

**ПЕРВИЧНАЯ МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА КРИВЫХ
ПЛАВЛЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ ДНК С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ
ПРЕПАРАТОМ ЦИСПЛАТИН И ЕГО НЕАКТИВНЫМ АНАЛОГОМ
ТРАНСПЛАТИНОМ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ**

Галюк Е.Н.

*к. х. н., ведущий лаборант кафедры биоорганической химии учреждения
образования «Белорусский государственный университет»,
г. Минск, Беларусь
elenagalyuk5@gmail.com*

Ринейская О.Н.

*к. м. н., доцент, заведующий кафедрой биоорганической химии
учреждения образования «Белорусский государственный университет», г.
Минск, Беларусь
ryneiskaya@mail.ru*

В данной статье предлагается метод первичной математической обработки кривых плавления ДНК, полученных методом дифференциальной сканирующей калориметрии, для которых, в отличие от олигонуклеотидных дуплексов, характерны такие искажения, как отклонение от линейности до и после перехода спираль-клубок. Использование метода облегчает интерпретацию результатов исследования комплексов ДНК с противоопухолевыми соединениями платины и определение их термодинамических параметров.

Ключевые слова: *дифференциальные кривые плавления; первичная математическая обработка; ДНК; противоопухолевые соединения платины*

**PRIMARY MATHEMATICAL PROCESSING OF MELTING CURVES
OF DNA-ANTITUMOR DRUG CISPLATIN AND THEIR INACTIVE
ANALOG TRANSPLATIN OBTAINED BY DIFFERENTIAL SCANNING
CALORIMETRY METHOD**

Galyuk E.N.

*Candidate of Chemistry, leading laboratory assistant of the Department of
Bioorganic Chemistry of the Educational Institution "Belarusian State University",
Minsk, Belarus
elenagalyuk5@gmail.com*

Ryneiskaya O.N.

*Candidate of Medical sciences, Associated Professor, the Head of the
Department of Bioorganic Chemistry of the Educational Institution "Belarusian State
University", Minsk, Belarus
ryneiskaya@mail.ru*

The article deals with primary mathematical processing of DNAs melting curves obtained by differential scanning calorimetry method. In contrast of oligonucleotide duplexes these curves have such distortions as deviations from linearity before and after helix-coil transition. This method facilitates results interpretation of DNA antitumor platinum complexes and determination of their thermodynamic parameters.

Key words: differential melting curves; primary mathematical processing; DNA; antitumor platinum drugs

Цисплатин — это эффективный противоопухолевый препарат, который осуществляет свое фармакологическое действие путем сильного координационного связывания с ДНК. Он широко используется для лечения рака яичка, яичников, шейки матки, мочевого пузыря, легких, а также опухолей головы и шеи [1]. Для выяснения деталей механизма действия препарата и было предпринято настоящее исследование.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) широко используется для исследования комплексов противоопухолевых соединений платины и их неактивных аналогов с олигонуклеотидными дуплексами (короткими ДНК) [2]. Однако для платинированных ДНК млекопитающих при использовании ДСК выявляется ряд трудностей, что затрудняют интерпретацию полученных результатов и определение термодинамических параметров комплексов. Поэтому целью исследования была разработка метода первичной математической обработки ДСК кривых для устранения искажений и получения при его использовании неискаженных термограмм, а также вычисления термодинамических параметров комплексов ДНК с противоопухолевым препаратом цисплатин и его неактивным аналогом трансплатином.

Материалы и методы исследования. В данной работе использовался дифференциальный сканирующий нано-калориметр CSC 6300 (Nano-Differential Scanning Calorimeter III (model CSC 6300)). Платинирование ДНК из тимуса теленка (Sigma-Aldrich) проводили инкубацией с цисплатином или трансплатином в 0.01 М NaClO₄ в течение 48 часов при 37°C в темноте, молярное отношение платина / нуклеотид составляло 0.01 и 0.05. Плавление проводили в 0.02М (или 0.1М) NaCl, 0.001М Na₂CO₃, 0.01М NaClO₄, 5·10⁻⁵М EDTA, pH ~7. Концентрация платинированной ДНК составляла 0.7 мг/мл. Переход спираль-клубок ДНК вызывает появление пика в области 63-90°C.

