

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

Факультет хімії та фармації

Кафедра фармакології та технології ліків

Дипломна робота

на здобуття ступеня вищої освіти магістра

на тему: **«Розробка скринінгового методу оцінки афінитету до ДНК,
іммобілізованої в гель»**

Development of a screening method for assessing the affinity to gel-immobilized DNA.

Виконав: студент денної форми навчання
спеціальність 102 Хімія
Сазонов Кирило Дмитрович

Керівник: д. м. н., А.І. Грищук _____

Рецензент: к. х. н., доц. Менчук В.В.

Рекомендовано до захисту:
протокол засідання кафедри
№ __ від __ грудня 2020 р.

Завідувач кафедри
_____ д. м. н., А.І. Грищук.

Захищено на засіданні екзаменаційної
комісії № _____
протокол № __ від «__» _____ 2020 р.
Оцінка _____ / _____ / _____
(за національною шкалою, за шкалою
ECTS, бал)

Голова екзаменаційної комісії
_____ д. х. н., проф. Марцинко Є.Є.

Одеса - 2020

РЕФЕРАТ

Робота присвячена дослідженню афінитету до ДНК похідних інденохіноксаліну–противірусних агентів та індукторів інтерферону– із застосуванням методів конкуренції з етидієм бромідом, оцінки афінитету до ДНК іммобілізованої в гель, дослідженню їх кислотно-основних властивостей.

Робота виконана у Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України у відділі медичної хімії в межах відомчої теми інституту № 259.

Методом конкуренції з бромистим етидієм були визначені константи асоціації з ДНК цих речовин. Потенціометричним титруванням було визначено pK_u водному середовищі.

Показано, що використання 3%-го геля агарози із іммобілізованою ДНК СВРХ призводить до вивільнення НК з гелю у розчин, що спотворює результати експерименту.

Робота виконана на 70 сторінках друкованого тексту, містить 19 рисунків, 6 таблиць, список використаних джерел містить 63 посилань, із них 48 іноземних.

ЗМІСТ

| | |
|---|-----------|
| Список скорочень та умовних позначень | 6 |
| Вступ..... | 7 |
| 1 Огляд літератури..... | 11 |
| 1.1 Рівноваги в нижчих спиртах і у воді..... | 11 |
| 1.1.1 Функція кислотності Гаммета | 12 |
| 1.1.2 Іон водню | 13 |
| 1.2 Сучасні методи експериментального визначення констант дисоціації органічних кислот у розчинах..... | 15 |
| 1.2.1 Потенціометричний метод..... | 15 |
| 1.2.2 Спектрофотометричний метод..... | 17 |
| 1.3 Визначення констант іонізації методом потенціометричного титрування у воді | 19 |
| 1.4 Суть одночасного потенціометричного визначення величин pK та lgP .. | 22 |
| 1.5 Інтеркаляція планарних поліциклічних сполук в ДНК..... | 23 |
| Визначення інтеркаляції..... | 23 |
| Хромофор..... | 24 |
| Інтеркаляція – загальні структурні аспекти..... | 25 |
| Фізико-хімічні аспекти інтеркаляції..... | 28 |
| 1.6 Використання агарозного гелю у експериментах із ДНК..... | 31 |
| 2 Розділ 2. Матеріали та методи дослідження | 34 |
| 2.1.1 Досліджувані сполуки | 34 |
| 2.1.2 Реагенти та допоміжні реактиви | 35 |
| 2.2 Приготування розчинів..... | 35 |
| 2.3 Обладнання | 36 |
| 2.4 Дослідження кислотно-основних властивостей на якісному рівні..... | 36 |
| 2.5 Дослідження способу взаємодії сполук із ДНК на якісному рівні | 37 |
| 2.5.1 Докінг | 37 |

