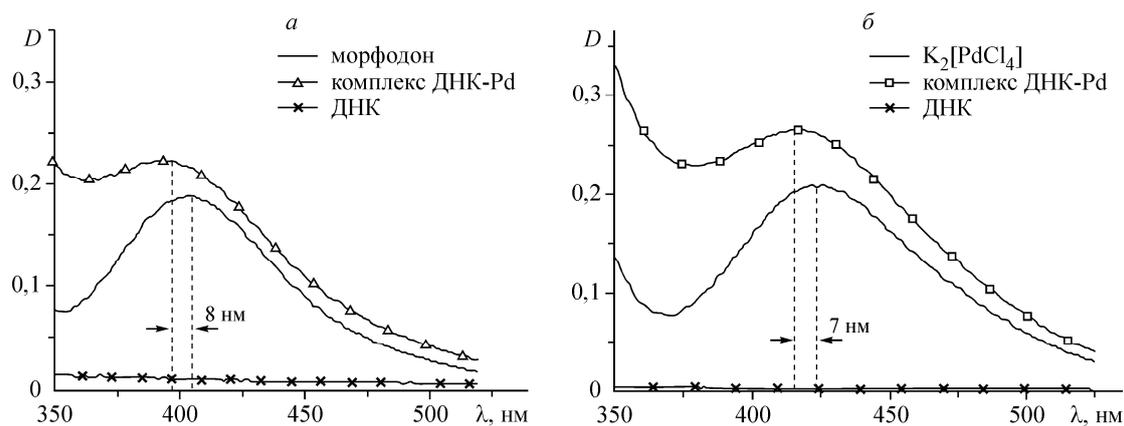


Рис. 3. Спектр поглощения морфодона $C(\text{морф}) = 6 \cdot 10^{-4}$ М (а) и $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ $C(\text{K}_2[\text{PdCl}_4]) = 9 \cdot 10^{-4}$ М (б) и их комплексов с ДНК. $C(\text{ДНК}) = 0,006$ %

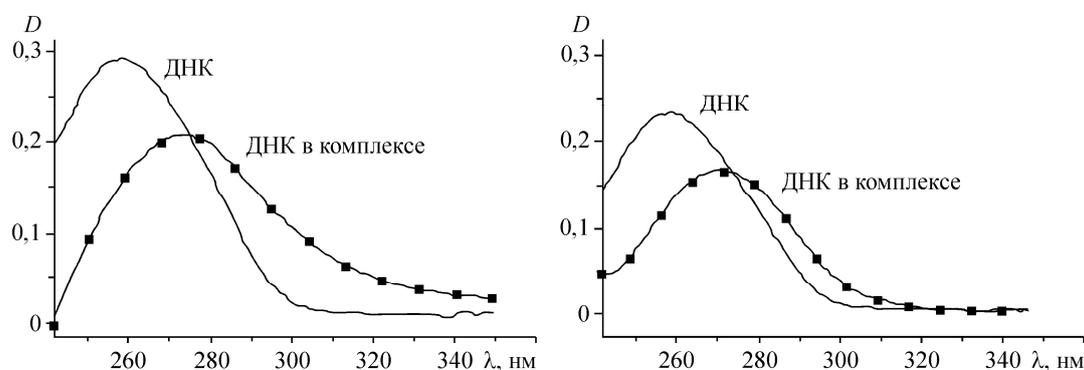


Рис. 4. Спектры поглощения ДНК при взаимодействии с морфодоном (а) и $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ (б) после 24 ч выдержки растворов. $C(\text{морф}) = 0,5 \cdot 10^{-4}$ М, $C(\text{K}_2[\text{PdCl}_4]) = 0,5 \cdot 10^{-4}$ М

На рис. 5 представлены результаты исследований, проведенных методом кругового дихроизма. Спектры КД растворов палладированной ДНК в 0,005 М NaCl позволяют проследить изменения, происходящие в зависимости от концентрации исследуемых палладиевых соедине-

