ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА СПЕКТРОВ ОПТИЧЕСКОГО ДИАПАЗОНА В ИССЛЕДОВАНИЯХ КИНЕТИКИ РЕАКЦИЙ

© А. Н. Скворцов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; электронный adpec: skvor@mail.cytspb.rssi.ru

Описано применение метода главных компонент для анализа серий данных, получаемых в исследовании кинетики реакций спектральными методами оптического диапазона. Изложен способ применения алгоритма разложения матрицы по сингулярным значениям (SVD) для устойчивого получения главных компонент, обсуждаются достоинства и ограничения метода. Метод с незначительными изменениями может быть использован для количественного анализа оптических спектров во многих задачах молекулярной биофизики. Развиваемый подход применен для анализа кинетики взаимодействия противоопухолевого препарата цисплатина с ДНК и *L*-метионином с помощью спектроскопии УФ-поглощения при низких концентрациях препарата, характерных для биологических систем. Результаты исследования кинетики взаимодействия цисплатина с ДНК и метионином при низких концентрациях платины согласуются с механизмами, которые известны для высоких концентраций.

Ключевые слова: спектроскопия оптического диапазона, кинетические исследования, хемометрика, метод главных компонент, анализ спектров, цисплатин, платиновые препараты.

Принятые сокращения: ГК — главная компонента (principal component), КД — круговой дихроизм, МГК — метод главных компонент, МНК — метод наименьших квадратов, ЯМР — спектроскопия ядерного магнитного резонанса, SVD — разложение матрицы по сингулярным числам (singular value decomposition).

В различных приложениях молекулярной биологии и биофизики часто возникает необходимость быстро и точно оценивать малые концентрации веществ и анализировать их изменение во времени. В этом случае незаменимыми являются спектральные методы оптического диапазона — спектроскопия поглощения и кругового дихроизма (КД) в УФ- и видимой областях, различные флуоресцентные методы. Эти методы сочетают высокую чувствительность, малую инерционность, применимы для биополимеров с высокой или неопределенной молекулярной массой, а также относительно просты и надежны в технической реализации.

В исследованиях, проводимых в нашей лаборатории, спектральные методы оптического диапазона являются основным инструментом исследования взаимодействия белков хроматина, ДНК и противоопухолевых препаратов на основе платины в модельных системах (Стеценко и др., 1990; Skvortsov et al., 2002; Поляничко и др., 2004; Роlyanichko et al., 2006; Galyuk et al., 2008). Согласно существующим представлениям, основной мишенью терапевтического действия платиновых препаратов является ДНК (Reed, 1987; Zamble, Lippard, 1995; Reedijk, 1996; Jamieson, Lippard, 1999; Bruijnincx, Sadler, 2008). Однако на пути к ДНК препарат потенциально может взаимодействовать с большим количеством других молекул клетки (Reedijk, 1999; Bruijnincx, Sadler, 2008). Таким образом, эффективность и селективность платинового препарата в значительной мере определяется конкуренцией во времени между процессами повреждения ДНК и других молекул, в первую очередь серосодержащих аминокислот и их остатков (Reedijk, 1999). По этой причине наибольший интерес для нас представляют динамические характеристики исследуемых систем — механизмы и константы скоростей реакций. Многие из реакций подробно изучены методами спектроскопии ЯМР, но в связи с относительно низкой чувствительностью в ЯМР-экспериментах используются концентрации платины, на два порядка превосходящие характерные концентрации в биологических системах. В то же время известно, что механизмы многих реакций платиновых комплексов зависят от абсолютной концентрации (Wilkinson, 1987). По этой причине в наших исследованиях мы пользуемся более чувствительными методами оптической спектроскопии — спектроскопией поглощения и кругового дихроизма в УФ-области. Платой за высокую чувствительность и простоту оптической спектроскопии являются большая ширина и сильное перекрывание спектральных полос. По этой причине чаще всего невозможно соотнесение спектральных полос и конкретных веществ, а зачастую невозможно даже однозначное разложение спектра на полосы. Поэтому задача расшифровки оптических спектров не ставится, а первоочередное значение приобретает анализ изменений спектров в результате динамических процессов или изменения внешних условий. Задача достаточно проста для двухкомпонентных систем, но большинство исследуемых нами реакций являются многостадийными, и мы столкнулись с проблемой интерпретаций получаемых нами кинетических серий оптических спектров.