| | | |
|-------|--|-----------|
| 2.5.2 | Приготування вихідних та робочих розчинів | 37 |
| 2.5.3 | Перевірка здатності сполук до інтеркаляції конкуренцією з етидієм бромідом | 38 |
| 2.5.4 | Перевірка здатності сполук до інтеркаляції за спектральними змінами в присутності ДНК..... | 40 |
| 2.6 | Визначення афінітету досліджуваних сполук до ДНК | 40 |
| 2.7 | Приготування гелю та робочих розчинів | 42 |
| | <i>Приготування буферних розчинів</i> | <i>42</i> |
| | <i>Приготування розчину досліджуваної сполуки</i> | <i>43</i> |
| | <i>Приготування гелю</i> | <i>43</i> |
| | <i>Заливка гелю в лунки планшету.....</i> | <i>43</i> |
| 2.8 | Експеримент по визначенню кількості речовини, що дифундує у гель ... | 43 |
| 3 | Обговорення результатів..... | 46 |
| 3.1 | Первинна оцінка кислотно-основних властивостей сполук..... | 46 |
| 3.1.1 | Розрахункова оцінка кислотно-основних властивостей сполук | 46 |
| 3.1.2 | Оглядовий електронний спектр..... | 47 |
| 3.1.3 | Залежність спектрів від кислотності середовища | 49 |
| 3.2 | Потенціометричне визначення рК у водному середовищі | 50 |
| 3.3 | Дослідження способу взаємодії сполук із ДНК на якісному рівні | 52 |
| 3.3.1 | Молекулярний докінг | 52 |
| 3.3.2 | Конкуренція з етидієм бромідом..... | 55 |
| 3.3.3 | Спектрофотометрична перевірка способу взаємодії сполук із ДНК | 57 |
| 3.4 | Визначення афінітету до ДНК конкуренцією з етидієм бромідом..... | 58 |
| 3.4.1 | Визначення концентрацій, що приводять до 50%-го витиснення етидію броміду | 58 |
| 3.5 | Визначення афінітету речовин із використанням іммобілізованої у гель ДНК. | 59 |
| | Висновки | 62 |
| | Література | 63 |

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

| | | |
|----------|---|---|
| TRIS | – | тріс-гідроксиметиламінометан |
| ЕБ | – | етидій бромід |
| ДНК СВРХ | – | ДНК, виділена із селезінки великої рогатої худоби |
| НАН | – | національна академія наук |
| IUPAC | – | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| ADMET | – | absorption, distribution, metabolism, and excretion |
| ЕДС | – | електрорушійна сила |
| МОЕ | – | molecular operating environment |
| ЕДТА | – | етилендіамінтетраоцтова кислота |
| ANOVA | – | analysis of variation |

ВСТУП

Терапія вірусних захворювань до теперішнього часу залишається досить проблематичною. У практиці охорони здоров'я в даний час використовується порівняно невелика кількість протівірусних препаратів. Недолік ефективних і малотоксичних препаратів і можливість формування резистентних штамів збудників зумовлює доцільність пошуку нових терапевтичних засобів. Останнім часом захист населення і свійських тварин від вірусних інфекцій реалізувався за рахунок створення високо вибіркового засобів, які здатні пригнічувати репродукцію вірусів. Такими засобами є – хіміотерапевтичні препарати, сироватки та вакцини, які захистили від інвалідності та передчасної смерті десятки мільйонів людей, а скорочення часу непрацездатності хворих за рахунок їх застосування навіть неможливо підрахувати. Економічний ефект від застосування таких протівірусних засобів сягає десятків мільярдів доларів [1].

Однак, широке використання цих препаратів впродовж останніх 50 років виявило і низку їх суттєвих недоліків та обмежень дієвості принципу, покладеного в основу їх створення.

По-перше, за нещодавньою оцінкою кількість вірусів сягає 10^{31} [2], що з урахуванням швидкості репродукції та частоти мутацій впродовж нормального репродуктивного циклу знімає питання про можливість утворення нових видів та варіантів вірусів, залишаючи відкритим лише питання про час виникнення таких нових вірусів та варіантів [3]. Зрозуміло, що в разі виникнення нового вірусу, чи його варіанту, людство опиняється мало або взагалі незахищеним від цього. Типовими прикладами таких ситуацій є епідемії SARS (2002 – 2003 р) [4], MERS (2012 – 2014 р) [5], EVD (2013 – 2016) [6], ZVD (2015 – 2016 р) [7], COVID-19 (2019 –...) [8], які спричинили загибель більше 20000 людей та стали причиною інвалідності декількох тисяч.