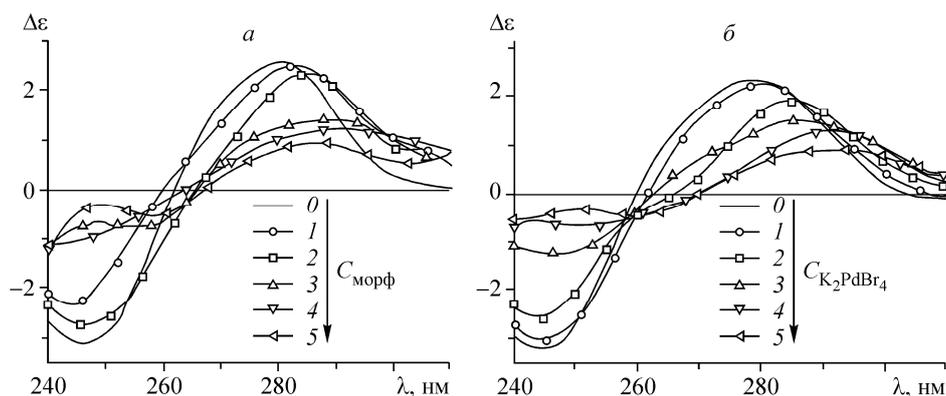


Рис. 5. Спектры КД комплексов ДНК с морфодоном (а) (0 — $C(\text{морф}) = 0$; 1 — $C(\text{морф}) = 0,2 \cdot 10^{-5}$ М; 2 — $C(\text{морф}) = 0,4 \cdot 10^{-5}$ М; 3 — $C(\text{морф}) = 0,8 \cdot 10^{-5}$ М; 4 — $C(\text{морф}) = 1,2 \cdot 10^{-5}$ М; 5 — $C(\text{морф}) = 2,0 \cdot 10^{-5}$ М) и $\text{K}_2[\text{PdBr}_4]$ (б) (0 — $C(\text{K}_2[\text{PdBr}_4]) = 0$ М; 1 — $C(\text{K}_2[\text{PdBr}_4]) = 0,2 \cdot 10^{-5}$ М; 2 — $C(\text{K}_2[\text{PdBr}_4]) = 0,6 \cdot 10^{-5}$ М; 3 — $C(\text{K}_2[\text{PdBr}_4]) = 1,0 \cdot 10^{-5}$ М; 4 — $C(\text{K}_2[\text{PdBr}_4]) = 1,4 \cdot 10^{-5}$ М; 5 — $C(\text{K}_2[\text{PdBr}_4]) = 2,0 \cdot 10^{-5}$ М). $C(\text{ДНК}) = 0,001$ %. Время после растворения соединений > 20 ч

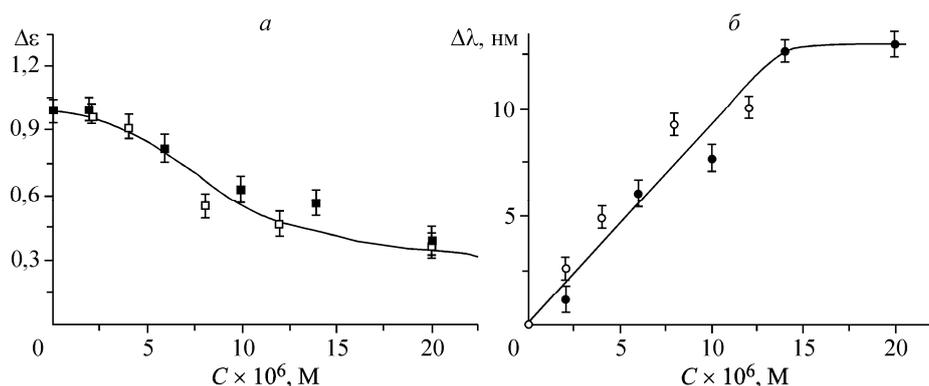


Рис. 6. Зависимость амплитуды спектров КД ДНК в комплексе от концентрации морфодона (белые значки) и $K_2[PdBr_4]$ (черные значки) — *a*; зависимость изменения положения максимумов спектров КД ДНК в комплексах от концентрации морфодона (белые значки) и $K_2[PdBr_4]$ (черные значки) — *б*