Потенциал оптической спектроскопии в многокомпонентных системах резко увеличился за счет прогресса в экспериментальной технике и появления многоканальных фотодетекторов на основе прибора с зарядовой связью (ПЗС). Таким образом, современные приборы измеряют целый спектр за то же время, что и спектральный отклик на одной длине волны, достигая рекордных разрешений по времени и длине волны одновременно. Однако при количественном анализе больших массивов данных, порождаемых такими измерениями, по-прежнему ограничиваются упрощенными редуцирующими методами. При этом отбрасывается большая часть данных, в которых заключена возможность увеличения достоверности и точности определяемых характеристик. Выигрыш, достигнутый за счет прогресса в электронике, никак не реализуется.

На численных моделях нами были опробованы различные методы анализа (Скворцов, Воробьев, 2006), из которых наилучшие результаты показали метод главных компонент (МГК), в биофизике также известный как метод ортогональных спектров. Данный подход не является новым. Принцип разложения по ортогональным спектрам в биофизике применяется как один из методов анализа вторичной структуры белков по спектрам кругового дихроизма (Manavalan, Johnson, 1987; Johnson, 1988; Pancoska et al., 1995), когда все спектры компонентов известны. Целью настоящей работы является демонстрация возможности применения МГК и в том случае, когда спектры компонентов (например, промежуточных продуктов реакции) неизвестны. Метод упомянут во многих пособиях по прикладной спектроскопии и является одним из основных инструментов специальной современной метрологической дисциплины — хемометрики (Кельнер, 2004; Gemperline, 2006; Brereton, 2007). Тем не менее в биофизике метод известен мало и на практике применяется крайне редко, на наш взгляд — весьма незаслуженно. По этой причине в работе обсуждаются принцип метода в общем виде и некоторые детали его реализации. В данном случае мы используем МГК для анализа кинетики реакции, хотя с минимальными изменениями он может быть использован для изучения равновесного связывания, плавления ДНК, титрования и в других рутинных биофизических приложениях.

Основной целью проводимых нами исследований является исследование конкуренции между взаимодействием платиновых препаратов с ДНК и серосодержащими молекулами in vitro при низких концентрациях платины. Поскольку применяемый нами подход является новым в данной области, а поведение систем платина-ДНК-серосодержащие соединения изучено недостаточно, в настоящей работе мы остановились на исследовании известных модельных систем. Было исследовано взаимодействие противоопухолевого препарата цисплатина (*цис*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]) с ДНК и *L*-метионином (*L*-Met). Данные реакции подробно охарактеризованы при высоких концентрациях платины и их механизм установлен с помощью ЯМР (Bancroft et al., 1990; Norman et al., 1992; Murdoch et al., 1993; Barnham et al., 1995; Тулуб, 1998; Neudi et al., 1998; Berners-Price et al., 1999). Это позволяет оценить чувствительность развиваемого подхода и возможности по выявлению промежуточных продуктов. С привлечением оптических методов и МГК стало возможным оценить влияние концентрации платины на ход взаимодействия и проверить переносимость результатов, полученных с помощью ЯМР, на системы с низкой концентрацией платины, характерной для биологических систем.

Материал и методика

Материалы. Использованы высокомолекулярная ДНК тимуса теленка (СТ-ДНК; Sigma-Aldrich, США; без дальнейшей очистки, концентрацию определяли спектрофотометрически), хроматографически чистый *L*-метионин (CalBiochem, Швеция), NaCl, NaClO₄ и HClO₄ категории «хч» отечественного производства. Цисплатин был любезно предоставлен В. Н. Спеваком (кафедра неорганической химии С.-Петербургского государственного технологического института). Цисплатин очищали перекристаллизацией и проверяли спектрофотометрически ($\varepsilon_{301} = 140$ в 0.1 N HCl). Малые количества кристаллического цисплатина (0.5—0.1 мкг) получены полным высушиванием аликвот 1 мг/мл раствора цисплатина в дистиллированной воде.