По-друге, використання високо специфічних інгібіторів певних вірус-специфічних процесів є, за суттю, фактором відбору варіанту збудника,

стійкого до цього агенту. Спектр дії відомих протівірусних засобів, як правило, обмежений збудниками однієї інфекції або навіть їх окремими підтипами. Придбана стійкість вірусів до протівірусних препаратів, які застосовуються є ще однією причиною, що спонукає постійно розробляти нові протівірусні препарати і реалізовувати нові підходи до пригнічення репродукції вірусів. Саме за цим механізмом в 60 – 70-т роки минулого сторіччя утворилися стійкі до ремантадину та амантадину варіанти вірусу грипу [9], таким же чином це мало місце із азельтамівіром на початку ХХІ сторіччя [10]. Ця проблема близька і до поширення стійких до антибіотиків штамів бактерій [11], значну роль в якому відіграють дуже подібні до вірусів мобільні генетичні структури бактерій – плазмід.

По-третє, особливості поширення стійкості до антибіотиків серед бактерій та варіантів вірусів, стійких до специфічних етіотропних препаратів, вказують на необхідність розробки агентів широкого спектру дії, які інгібують причому таких, які б не сприяли би відбору стійких мутантів.

Оскільки матрична редуплікація генетичного матеріалу є базовим принципом існування всього живого, саме цей процес доцільно розглядати як мішень потенційних проти інфекційних агентів широкого спектру дії. Будь-який інфекційний агент клітинної організації або вірус незалежно від організації його генному та стратегії репродукції проходить як обов'язкову стадію розплетення двоспінального полінуклеотиду на два односпінальні. Агент, здатний інгібувати чи, принаймні, гальмувати цей процес має стати об'єктом пильної уваги як потенційний протівірусний препарат. Такі агенти добре відомі – це ліганди двоспінальних нуклеїнових кислот – інтеркалятори [12] та ліганди малого жолобу [13]. Останні є переважно специфічними до послідовності нуклеїнових основ і тому мають бути чутливими до мутацій. На відміну від лігандів малого жолобу інтеркалятори неспецифічні до послідовності, внаслідок чого ефективність їхньої взаємодії із мішенню практично не залежить від мутацій [14]. Саме тому ці сполуки і стали об'єктом дослідження у відділі медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О.В.

Богатського НАН України як потенційні противірусні препарати.

Були синтезовані та досліджені як інтеркалятори ДНК і противірусні агенти численні похідні флуоренону, акридину, антрахінону, нафталіміду, ізатину та індохіноксаліну. Встановлено, що практично 70 % сполук, здатних інтеркалювати в ДНК, проявляють водночас властивості противірусних агентів та індукторів інтерферону [15,16].

Похідні індохіноксаліну практично неописані як інтеркалятори ДНК та противірусні агенти, – існує лише одна робота, в якій згадується можливість інтеркаляції в ДНК без надання жодних методичних подробиць та кількісних результатів [17], щодо цих сполук раніше ніколи не проводилися дослідження зв'язку їх властивостей зі структурою. З огляду на планарну структуру та внаслідок цього потенційну здатність до інтеркаляції в ДНК, ці сполуки мали стати об'єктом дослідження.

При дослідженні афінитету похідних індохіноксаліну до ДНК методом конкуренції з ЕБ виникають деякі проблеми. Афінитет деяких сполук неможливо коректно визначити цим методом через спектральні особливості: наприклад, спостережується співпадіння довжини хвилі флуорисценції індохіноксалінів та збудження етидію броміду, що призводить до «перезбудження» останнього і викривлення картини експерименту.

Водночас флуоресценцію сполуки, що вивчається, можна використовувати як зручну форму аналітичного сигналу при дослідженні її концентрації у розчині. Таким чином, використовуючи прилад, спроможний реєструвати флуоресценцію мікрокількості розчину, було б можливо дослідити брак її концентрації, пов'язаний із інтеркаляцією. Єдиною проблемою тут було б відділення, віднімання із загальної флуоресценції флуоресценцію комплексу ДНК-речовина. Рішення цієї проблеми нам вбачається у фізичному розділенні комплексу ДНК-речовина та розчину речовини, що може бути реалізовано за рахунок іммобілізації ДНК (та її комплексів із речовиною) у гелі, наприклад – агарозному.

У зв'язку з цим метою роботи стало дослідження характеру взаємодії

похідних інденохіноксаліну із ДНК, їх афінитет до неї, кислотно-основні властивості цих сполук для формулювання рекомендацій щодо подальшої модифікації структури для підвищення цільової біологічної активності, розробка скринінгового метода оцінки афінитету лігандів ДНК до іммобілізованої в гелі ДНК.