Первичными данными для калориметров подобного типа является тепловой поток (термограмма), т.е. температурная зависимость дополнительной мощности нагревателя ячейки с образцом относительно нагревателя ячейки сравнения $P_s(T)$. Обычно ДСК эксперимент и его первичную математическую обработку проводят по следующей общей схеме: калориметрические измерения начинают с определения инструментальной базовой линии ($P_b(T)$). Для этого первое сканирование проводится для ячеек образца и сравнения, заполненных растворителем. Затем ячейку образца заполняют исследуемым раствором ДНК и

проводят повторное сканирование, которое дает термограмму ДНК ($P_s(T)$). Плавление (переход спираль-клубок) ДНК проявляется в виде ярко выраженного пика теплопоглощения (рисунок 1). Вычитая инструментальную базовую линию из термограммы образца, получают температурную зависимость теплопоглощения $P_s(T)-P_b(T)$. Области до ($T < T_s$) и после ($T > T_e$) пика соответствуют спиральному и денатурированному состояниям ДНК. Они описываются функциями $\varphi_1(T)$ и $\varphi_2(T)$, которые используются для определения базовой линии:

$$b(T) = (1 - \vartheta) \cdot \varphi_1(T) + \vartheta \cdot \varphi_2(T),$$

где $\vartheta(T)$ - доля пар оснований ДНК в расплавленном состоянии. Разность теплопоглощения и базовой линии является избыточным теплопоглощением, обусловленным переходом спираль-клубок ДНК:

$$P_{h-c}(T) = P_s(T) - P_b(T) - b(T).$$

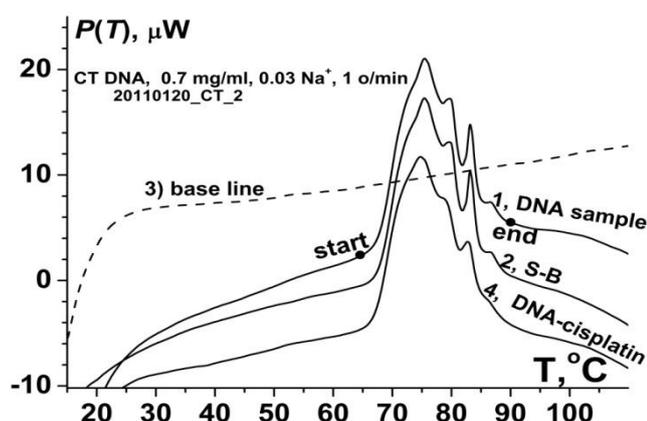


Рисунок 1. Исходная термограмма немодифицированной ДНК до (1) и после (2) вычитания инструментальной базовой линии (3). Термограмма ДНК, химически модифицированной противоопухолевым препаратом цисплатин при ($P_t / \text{нуклеотид} = 0.01$) (4). Скорость нагревания $1^\circ\text{C}/\text{мин}$.

На рисунке 1 представлены результаты сканирования комплекса ДНК тимуса телят с препаратом цисплатин (кривая 1) и приборная базовая линия (кривая 3), наиболее близкая по форме к температурным областям, расположенным до и после температурной области перехода спираль-клубок. В данном случае вычитание приборной базовой линии не приближает исходную кривую $P_s(T)$ (рисунок 1, кривая 1) к кривой перехода спираль-клубок ($P_{h-c}(T)$) (рисунок 1, кривая 2). Из рисунка 1 видно, что температуру начала и особенно завершения перехода спираль-клубок платинированной ДНК невозможно определить однозначно. Поэтому мы разработали процедуру, основанную на использовании первых и вторых производных исходной термограммы. Результаты представлены на рисунке 2.