Спектроскопия поглощения в УФ-диапазоне. Кинетические серии записывали на сканирующем двухлучевом спектрофотометре Specord M40 (Karl Zeiss, Германия), сопряженном с РС-совместимой системой сбора данных. Реакцию проводили непосредственно в герметично закрытых прямоугольных кварцевых кюветах с объемом 2.7 мл и длиной оптического пути 0.5 см, термостатируемых с помощью внешнего водяного термостата, температура кюветы 37 ± 0.5 °С. Спектры измеряли в интервале 50—30 тыс. см⁻¹ (200—333 нм) с шагом 80 см⁻¹. Время одного прохода 1.0—2.5 мин, типичное число проходов 70—150, интервал 10—15 мин. Интервал между начальными проходами был уменьшен для более точной характеристики возможных быстрых начальных стадий. Дрейф нуля прибора в течение 1 сут — не более 0.01 % Т в максимуме, в среднем — 0.002 % Т.

Гидролиз цисплатина. Кристаллический цисплатин растворяли непосредственно в момент начала реакции в подогретом до 37 °С растворе $NaClO_4/HClO_4$ при сильном встряхивании в течение 3 мин, [Pt] — 50—200 мкМ, затем начинали сбор спектров. $NaClO_4/HClO_4$ (ионы в растворе не образуют координационных связей с платиной (II)) препятствуют депротонированию продуктов гидролиза и их выпадению в осадок и поддерживают постоянной ионную силу раствора, которая влияет на реакции заряженных платиновых комплексов (Wilkinson, 1987).

Реакции цисплатина с ДНК и L-метионином. Кристаллический цисплатин (0.1 мг) растворяли непосредственно перед началом эксперимента в 1 М растворе NaCl (для максимального подавления предварительного гидролиза). В начальный момент реакции раствор цисплатина (типичный объем 10-20 мкл) добавляли в кювету к раствору СТ-ДНК (40 мкг/мл) до требуемого входного соотношения [Pt] : [P]. Концентрацию [Cl-] подбирали с учетом NaCl, вносимого с цисплатином. В аналогичных экспериментах с L-Met в начальный момент реакции раствор вносили в кювету с раствором L-Met до [Pt]-50 мкМ, [Pt] : [S]-1 : 10, [NaCl]-15 мМ. Буферные системы не использовали во избежание осложнений, вызванных известным взаимодействием цисплатина с основаниями буферных систем (Prenzler, McFadyen, 1997). Начальный pH растворов ДНК и L-Met составлял 6.0—6.2.

Метод главных компонент исследования кинетики реакций

Рассмотрим задачу исследования кинетики с помощью спектроскопии в наиболее общем виде. Допустим, что в исследуемой системе в процессе реакции присутствуют К спектрально различных компонентов. В качестве компонентов могут выступать как различные вещества, так и разные состояния одного вещества. С течением времени концентрации компонентов $C_k(t_i)$ ($t_i - M$ моментов времени, при которых измерены спектры) меняются и соответственно меняется спектральный отклик системы У (поглощение, КД, флуоресценция). Искомыми величинами кинетического эксперимента являются константы скоростей реакций к. Для того чтобы определить к, необходимо построить схему реакции и уметь аналитически или численно решать соответствующие кинетические уравнения (Gemperline, 2006). Затем путем подбора к нужно добиться наилучшего соответствия модельного решения и экспериментально определенных $C_k(t_i)$. Для решения последней задачи нелинейный метод наименьших квадратов (МНК) в настоящее время почти не имеет альтернативы. Критерием соответствия в МНК является

$$R(\kappa) = \sum_{ik} [C_k(t_i) - C'_k(t_i; \kappa)]^2 = \min, \ k = 1...K, \ i = 1...M, (1)$$

где *R* — остаточная разность квадратов. При необходимости можно учесть неравноточность определения C_k , снабдив слагаемые статистическим весом. Относительную справедливость той или иной кинетической модели в МНК можно оценить, сравнивая остаточные разности квадратов *R* для различных моделей, например, с помощью *F*-критерия (Ллойд и др., 1989, 1990; Gemperline, 2006). Типичные кинетические схемы содержат помимо дифференциальных кинетических уравнений также линейные стехиометрические уравнения, которые связывают между собой $C'_{k}(t;\kappa)$. В силу наличия этих уравнений количество линейно независимых концентраций Р меньше, чем число компонентов К в системе. Например, в реакции A + B → C только одна независимая концентрация, так как [A] + [C] = [A]₀ + [C]₀ и [B] + [C] = [B]₀ + + [C]₀. Таким образом, К величин $C'_{k}(t;\kappa)$ являются невырожденной линейной комбинацией Р функций времени и константы (равновесного значения, $t \to \infty$).