У відповідності до мети поставали наступні завдання:

- на якісному рівні дослідити можливість до інтеркаляції 6-аміноетил-11Н-індено[2,3-*b*]хіноксалін-11-онів молекулярним докінгом;
- на якісному рівні дослідити можливість до інтеркаляції 6-аміноетил-11Н-індено[2,3-*b*]хіноксалін-11-онів та визначити їх афінитет до ДНК в тестах конкуренції з етидієм бромідом та батохромного зсуву з гіпохромізмом в електронних спектрах;
- розрахувати та потенціометрично визначити значення pK сполук;
- провести первинний аналіз (зіставлення) "структура-властивості" та сформулювати рекомендації (як робочі припущення) щодо подальшої модифікації структури інденохіноксалінів.
- відпрацювання методу дослідження афінитету лігандів ДНК до іммобілізованої в гелі ДНК, оцінка потенційних «вузьких місць» та його чутливості, розроблення методики.

ВИСНОВКИ

1. Прототропні процеси в діапазоні рН 1 – 12 мало позначаються на спектрах поглинання досліджуваних сполук, хоча слабкі зміни в спектрах відповідають загальноприйнятним уявленням.
2. Досліджені сполуки є слабкими основами, причому протонується лише аліфатичний атом нітрогену, на відміну від гетероциклічних.
3. Експериментально визначенні значення рК амінометилінденохіноксалінів добре корелюють із розрахунковими значеннями, що дозволяє використовувати останні для оцінки кислотно-основних властивостей цих сполук.
4. За результатами докінгу, наявності батохромного зсуву смуг поглинання сполук в електронних спектрах в присутності ДНК з одночасним гіпохромізмом, та виходячи зі здатності амінометилінденохіноксалінів знижувати інтенсивність флуоресценції етидію броміду, інтеркальованого в ДНК, цим сполукам можна з великим ступенем надійності приписати інтеркаляційний спосіб взаємодії з ДНК.
5. Встановлено, що досліджувані сполуки є високоафінними лігандами ДНК, що дозволяє розглядати їх як потенційні протиінфекційні та протипухлинні агенти, та робить доцільним їхнє подальше дослідження.
6. Показано, що використання 3%-го геля агарози із іммобілізованою ДНК СВРХ призводить до вивільнення НК з гелю у розчин, що спотворює результати експерименту.

JIITEPATYPA

-
- 1 <https://www.cdc.gov/budget/documents/fy2007/fy-2007-cdc-congressional-justification.pdf>
 - 2 Breitbart M., Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? // *Trends Microbiol.* – 2005. – V. 13, № 6. – P. 278 – 284.
 - 3 Drake J.W. The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1999. – V. 870, № . – P. 100 – 107.
 - 4 Smith R.D. Responding to global infectious disease outbreaks: Lessons from SARS on the role of risk perception, communication and management // *Social Science & Medicine.* – 2006. – V. 63, № 12. – P. 3113 – 3123.
 - 5 Zaki A.M., van B.S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia // *N Engl J Med.* – 2012. – V. 367, № 19. – P. 1814 – 1820.
 - 6 Coltart C.E., Lindsey B., Ghinai I., Johnson A.M., Heymann D.L. The Ebola outbreak, 2013-2016: old lessons for new epidemics // *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol Sci.* – 2017. – V. 372, № 1721. – 20160297 (<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0297>)
 - 7 European Centre for Disease Prevention and Control. Zika virus transmission worldwide. – 9 April 2019. Stockholm: ECDC; 2019.
 - 8 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
 - 9 Goedemans W.T. Inhibition of influenza A viruses by adamantanes: rate of resistance development in embryonated eggs and in mice / W.T. Goedemans, C.A. DeBock // *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 1. Abt. Medizinisch-Hygienische Bakteriologie, Virusforschung und Parasitologie. Originale.* – 1970. – Vol. 213, № 4. – P. 462 – 469.