ний в растворе. С повышением концентрации морфодона максимум положительной полосы КД ДНК смещается от 280 нм (чистая ДНК) до 287 нм и характеризуется значительным снижением ее интенсивности (см. рис. 5, *a*). Аналогичные результаты получены и для растворов ДНК с $K_2[PdBr_4]$ (*б*). На рис. 6 представлены результаты обработки данных рис. 5: изменение положения максимумов спектров КД растворов ДНК с морфодоном и $K_2[PdBr_4]$, а также изменение их интенсивности в зависимости от концентрации соединений палладия в растворе.

Полученные результаты однозначно свидетельствуют о независимости конечного продукта палладирующей ДНК ни от природы катиона соединения, ни от вида галогена в комплексном ионе $[PdX_4]^{2-}$ ($X = Cl, Br$). Данные, полученные в результате обработки (см. рис. 6), позволяют оценить количество атомов палладия, связанных с молекулой ДНК. При концентрациях морфодона порядка $1,4 \cdot 10^{-5}$ М спектральные изменения прекращаются, что может отражать заполнение всех возможных мест связывания палладия на ДНК. Эта концентрация соответствует соотношению 8 атомов палладия на 10 пар оснований ДНК в растворе. В то время как в случае *цис*-ДДП предельное связывание, не приводящее еще к нарушению вторичной структуры ДНК, соответствует 4 молекулам платины на 10 пар оснований [33].

Рассмотрим данные гидродинамических исследований. На рис. 7 приведена зависимость относительного изменения приведенной вязкости растворов $\eta_{пр}$, содержащих комплексы ДНК с изучаемыми соединениями, от их концентрации. Эти данные свидетельствуют об уменьшении объема молекулярного клубка ДНК в растворе при ее связывании с палладием. Заметим, что величина $\eta_{пр}$ перестает изменяться при достижении определенной концентрации соединения, когда на каждые 10 пар оснований ДНК приходится более восьми молекул морфодона. Эта оценка совпадает с результатами, полученными из спектральных данных. Характер влияния соединения $K_2[PdBr_4]$ на конформацию ДНК сходен с наблюдаемым для морфодона, но изменение относительной вязкости растворов менее значительно при тех же концентрациях палладия, что отражает разницу в кинетике процесса взаимодействия ДНК с морфодоном и $K_2[PdBr_4]$ в первый час реакции.

Значение характеристической вязкости палладирующей ДНК в области насыщения равно $[\eta] = (20 \pm 2)$ дл/г, а для свободной ДНК эта величина составляет $[\eta] = (80 \pm 2)$ дл/г. Согласно формуле Флори (уравнение 2), падение $[\eta]$ при связывании может быть обусловлено уменьшением изгибной жесткости (персистентной длины) ДНК или величины α из-за меньшего полиэлектролитного набухания вследствие перераспределения заряда на молекуле ДНК при связывании с палладием.

Изучение взаимодействия ДНК с морфодоном в растворах с разной ионной силой методом динамического двойного лучепреломления показало, что образование координационной связи атомов азота ДНК с палладием сопровождается падением оптической анизотропии макромолекулы (рис. 8). Ранее для растворов с $K_2[PtCl_4]$ были обнаружены сходные изменения конформа-

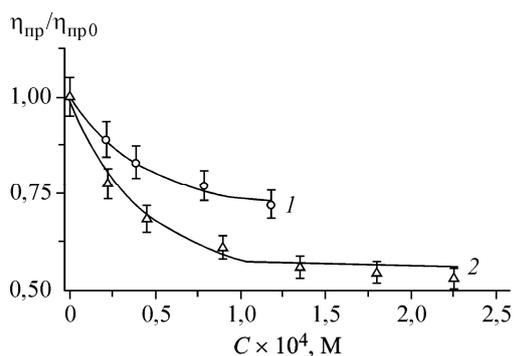


Рис. 7. Относительное изменение оптической анизотропии ДНК с $K_2[PdBr_4]$ (1) и с морфодоном (2). Измерения проводили через 1 ч после приготвления комплексов ДНК—Pd