$$(C'_k t; \kappa = A_{0k}(\kappa) + \sum_p A_{pk}(\kappa) f_p(t; \kappa)), p = 1...P, P \le K.(2)$$

Функции $f_p(t, \kappa)$ содержат в себе всю зависимость от времени, в то время как коэффициенты разложения A зависят только от констант скоростей и начальных условий. Опустим зависимость коэффициентов A_0 и A_p от κ и будем также считать их свободно подбираемыми параметрами процедуры МНК наряду с κ . Расширенная таким образом модель вида

$$D(t; \kappa) = A_0 + \sum_p A_p f_p(t; \kappa); p = 1...P$$
(3)

может использоваться для описания как концентраций $C_k(t)$, так и любой линейной комбинации $C_k(t)$.

Теперь обратимся к проблеме определения концентраций по спектрам. Допустим, что спектральный отклик $Y(w_i, t)$ измерен синхронно в N точках, различающихся значением длины волны w_i . В приборах с разверткой спектра измерения при разных длинах волн несинхронны, но можно произвести интерполяционную поправку или вообще пренебречь этим фактом, если время сбора спектра намного меньше характерного времени реакции. Каждый спектр может рассматриваться как вектор \mathbf{Y}_i в пространстве \mathbf{R}^N — фазовом пространстве спектров. M измерений в разные моменты времени t_i образуют экспериментальную матрицу Y_{ij} размерности $N \times M$, столбцами которой являются измеренные последовательно векторы-спектры. Ключевым предположением, без которого определение концентрации веществ в смеси вряд ли возможно, является линейность спектрального отклика системы по концентрациям

$$Y'(w,t_j) = \sum_{k} \phi_k(w) C'_k(t_j), \quad k = 1,...,K,$$
(4)

где $C'_{k}(t_{i})$ — концентрация *k*-ого компонента системы, $\varphi_k(w)$ — его удельный спектр (соответствующий единичной концентрации), К — число спектрально различных компонент. В матричной записи выражение (4) выглядит как $Y' = \Phi C'$. С точки зрения векторной алгебры оно означает что теоретические спектры Y'_{ii} образуют в \mathbf{R}^N линейное подпространство размерности К, образованное векторами ϕ_k . Мы считаем, что K < N, так как число точек в спектре обычно превосходит число исследуемых концентраций. Поскольку $C'_{k}(t_{i})$ линейно зависимы (2), размерность подпространства (ранг матрицы С') может быть еще меньше — она не превосходит P + 1 (единица возникает в силу наличия констант A_0p в (2)). Экспериментальный спектр кроме детерминированной составляющей (4) также содержит шум. По этой причине нельзя найти равенство между (4) и экспериментальными значениями *Y_{ii}*, можно искать только наилучшее соответствие. В качестве меры соответствия снова используется МНК, на этот раз — линейный

$$R = \sum_{ij} [Y_{ij} - \sum_k \varphi_k(w_i) C_k(t_j)]^2 = \min,$$

$$i = 1...N, \ j = 1...M, \ k = K.$$
(5)

Эта задача имеет стереотипное решение только в том случае, когда ϕ_k известны. Но и в этом случае отыскать все C_k не всегда представляется возможным в силу сильного перекрывания линий в оптических спектрах: отдельные ϕ_k зачастую почти параллельны друг другу и их набор близок к вырожденному. Однако если пользоваться вместо точной кинетической модели выражением (3), то искать концентрации не обязательно. Достаточно найти любое разложение вида (4) с некоторыми линейно независимыми векторами ϕ_k . При этом C_k в (5) становятся условными «приведенными концентрациями», которые являются линейными комбинациями истинных концентраций. Тем не менее для модели вида (3) это несущественно, необходимо только, чтобы количество независимо определенных приведенных концентраций было не менее P + 1. Платой за отказ от определения истинных концентраций является увеличение количества варьируемых параметров в (3) на $\sim P^2$ по сравнению с точной кинетической моделью. Отчасти этот недостаток может быть скомпенсирован увеличением числа измерений М и созданием условия *M* ≫ *P*. Для вычисления приведенных концентраций решающим является выбор «спектров» ϕ_k .