-
- 10 Hay A.J. Oseltamivir resistance during treatment of H7N9 infection / A.J. Hay, F.G. Hayden // *Lancet*. – 2013. – Vol. 381, № 9885. – P. 2230 – 2232.
 - 11 Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам. – 2001. – 168 с. (WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2)
http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy.htm/ru/
 - 12 Lerman L.S. Structural consideration in the interaction of DNA and acridines/ L.S. Lerman // *J. Mol. Biol.* – 1961. – Vol. 3, № 1. – P. 18 – 30.
 - 13 Bailly C. Sequence-Specific DNA Minor Groove Binders. Design and Synthesis of Netropsin and Distamycin Analogues / C.Bailly, J.B. Chaires // *Bioconjug. Chem.* – 1998. – Vol. 9, № 5. – P. 513 – 538.
 - 14 Sturm J., Schreiber L., Daune M. Binding of ligands to a one-dimensional heterogeneous lattice. II. Intercalation of tilorone with DNA and polynucleotides // *Biopolymers*. – 1981. – V. 20, № 4. – P. 765 – 785.
 - 15 Дизайн, синтез та зв'язок структура-властивості в низці інтерферон індукуючих та противірусних лігандів ДНК: Звіт про НДР (заключний) / Фіз.-хім. ін-т ім. О.В. Богатського НАН України. – № ДР 0104U004313. – Одеса, 2006. – 250 с.
 - 16 Синтез, структура, властивості та молекулярне розпізнавання центральними та периферичними рецепторами біологічно активних гетероциклічних сполук та пептидоміметиків: Звіт з НДР (заключний)/Фізико-хімічний інститут ім. О.В Богатського НАН України; № держреєстрації 0104U004313. – Одеса. – 2011. – 302 с.
 - 17 Tseng C.H., Chen Y.R., Tzeng C.C., Liu W., Chou C.K., Chiu C.C., Chen Y.L. Discovery of indeno[1,2-b]quinoxaline derivatives as potential anticanceragents // *Eur.J.Med.Chem.* – 2016. – V. 108, № . – P. 258 – 273.
 - 18 Volgyi G., Ruiz R., Vox K., Comer J., Bosch E. and Takacs-Novak K. Potentiometric and spectrophotometric pKa determination of water-insoluble compounds: Validation study in a new cosolvent system // *Anal. Chim. Acta.* –

-
2007. – Vol. 583, № 2. – P. 418 – 428.
- 19 Avdeef., Comer J. and Thomson S.J., pH-Metriclog. 3. Glass Electrode Calibration in Methanol-Water, Applied to pKa Determination of Water-Insoluble Substances // *Anal. Chem.* – 1993. – Vol. 65. – P. 42 – 49.
 - 20 Гаммет Л. Основы физической органической химии. Скорости, равновесия и механизмы реакций / Пер. с англ. - М.: Мир, 1972. - 534с.
 - 21 Wyatt P.A.H. A chemical hydration treatment of concentrated acid solutions // *Discuss. Faraday Soc.* – 1957. – V. 24, № 0. – P. 162 – 170.
 - 22 Högfeldt E. Relations between the Hammett Acidity Function, H_0 and Ion Activities in Mixtures of strong Acid and Water // *Acta Chem. Scand.* – 1960. – V. 14, № 7. – P. 1627 – 1642
 - 23 Rosenthal D., Dwyer J.S. The acidity function, H_0 , in aqueous concentrated acid and salt solutions // *Can. J. Chem.* – 1963. – V. 41, № 1. – P. 80 – 91.
 - 24 Альберт А., Сергент Е. Константи іонізації кислот і підстав, М., Хімія. – 1964, – 179 с.
 - 25 Митчелл Дж., Смит Д. Акватетрія, М., Хімія. – 1980. – 370 с.
 - 26 Pudipeddi M., . Serajuddin Abu T.M. Trends in solubility of polymorphs // *Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2005. – Vol. 94, № 5. – P. 929 – 939.
 - 27 Chen X-Q., Cho S. J., Li Y., Venkatesh S. Prediction of aqueous solubility of organic compounds using a quantitative structure-property relationship // *Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2002. – Vol. 91, № 8. – P. 1838 – 1852.
 - 28 Репа М.А., Reillo A., Escalera B. And Bustamante P. Solubility parameter of drugs for predicting the solubility profile type within a wide polarity range in solvent mixtures // *International Journal of Pharmaceutics.* – 2006. – Vol. 321, № 1 – 2 . -P. 155 – 161.
 - 29 Sayago A. And Asuero A. G. Spectrophotometric evaluation of stability constants of 1:1 weak complexes from continuous variation data // *International Journal of Pharmaceutics.* – 2006. – Vol. 321, № 1 – 2. – P. 94 – 100.
 - 30 Ruckenstein E. And Shulgin I. Thermodynamic consistency test for the