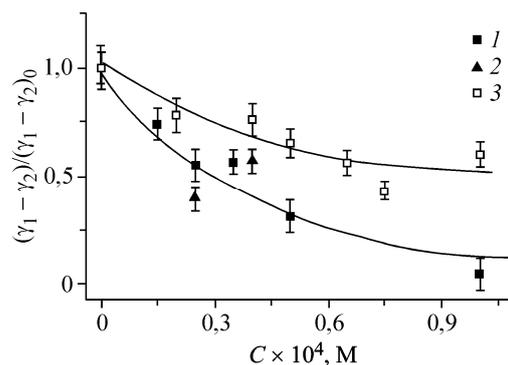
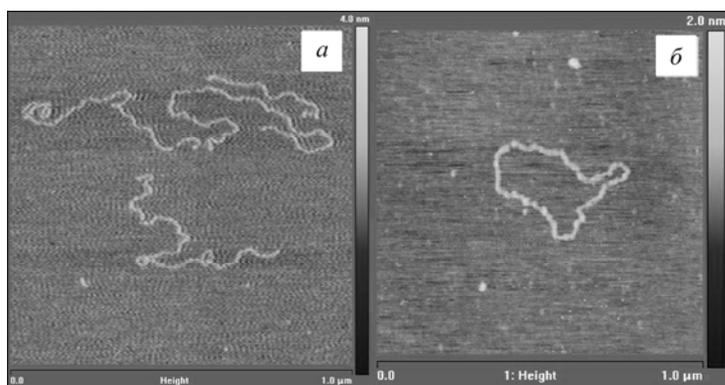


Рис. 8. Изменение оптической анизотропии ДНК при взаимодействии с морфодоном в растворах с разной ионной силой (1 — морфодон 0,005 M NaCl; 2 — морфодон 0,15 M NaCl) и $K_2[PtCl_4]$ (3 — $K_2[PtCl_4]$ 0,005 M NaCl)

ционных параметров ДНК, индуцированные ее связыванием с платиной (см. рис. 8, белые значки). Полученные результаты свидетельствуют о больших конформационных изменениях ДНК, вызываемых действием ацидо-комплекса палладия по сравнению с ацидо-комплексом платины. Фиксируемое уменьшение оптической анизотропии ДНК может быть связано либо с падением термодинамической жесткости (уменьшением персистентной длины) макромолекулы, либо с изменением средней оптической анизотропии пары нуклеотидов. Последнее может быть вызвано несколькими факторами: изменением наклона оснований из-за связывания, деформацией двойной спирали, ее дестабилизацией. Для исключения дестабилизации ДНК, которая возможна при использовании высоких концентраций исследуемых соединений вследствие подкисления ими раствора при растворении и протонирования оснований ДНК, был проведен тот же эксперимент, но при большей ионной силе раствора. Процесс протонирования в значительной степени зависит от ионной силы раствора. Например в 0,15 M NaCl ДНК протонируется при pH 3,3, а в 0,005 M NaCl — при pH 4,75. Протонирование ДНК сопровождается характерным изменением спектров УФ и КД [32, 35]. Данные рис. 8 получены при таких концентрациях морфодона, которым соответствуют значения pH 5,5—4,75. Нижнее значение pH соответствует началу протонирования макромолекулы в этих условиях, правда, еще без нарушения вторичной структуры. Исключить влияние протонирования на изучаемые характеристики позволяет увеличение ионной силы раствора до 0,15 M NaCl, в которой протонирование ДНК происходит только при pH 3,3. Эксперимент показал, что в 0,15 M NaCl эффект сохраняется (см. рис. 8), т.е. падение оптической анизотропии вызвано не протонированием ДНК.