Наиболее традиционный и примитивный метод состоит в том, чтобы выбрать K длин волн, на которых изменения максимальны (характерные длины волн), измерения на прочих длинах волн отбросить. Тогда возможно точное соответствие модели и эксперимента, а условие минимума (5) превращается в уравнение R = 0. В качестве набора $\{\phi_k\}$ можно взять любой базис пространства **R^{K}**, например декартов (в качестве условных концентраций будут выступать сами спектральные отклики на характерных длинах волн). Обычно так поступают, когда в системе присутствует одна независимая концентрация: берут одну длину волны, извлекают ее изменения и анализируют их нелинейным МНК. Выигрыш, достигаемый записью всего спектра при таком подходе, не реализуется, так как информация, содержащаяся в спектральном отклике на других длинах волн, не используется. Подчеркнуть ущербность такого усечения можно следующим образом. В двумерном случае N = 2 задача (5) соответствует проведению прямой линии методом МНК по точкам на плоскости, а усечение соответствует проведению прямой через наугад выбранные крайние точки! Существуют также другие методы выбора базиса $\{ \boldsymbol{\varphi}_k \}$: разложение на спектральные профили, эталонные спектры; методы регуляризации и др. Но наилучшим решением является применение метода главных компонент (МГК), который универсален и не требует вспомогательных данных. В качестве $\{\phi_k\}$ в МГК предлагается взять главные компоненты (ГК, PC — principal components) — старшие *K* собственных векторов матрицы Грама Y^TY (см. например: Gemperline, 2006). Для их нахождения наиболее правильно использовать стереотипный вычислительный метод SVD (singular value decomposition), широко применяемый для решения линейных уравнений с вырожденной или почти вырожденной матрицей (Stoer, Burlich, 1993; Голуб, Ван Лоун, 1999) и включенный во многие вычислительные пакеты. В результате процедуры SVD экспериментальная матрица *У* представляется в виде

$$Y = UWV^{\mathrm{T}},\tag{6}$$

где U — матрица $N \times M$, столбцами которой являются главные компоненты (известные также как ортогональные спектры) — нормированные взаимно перпендикулярные собственные векторы матрицы Грама; W — диагональная матрица $M \times M$, на диагонали которой стоят в порядке убывания соответствующие главным компонентам сингулярные числа — квадратные корни всех собственных чисел матрицы $Y^{T}Y$ и далее нули. Матрица Vпредставляет собой ортогональную матрицу $M \times M$, осуществляющую разложение исходных экспериментальных спектров по ГК (матрица счетов — score matrix). Первые (старшие) K главных компонент, взятые в качестве { ϕ_k }, осуществляют разложение вида (4), обладающее свойством (5).

Таким образом, в МГК мы заменяем M реальных спектров на K главных компонент, а концентрации — на соответствующие коэффициенты разложения. Сами ГК в общем случае не имеют отношения к спектрам реальных компонент — это промежуточное математическое построение. Смысл имеет только зависимость коэффициентов от времени. Отсутствие прямого физического смысла у главных компонент следует признать очевидным и наиболее важным недостатком МГК. Высокая вычислительная сложность SVD при современном прогрессе техники недостатком уже не является.

В то же время SVD-разложение является наилучшим из всех разложений вида (5) по многим показателям. Во-первых, оно является достаточным, т. е. использует всю информацию, заключенную в элементах матрицы *Y*. Во-вторых, в силу ортогональности ГК счета, соответствующие разным ГК, статистически независимы, поэтому метод обладает наибольшей возможной устойчивостью к случайным ошибкам (Ллойд и др., 1989, 1990; Brereton, 2007). В-третьих, SVD-разложение однозначно (для ненулевых сингулярных чисел) вычисляется с высокой точностью за конечное число шагов (Stoer, Burlich, 1993), поэтому не требуется визуального контроля качества приближения и не вносится субъективный элемент.