-
- solubility //International Journal of Pharmaceutics. – 2005. – Vol. 292, № 1 – 2. – P. 87 –94.
- 31 Lerman L.S. Structural consideration in the interaction of DNA and acridines // J. Mol. Biol. – 1961. – Vol. 3. – P. 18 – 30.
- 32 Мецлер Д. Биохимия: В 3 т. / Пер. с англ. – Под ред. А.Е. Браунштейна. – М.: Мир, 1980. – Т. 1: Химические реакции в живой клетке. – 407 с.
- 33 Demeunynck M., Bailly C., Wilson W.D. Small molecule DNA and RNA binders. From synthesis to Nucleic Acid Complexes. – Wiley-VCH Verlag GmbH&Co., 2003. – 732 p.
- 34 Казицына Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. – М.: Высшая Школа. – 1971. – 264 с.
- 35 Пешкова В.М., Громова М.И. Методы абсорбционной спектроскопии в аналитической химии. – М.: Высшая школа. – 1976. – 280 с.
- 36 Saucier J.M., Festy B., LePecq J.B. The change of the torsion of the DNA helix caused by intercalation. II. Measurement of the relative change of torsion induced by various intercalating drugs // Biochimie. – 1971. – Vol. 53, № 9. – P. 973 – 980.
- 37 Waring M.J., Gonzalez A., Jimenez. A, Vazquez D. Intercalative binding to DNA of antitumour drugs derived from 3-nitro-1,8-naphthalic acid // Nucl. Acids Res. – 1979. – Vol. 7, № 1. – P. 217 – 230.
- 38 В. Зенгер. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот: Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 584 с.
- 39 Gamage S.A., Spicer J.A., Atwell G.J., et al. Structure-activity relationships for substituted bis(acridine-4-carboxamides): a new class of anticancer agents // J. Med. Chem. – 1999. – Vol. 42, № 13. – P. 2383 – 2393.
- 40 Sturm J., Schreiber L., Daune M. Binding of ligands to a one-dimensional heterogeneous lattice. II. Intercalation of tilorone with DNA and polynucleotides // Biopolymers. – 1981. – Vol. 20, № 4. – P. 765 – 785.
- 41 Crothers D.M. Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers //

-
- Biopolymers. – 1968. – Vol. 6, № 4. – P. 575 – 584.
- 42 Atwell G.J., Stewart G.M., Leupin W., Denny W.A. A diacridine derivative that binds by bis-intercalation at two contiguous sites on DNA // *J. Am. Chem. Soc.* – 1985. – Vol. 107. – P. 4335 – 4337.
- 43 Peek M.E., Lipscomb L.A., Bertrand J.A., Gao Q., Roques B.P., Garbay-Jaureguiberry C., Williams L.D. DNA distortion in bis-intercalated complexes // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 33, № 13. – P. 3794 – 3800.
- 44 <http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pid=80551125155503&page=0&pdbId=154D>
- 45 Manning G.S. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides // *Q. Rev. Biophys.* 1978. – Vol. 2. – P. 179 – 246.
- 46 Moravek Z., Neidle S., Schneider B. Protein and drug interactions in the minor groove of DNA // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30, № 5. – P. 1182 – 1191.
- 47 Chen H., Liu X., Patel D.J. DNA bending and unwinding associated with actinomycin D antibiotics bound to partially overlapping sites on DNA // *J. Mol. Biol.* – 1996. – Vol. 258. – P. 457 – 479.
- 48 Bailly C., Chaires J.B. Sequence-specific DNA minor groove binders. Design and synthesis of netropsin and distamycin analogues // *Bioconjug. Chem.* – 1998. – Vol. 9, № 5. – P. 513 – 538.
- 49 Graves D.E., Velea L.M. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids // *Cur. Org. Chem.* – 2000. – Vol. 4, № 9. – P. 915 – 929.
- 50 Crenshaw J.M., Graves D.E., Denny W.A. Interactions of acridine antitumor agents with DNA: binding energies and groove preferences // *Biochemistry.* – 1995. – Vol. 34, № 41. – P. 13682 – 13687.
- 51 Haq I. Thermodynamics of drug-DNA interaction // *Arch. Biochem Biophys.* – 2002. – Vol. 403, № 1. – P. 1 – 15.
- 52 Muller W., Crothers D.M. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. 1. The influence of heteroatoms and polarizability on the base