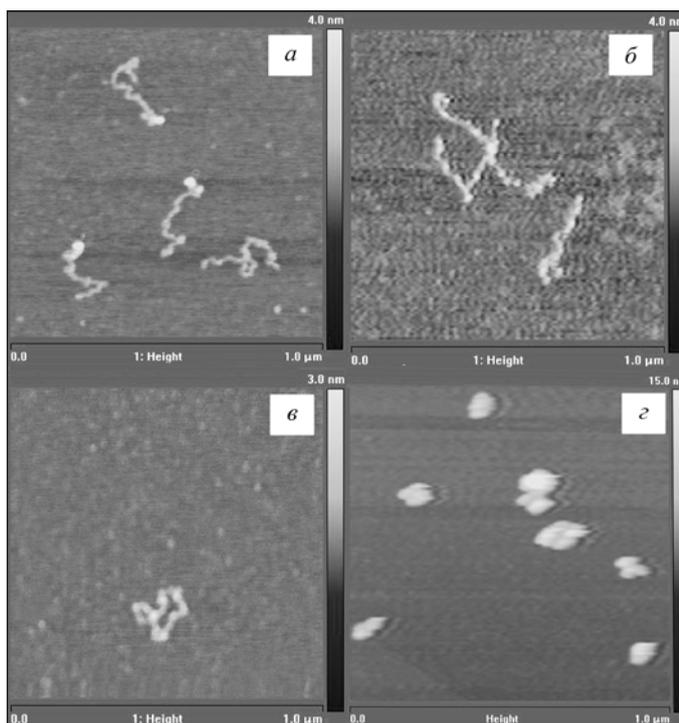
Согласно расчету и сопоставлению с данными вискозиметрии, одно лишь изменение жесткости не может объяснить экспериментально наблюдаемое изменение оптической анизотропии ДНК при связывании. Остается предположить, что деформацию двойной спирали провоцирует



образование комплекса ДНК—Pd, при этом может иметь место и изменение наклона оснований относительно оси ДНК, и изменение оптической анизотропии пары оснований. Нельзя исключить и возмож-

Рис. 9. АСМ изображения чистой ДНК: линейризованной плазмидной — а, кольцевой плазмидной — б. $C(\text{ДНК}) = 0,00004\%$. Размер изображений 1×1 мкм

Рис. 10. АСМ изображения ДНК в комплексе с $K_2[PdCl_4]$ (а) $C(K_2[PdCl_4]) = 6 \cdot 10^{-7}$ М, $C(ДНК) = 4 \cdot 10^{-5}$ %; с морфодоном (б, в), $C(морф) = 6 \cdot 10^{-7}$ М, $C(ДНК) = 4 \cdot 10^{-5}$ %; (г) $C(морф) = 0,25 \cdot 10^{-4}$ М, $C(ДНК) = 0,0002$ %. (Концентрация указана после разбавления $MgCl_2$). Размер изображений 1×1 мкм



ный изгиб ДНК в местах связывания палладия, как это наблюдается в случае *цис*-ДДП. Кроме того, наличие четырех координационных мест в $[PdCl_4]^{2-}$ (против двух в *цис*-ДДП) будет способствовать образованию внутри- и межмолекулярных сшивок, которые также окажут влияние на вязкость растворов и оптическую анизотропию ДНК. Это в свою очередь может при значительных концентрациях ДНК или палладия в растворе привести к образованию агрегатов, состоящих из нескольких молекул ДНК. Результаты, полученные при исследовании систем методом АСМ, однозначно подтверждают это заключение.

На рис. 9 представлены изображения свободной ДНК, полученные методом атомной силовой микроскопии в режиме прерывистого контакта. Исследования выполнены на линейаризованной плазмидной (см. рис. 9, а) и кольцевой плазмидной ДНК (б). Изображение свободной ДНК демонстрирует фиксацию отдельных молекул на подложке. Для комплексов ДНК с морфодоном при $C(морф) = 0,25 \cdot 10^{-4}$ М фиксируются достаточно однородные компактные структуры приблизительно одного размера — порядка 100 нм (рис. 10, г). Полученные результаты подтверждают предположение о реализации внутри- и межмолекулярных сшивок, формируемых при связывании палладия с ДНК. Связывающийся с ДНК палладий может образовывать связи с атомами азота не только одной нити ДНК, но и с приблизившимися сегментами той же или иной макромолекулы, что объясняет появление наночастиц определенной формы и размера (порядка 100 нм). Формирование наноструктур наблюдали и другие авторы [42].