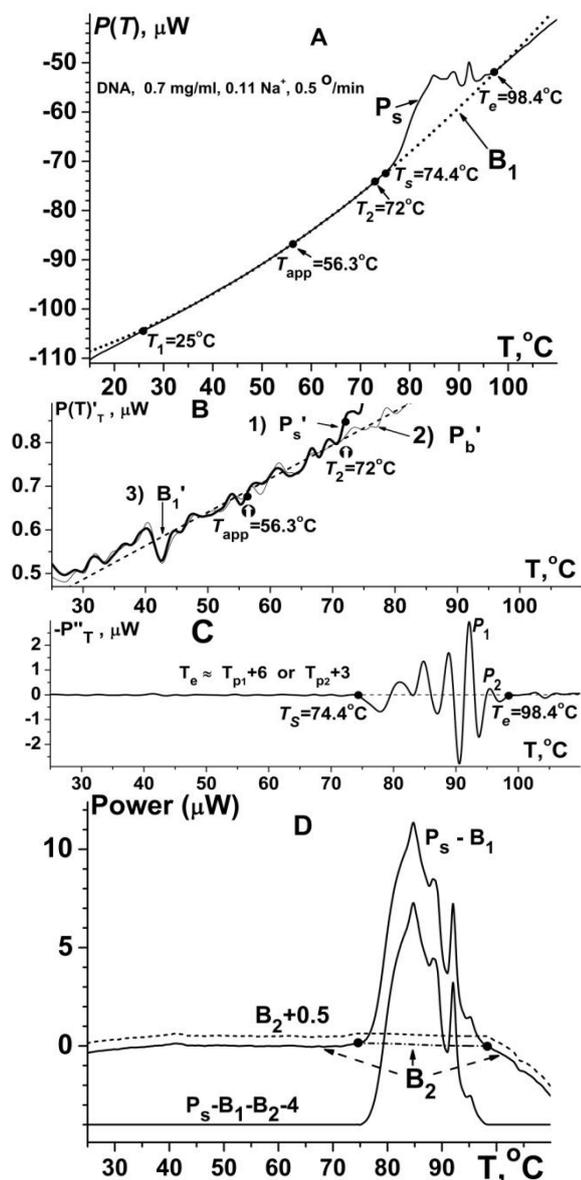


Рисунок 2. Математическая обработка термограммы раствора ДНК $P_s(T)$. **А)** Исходная термограмма $P_s(T)$ и рассчитанная первая базовая линия (B_1), заменяющая инструментальную базу. **В)** Первые производные по температуре исходной термограммы $P_s'(T)$, инструментальной базовой линии $P_b'(T)$ и рассчитанной первой базовой линии $B_1'(T)$. **С)** Вторая отрицательная производная термограммы $[-P_s''(T)]$. **Д)** Разность между исходной кривой и первой базовой линией ($P_s - B_1$), вторая базовая линия до (B_2) и после ($B_2+0.5 \mu\text{W}$) ее смещения на $0.5 \mu\text{W}$. Кривая теплопоглощения перехода спираль-клубок ($P_{h-c} = P_s - B_1 - B_2$), смещенная на $-4 \mu\text{W}$. $T_1=25^{\circ}\text{C}$ и $T_2=72^{\circ}\text{C}$ начало и конец температурного интервала перехода, предшествующего переходу спираль-клубок; $T_s=74.4^{\circ}\text{C}$ и $T_e=98.4^{\circ}\text{C}$ – начало и конец температурного интервала перехода спираль-клубок ДНК; $T_{app}=56.3^{\circ}\text{C}$ – температура, используемая для вычисления первой базовой линии $B_1(T)$.

Нами были обнаружены три особенности используемого калориметра:

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

1) Первые производные термограммы на участке от температуры, превышающей начало регистрации на 150°C , до температуры, соответствующей началу перехода спираль-клубок, являются линейными функциями, на которые накладываются незначительные быстрые шумы и значительно более сильные медленные шумы. Линейность выполняется даже для самых плохих кривых теплопоглощения, полученных в условиях сильной разбалансировки ячеек (рисунок 2В).

2) Аппроксимирующая линейная функция для производных термограммы и приборной базы параллельны и близки по величине. Параллельность сохраняется почти до конца области перехода спираль-клубок. Только в самом конце перехода производная базовой линии отклоняется от аппроксимирующей прямой.

3) Начало (T_s) и конец (T_e) кривых плавления ДНК хорошо определяются на их вторых производных (рисунок 2С).

Изложенные выше данные предполагают возможность замены инструментальной базовой линии неким рассчитанным ее аналогом, который определяется линейной аппроксимацией первой производной термограммы. Из линейной аппроксимации определяется полином второй степени, описывающий функцию B_1 , заменяющую приборную базу $P_b(T)$. Однако предварительные расчеты показали, что первая производная $P_s'(T)$ характеризуется довольно сильными медленными шумами, которые не удаляются даже при сильном сглаживании (расстояние между точками $h=0.1^{\circ}\text{C}$, степень полинома $n=2$, число точек, по которым проводится аппроксимация, $n_p=21$) (рисунок 2В, $P_s'(T)$). Такое сглаживание является настолько сильным, что уменьшает самый высокий пик отрицательной второй производной в десять раз по сравнению с его реально высотой (пик P_1 , рисунок 2С). Как показывают расчеты, быстрые шумы практически полностью подавляются при гораздо более слабом сглаживании (фильтрации) ($h=0.1^{\circ}\text{C}$, $n=3$, $n_p=9$). Для подавления медленных шумов разработана отдельная специальная процедура.

Используя разработанный алгоритм, мы обнаружили, что связывание противоопухолевого препарата цисплатин и его неактивного аналога трансплатина вызывает совсем небольшое изменение температуры плавления ДНК, но приводит к очень сильному уменьшению энтальпии и энтропии перехода спираль-клубок в составе комплексов ДНК с соединениями платины. Для препарата цисплатин уменьшение энтальпии на одну модификацию составляет ~ 23 ккал на моль модификаций. Для его неэффективного аналога трансплатина эта величина еще выше (~ 38 ккал). Однако, несмотря на малое изменение температуры плавления, оба соединения сильно изменяют тонкую структуру дифференциальной кривой плавления.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

Список литературы

1. Wang, D. Cellular processing of platinum anticancer drugs/ D. Wang, S.J. Lippard // Nat. Rev. Drug. Discov. -2005. -V. 4. -P. 307-320.
2. Nunomura, K. The interaction of platinum complexes with DNA studied by differential scanning calorimetry/ K. Nunomura, Y. Maeda, E. Ohtsubo. // J. Gen. Appl. Microbiol. -1991. -V. 37, N2. -P. 207-214.