-
- specificity of intercalating ligands // *Eur. J. Biochem.* – 1975. – Vol. 54, № 1. – P. 267 – 277.
- 53 Kovacic P., Wakelin L.P. DNA molecular electrostatic potential: novel perspectives for the mechanism of action of anticancer drugs involving electron transfer and oxidative stress // *Anticancer Drug Des.* – 2001. – Vol. 16, № 4 – 5. – P. 175 – 184.
- 54 Jones R.L., Lanier A.C., Keel R.A., Wilson W.D. The effect of ionic strength on DNA-ligand unwinding angles for acridine and quinoline derivatives // *Nucl. Ac. Res.* – 1980. – Vol. 8, № 7. – P. 1613 – 1624.
- 55 Pullman A., Pullman B. Molecular electrostatic potential of the nucleic acids // *Q. Rev. Biophys.* – 1981. – Vol. 14. – P. 289 – 380.
- 56 Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. 288 с.
- 57 Дипломна робота Мельниченко К
- 58 Дипломна робота Миргородської О
- 59 Дипломна робота Черданцевої Т
- 60 Heiko Ihmels, Daniela Otto Chapter 5 "Intercalation of Organic Dye Molecules into Double-Stranded DNA – General Principles and Recent Developments" in book "Supramolecular Dye Chemistry" (Topics in Current Chemistry, Vol. 258, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005)
- 61 Peltonen K., Colis L., Liu H., Jaamaa S., Moore H.M., Enback J., Laakkonen P., Vaahokari A., Jones R.J., af Hallstrom T.M., Laiho M. Identification of novel p53 pathway activating small-molecule compounds reveals unexpected similarities with known therapeutic agents // *PLoS.One.* – 2010. – V. 5, № 9. – P. e12996
- 62 Antonini I., Polucci P., Kelland L.R., Menta E., Pescalli N., Martelli S. 2,3-Dihydro-1H,7H-pyrimido[5,6,1-de]acridine-1,3,7-trione Derivatives, a Class of Cytotoxic Agents Active on Multidrug-Resistant Cell Lines: Synthesis,

Biological Evaluation, and Structure-Activity Relationships // J.Med.Chem. –
1999. – V. 42, № 14. – P. 2535 – 2541.

63 Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Gel electrophoresis of DNA.

Визначення рК досліджуваних сполук

Приготування 0.1 н водного розчину КОН

В мірну колбу місткістю 1 л відмірюють 100 мл 1 М розчину КОН, 50 мл 3М розчину КСІ. Доводять водою до мітки.

Приготування розчину А

В мірну колбу місткістю 1 л піпеткою Мора вносять 50 мл 3М КСІ, 100 мл 0.1 н НСІ. Доводять водою до мітки.

Проведення холостого експерименту

Відбирають піпеткою Мора 25 мл розчину А в комірку для титрування і титрують дозатором з дискретністю 100 мкм.

Проведення робочого експерименту

Відважують з точністю до 0.0001 г певну кількість речовини (близько 0.1 ммоль). Висипають в бюкс. Додають 25 мл розчину А, розчиняють і титрують дозатором, змінюючи крок титрування залежно від ходу кривої титрування. Після проходження точки еквівалентності, титрування припиняють, визначають об'єм лужного титранту необхідний для напів-нейтралізації зв'язаної сполукою кислоти, додають цей об'єм титранту, 0.1 мл н-октан-1-олу та ретельно перемішують. Вичікують до сталості показань рН-метру, та реєструють їх.

Калібрування піпеточних дозаторів та рН метру

Калібрування піпеточних дозаторів

На аналітичних електронних вагах зважують хімічний стакан. Піпеточним дозатором десять разів додають номінальну кількість дистильованої води, зважуючи стакан після кожного додавання. Отриманні результати – пари значень кількість доданих порцій води та вага – вносять в таблицю даних програми Origin та проводять лінійну апроксимацію. За середнє значення маси води в одній порції приймають нахил прямої. За фактичний об'єм заданого номіналу приймають результат ділення середньої маси однієї порції доданої води на щільність води при температурі калібрування.

Калібрування рН-метру

Занурюють електроди в стандартний розчин з відомим pH і чекають стійкого значення pH , натискають кнопку «Калибровка», потім кнопку «Ввод» та вводять потрібне значення. Потім знову «Ввод» та «Измерение».