При меньших концентрациях морфодона можно видеть формирование других структур типа "бусинок на нити". Аналогичный результат получен и при взаимодействии ДНК с тетрахлорпалладатом калия при тех же концентрациях (см. рис. 10, а—в). Появление структур с "бусинами" может быть связано с формированием внутримолекулярных сшивок ДНК, индуцированных связавшимся палладием. Следует отметить, что формирующиеся структуры отличаются высокой регулярностью — "бусины" достаточно равномерно распределены вдоль цепи ДНК. Проблема возможной деструкции линейных ДНК под действием соединений палладия была решена при изучении действия морфодона на кольцевую ДНК. Как видно из рис. 10, в, происходит лишь уменьшение длины ДНК с образованием бусиноподобных фрагментов на ее остове, разрыва же кольца не наблюдается.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reedijk J. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 1999. – 3. – P. 236 – 240.
2. Wong E., Giandomenico C.M. // *Chem. Rev.* – 1999. – 99. – P. 2451 – 2466.
3. Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T. // *Nature.* – 1965. – 205. – P. 698 – 700.
4. Lippert B. *Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug.* // Germany, Weinheim, Wiley, 1999.
5. Cohen S.M., Lippard S.J. *Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy.* // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 2001. – 67. – P. 93 – 130.

6. *Ефименко И.А., Ермаков В.А.* Перспектива использования противоопухолевых препаратов на основе соединений платиновых металлов // Биржа интеллектуальной собственности. – 2005. – **4**, № 1. – С. 26 – 31.
7. *Gill D.S.* In: Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy / Eds. M.P. Hacker, E.B. Douple, I.H. Krakoff. – Boston: Nijhoff, 1984. – P. 267 – 278.
8. *Travničėk Z., Szucova L., Popu J.* // J. Inorg. Biochem. – 2007. – **101**, N 3. – P. 477 – 492.
9. *Matenaz A.Y., Souza P.* // Ibid. – N 10. – P. 1354 – 1361.
10. *Corbi P., Cagnin F., Sabeh L.P.B. et al.* // Spectrochem. Acta, Part A. Mol. Biomol. Spectroscopy. – 2007. – **66**, N 4-5. – P. 1171 – 1174.
11. *Budzisz E., Malecka M., Lorenz I.-P. et al.* // Inorg. Chem. – 2006. – **45**. – P. 9688 – 9695.
12. *Mansuri-Torshizi H., Ghadimy S., Abarzadeh N.* // Chem. Pharm. Bull. – 2001. – **49**, N 12. – P. 1517 – 1520.
13. *Casas J.S., Castineiras A., Parajó Y et al.* // Polyhedron. – 2003. – **22**. – P. 1113 – 1121.
14. *Riera X., Moreno V., Ciudad C.J. et al.* // Bioinorg. Chem. Appl. – 2007. – Article ID 98732, 15 pages.
15. *Papakyriakou A., Bratsos I., Katsaros N.* // J. Serb. Chem. Soc. – 2003. – **68**, N 4-5. – P. 337 – 348.
16. *Shehata M.R.* // Transition Met. Chem. – 2001. – **26**. – P. 198 – 204.
17. *Переверзева Э.Р.* Патологические аспекты прогнозирования побочного действия и специфической активности новых противоопухолевых препаратов и средств сопровождения цитотоксической терапии в доклинических исследованиях. – Автореф. ... докт. биол. наук. – М., 2007.
18. *Ефименко И.А., Иванова Н.А., Локишин Б.В.* Патент Ru 2291872 С.2 Комплексы палладия с гетероциклическими лигандами. Опубликовано 20.01.2007. Бюл. № 2, 2007.