Кроме того, метод позволяет определить количество значимых линейно независимых концентраций в системе, основываясь только на анализируемых данных. В самом деле, экспериментальную матрицу *Y* можно представить в виде суммы

$$Y_{ij} = \sum_k \varphi_k(w_i) C_k(t_j) + \Delta_{ij}, \ k = 1...K,$$

где Δ_{ii} — случайная матрица. Из *М* главных компонент *К* описывают неслучайное поведение системы, а оставшиеся — шум. Квадрат сингулярного числа, соответствующего некоторой ГК, равен вариации, описываемой этой ГК. Для чисто случайной матрицы сингулярные числа ложатся на плавную кривую. Наличие неслучайных составляющих приводит к резкому увеличению вариации старших ГК по сравнению с остальными, что четко видно по сингулярным числам и может быть обнаружено с помощью разных статистических критериев (Gemperline, 2006). Другой критерий выбора К основан на анализе остаточной разности квадратов R в (5), которая равна сумме квадратов сингулярных чисел с номерами с K + 1по М. Поделив эту сумму на число степеней свободы $N \cdot (M - K)$, мы получим оценку остаточной дисперсии шума. Если известна дисперсия экспериментального шума, то можно произвести сравнение дисперсий с помощью *F*-теста и определить количество значимых ГК. Для справедливого использования этих критериев также важно, что все ϕ_k ортогональны, поэтому их нельзя переносить на другие методы разложения. Нежелательно также пользоваться методами сглаживания спектров, которые перераспределяют ошибки и делают случайные отклонения на разных длинах волн взаимозависимыми.

Отметим очень важное обстоятельство. Количество K_{SVD} значимых ϕ_k и соответственно концентраций в модели вида (4), определяемое с помощью МГК, является максимально обоснованным — оно показывает реальное соотношение неслучайных изменений и шума в данном экспериментальном наборе (Ллойд и др., 1989; Pancoska et al., 1995; Gemperline, 2006). Никакие другие наборы векторов не могут дать статистически обоснованного улучшения по сравнению с главными компонентами. Поэтому использование в (5) любого набора спектров { ϕ_k } размером больше K_{SVD} заранее обречено на неустойчивость и статистическую ненадежность.

В нашей работе мы использовали наиболее прямой вариант МГК — без центровки, нормировки, сглаживания и коррекции на синхронность измерений (изучаемые процессы достаточно медленные по сравнению со временем сканирования). Из всех измеренных M спектров вычитали спектр растворителя (базовая линия). Образованную матрицу Y_{ij} умножали на $1/(\langle Y_{ij}^2 \rangle)^{1/2}$ — это масштабирование было предназначено для уменьшения риска переполнений при вычислениях. Впоследствии масштабный коэффициент относили к сингулярным числам. Затем вычисляли SVD-разложения матрицы Y. Ситуацию M > N особо не учитывали, алгоритм SVD работает и в этом случае: младшие (M - N) сингулярных чисел тождественно равны нулю при M > N. Приведенные концентрации вычисляли путем умножения строк матрицы счетов V^T на соответствующие сингулярные числа (чтобы учесть их различную статистическую значимость для нелинейной модели) и анализировали нелинейным МНК. Главные компоненты определяются с точностью до направления (нет принципиальной разницы между ϕ_k и $-\phi_k$), поэтому для сравнения ГК разных разложений в ряде случаев одновременно умножали ГК и соответствующую приведенную концентрацию на -1.

Программа для SVD-разложения и визуализации результатов была выполнена в программной среде Delphi. Были использованы реализации SVD-разложения из открытой межъязыковой библиотеки aлгоритмов ALGLIB (http://www.alglib.net) и из библиотеки VECTORS A. Чернобаева (http://www.torry.net/authorsmore.php?id=2515). Программы проверены на тестовых задачах. Нелинейный МНК-анализ для моделей, допускающих аналитическое решение, проводили в пакете Microcal Origin 5.0.

Результаты и обсуждение

Гидролиз цисплатина, согласно классическому механизму действия платиновых препаратов, является необходимой стадией, предшествующей повреждению биомолекул. Сама молекула цисплатина или его аналога не способна напрямую взаимодействовать с ДНК, поэтому гидролиз является лимитирующей стадией в реакциях биологически активных платиновых комплексов с большинством биомолекул (Lippard, 1999; Reedijk, 1999), за исключением некоторых серосодержащих (Barnham et al., 1995; Berners-Price et al., 1999). Гидролиз цисплатина представляет собой двухстадийный равновесный процесс (Reishus, Martin, 1961):

> μuc -[Pt(NH₃)₂Cl₂] (цисплатин) + H₂O \leftrightarrow μuc -[Pt(NH₃)(H₂O)Cl]Cl, μuc -[Pt(NH₃)(H₂O)Cl]Cl + H₂O \leftrightarrow μuc -[Pt(NH₃)(H₂O)₂Cl₂]Cl₂.