19. *Трещалин И.Д.* // Рос. биотер. журн. – 2002. – **1**, № 2. – С. 145 – 147.
20. *Ефименко И.А., Иванова Н.А.* Координационное соединение палладия и способ его получения. Евразийский патент № 010431 от 29.08.2008. Бюл. изобретений № 4, 2008 г.
21. *Померанцева М.Д., Рамайя Л.И., Чехович Н.В.* // Радиц. биол. радиоэкол. – 1995. – **35**, № 5. – С. 758 – 772.
22. *Ефименко И.А., Локишин Б.В., Иванова Н.А. и др.* Патент № 2089186. 10.09.97.
23. *Трещалин И.Д., Бодягин Д.А., Переверзева Э.Р., Ефименко И.А.* Повышение эффективности лечения злокачественных опухолей с помощью нового комплексного соединения палладия—эфазола в эксперименте: Докл. IV Всерос. науч.-практ. конф. "Отечественные противоопухолевые препараты", М., 16—18 марта 2005 г.
24. *Ефименко И.А., Коновалова Н.П., Волкова Л.М., Иванова Н.А.* Матер. I съезда онкологов стран СНГ, 3—6 декабря 1966 г., М. – С. 156.
25. *Ефименко И.А.* // Кординац. химия. – 1998. – **24**, № 4. – С. 282 – 286.
26. *Ефименко И.А., Морозов И.С., Иванова И.Н., Иванова Н.А.* Способ коррекции вторичного иммунодефицита. Патент № 213858 от 27.09.99.
27. *Захарова И.А.* Некоторые аспекты биокоординационной химии соединений палладия и платины. В кн.: Исследования по неорганической химии и химической технологии. – М.: Наука, 1988. – С. 171 – 182.
28. *Wang Y., Okabe N., Odoko M.* // Chem. Pharm. Bull. – 2005. – **53**, N 10. – P. 1291 – 1295.
29. *Тихомиров А.Г., Иванова И.А., Ерофеева О.С. и др.* // Кординац. химия. – 2003. – **29**, № 7. – С. 525.
30. *Фрисман Э.В., Щагина Л.В., Воробьев В.И., Шаниро Г.В.* // Биохимия. – 1966. – **31**, № 5. – С. 1027 – 1032.
31. *Синтез комплексных соединений металлов платиновой группы / Под ред. И.И. Черняева.* – М.: Наука, 1964. – С. 175.
32. *Kasyanenko N.A., Prokhorova S., Naya E.E.F. et al.* // Colloids Surf. A: Physicochem., Eng Aspects. – 1999. – **148**. – P. 121 – 128.
33. *Касьяненко Н.А., Карымов М.А., Дьяченко С.А. и др.* // Мол. биол. – 1995. – **29**, № 3. – С. 585 – 596.
34. *Касьяненко Н.А., Прохорова С.А., Дьяченко С.А. и др.* // Там же. – 1997. – 31. – С. 299 – 304.
35. *Богданов А.А., Космотынская Ю.В., Яковлев К.И., Касьяненко Н.А.* // Журн. структур. химии. – 2006. – **47**, № 1. – С. 178 – 184.
36. *Smith R.M., Martel A.E.* Critical Stability Constants. – N. Y.: Plenum Press, 1976. – **5**. – P. 257.
37. *Акатьева М.Е., Ерофеева О.С., Добрынина Н.А. и др.* // Кординац. химия. – 2004. – **30**, № 8. – С. 621.
38. *Буслаева Т.М., Умрестно Д.С., Новицкий Г.Г.* Химия и спектроскопия галогенидов платиновых лигандов. – Минск: Изд-во Университетское, 1990. – С. 279.
39. *Elding L.J., Olsson H.F.* // J. Phys. Chem. – 1975. – **82**, N 1. – P. 69.
40. *Касьяненко Н.А., Бартошевич С.Ф., Фрисман Э.В.* // Мол. биол. – 1985. – **21**. – С. 354.
41. *Efimenko I.A., Kurbakova A.P., Motovic Z.D., Ponticelli G.* // Trans. Met. Chem. – 1994. – **19**. – P. 539.
42. *Onoa G.B., Cervantes G., Moreno V., Prieto M.J.* // Nucl. Acids Res. – 1998. – **26**, N 6. – P. 1473 – 1480.