Константы диссоциации — порядка 10^{-2} — 10^{-3} M (Reishus, Martin, 1961; Coley, Martin, 1973), поэтому при характерной для межклеточных жидкостей [Cl-] (100—150 мМ) большая часть цисплатина не гидролизована. Гидролиз, согласно классической схеме, происходит при проникновении препарата в клетку, где [Cl-] понижена (~10 мМ). Вторая стадия гидролиза в живых системах, скорее всего, не реализуется, поскольку аквакомплекс [Pt(NH₃)₂(H₂O)Cl]⁺ высокоактивен и быстро вступает во взаимодействие с биомолекулами (Bancroft et al., 1990; Тулуб, 1998; Berners-Price et al., 1999).

Изменение спектра поглощения цисплатина в УФ-области в течение 8 ч после растворения в 5 мМ HClO₄ представлено на рис. 1, *а*. Сами терапевтические комплексы платины не обладают выраженными оптическими свойствами, поэтому для получения спектров с высоким соотношением сигнал/шум приходится использовать высокие [Pt], в нашем случае 200 мМ. Изменения сопровождаются сдвигом *d*—*d*-перехода платины из области

~300 нм в область ~250 нм и исчезновением полос переноса заряда хлоридного лиганда (~210 нм). В данном случае можно выбрать длину волны 210 нм и использовать D₂₁₀ в качестве кинетической кривой. Однако, как было указано выше, такой подход неэффективен. Применим МГК к спектрам, изображенным на рис. 1, а. Полученные главные компоненты и сингулярные числа представлены на рис. 1, б, в. На рис. 1, в четко видно, что три старших сингулярных числа w1-w3 значительно отклоняются от плавной кривой, образуемой остальными сингулярными числами. Таким образом, экспериментальные данные содержат три линейно независимые спектральные составляющие, остальные ГК и приведенные концентрации описывают шум (по этой причине они не показаны на рис. 1, δ). Отметим, что кривая, которую образуют сингулярные числа с n > 3, несколько отличается от кривой, полученной для чисто случайной матрицы (рис. 1, в, кривая 2). Отклонения обусловлены наличием аппаратного сглаживания в приборе Specord M40, которое переводит «высокочастотную» ошибку, описываемую w_n с большими *п* в плавно изменяющуюся, соответствующую *w_n* с малыми п. Три главные компоненты соответствуют описанию двух независимо меняющихся концентраций и равновесного состояния, что соответствует кинетической схеме гидролиза цисплатина $A \leftrightarrow B + D \leftrightarrow C + 2D$ с материальными уравнениями $[A] + [B] + [C] = [A]_0, 2[A] +$ $+ [B] + [D] = 2[A]_0 + [D]_0$. В то же время число w_3 составляет мене 0.1 % от суммы w_1 и w_2 , поэтому практически система выглядит как двухкомпонентная. Объясняется это доминированием прямой реакции первой стадии гидролиза в исследуемом процессе и малым спектральным различием между [Pt(NH₃)(H₂O)Cl₂]⁺ и [Pt(NH₃)(H₂O)₂]²⁺ (выражаемых в конечном счете через ГК-3). Приведенные концентрации изображены на рис. 1, г. Отметим, что МГК приводит в данном случае к настолько эффективному исключению шума (уходящего в счета ГК с n > 3), что кинетические кривые выглядят совершенно гладкими.

Полезным способом представления данных МГК является построение сечений фазового пространства. Поскольку каждый спектр представляет собой точку в фазовом пространстве **R**^N, кинетическая серия представляет собой в R^N кривую (гладкую в идеале) — фазовую траекторию. МГК позволяет статистически обоснованно сузить размерность фазового пространства до достаточного минимума. Построение приведенных концентраций друг против друга дает взаимно перпендикулярные сечения фазового пространства, образуемые соответствующими ГК и содержащие фазовую траекторию. Фазовая траектория описанной выше реакции изображена на рис. 2 (кривая 2). Поскольку система приблизительно двухкомпонентная, фазовая траектория представляет собой почти прямую линию. На рис. 2 также показаны фазовые траектории реакции гидролиза в условиях нейтральных рН (рис. 2, кривая 1) и обратных реакций гидролиза, осуществленных путем добавления к равновесному состоянию гидролиза 1 мМ NaCl (кинетика не измерена), затем увеличения [NaCl] до 5 мМ (рис. 2, кривая 3) и затем еще до 20 мМ (рис. 2, кривая 4). Все траектории на рис. 2 почти параллельны. Это указывает на то, что все исследованные системы содержат только два основных спектрально различных вещества, в данном случае — цисплатин и моноаквакатион, сумма концентраций которых постоянна. Отметим, что на нашей аппаратуре трудно добиться полного совпадения фазовых траекторий даже в последователь-



Рис. 1. Разложение кинетической серии спектров для прямой реакции гидролиза цисплатина на главные компоненты (ГК). *a* — исходный набор спектров, *стрелки* указывают направление изменений во времени; *б* — три старших ГК; *в* — сингулярные числа, *кривая 1* — экспериментальная матрица, *кривая 2* — случайная матрица того же размера; *г* — три старшие приведенные концентрации. Условия: 37 °C, 5 мМ HClO₄, [Pt] = 200 мкМ. Число спектров *M* = 69, размерность спектра *N* = 251.

ных реакциях. Это вызвано как низкой относительной точностью дозирования малых концентраций по сравнению с точностью измерения оптической плотности, так и смещением нуля при перемещении кюветы для добавления реагентов.

Кинетические кривые были проанализированы нелинейным МНК в модели необратимой реакции псевдопервого порядка в рамках приближения (3), в предположении, что в первых двух системах доминирует прямая реакция первой стадии гидролиза ($\kappa_{eff} \approx \kappa_1$), а в реакциях с NaCl — обратная реакция первой стадии ($\kappa_{eff} \approx \kappa_1$). Для прямых реакций κ_{eff} составили (1.032 ± 0.004) · 10⁻⁴ с⁻¹ и (1.154 ± 0.002) · 10⁻⁴ с⁻¹ для кислой и нейтральной сред соответственно. По результатам литературы, константа κ_1 первой ступени гидролиза цисплатина, измеренная разными методами, составляет (1.2 - 0.8) · 10⁻⁴ с⁻¹ (Bancroft et al., 1990). Для обратных реакций с 5 и 20 мМ [Cl-] най-

дены константы $(2.54 \pm 0.03) \cdot 10^{-4} c^{-1}$ и $(8.9 \pm 0.4) \cdot 10^{-4} c^{-1}$, что соответствует значению κ_{-1} 0.05 $M^{-1} c^{-1}$ и константе равновесия первой стадии, равной $2 \cdot 10^{-3}$ М, что также соответствует данным литературы (Coley, Martin, 1973). Конечные и начальные состояния, найденные с помощью МНК, и теоретические фазовые траектории могут быть спроектированы на фазовое пространство, как изображено на рис. 2. Видно, что экспериментальная кривая воспроизводимо отклоняется от прямой линии, что, собственно, объясняется тем, что мы пренебрегли ГК-3 и второй ступенью гидролиза.

Взаимодействие цисплатина с высокомолекулярной ДНК. ДНК представляет собой терапевтическую мишень противоопухолевых препаратов, поэтому платинирование ДНК in vitro изучено очень подробно (Jamieson, Lippard, 1999). Показано, что образованный при гидролизе аквакомплекс присоединяется преимуще-



Рис. 2. Сечение фазового пространства спектров реакции гидролиза цисплатина, образуемое двумя старшими ГК.

I — гидролиз цисплатина в 10 мМ HClO4, pH 6; 2 — гидролиз цисплатина в 5 мМ HClO4, pH 2.3; 3 — увеличение [NaCl] от 1 до 5 мМ; 4 — увеличение [NaCl] от 5 до 20 мМ, 37 °С. Начальные и конечные состояния, обозначенные S и F, определены с помощью анализа кинетических кривых по модели псевдопервого порядка нелинейными МНК. Стрелка указывает направление изменений во времени.

ственно к N⁷ гуаниновых оснований, образуя монофункциональный аддукт. Затем in situ происходят гидролиз второго хлоридного лиганда и образование сшивки (Bancroft et al., 1990). Наиболее стабильны внутрицепочечные сшивки соседних оснований в последовательностях GG и AG, они образуются в наибольших количествах (Fichtinger-Schepman et al., 1985). В отличие от монофункциональных аддуктов сшивки вызывают структурные искажения двойной спирали ДНК, которые в конечном итоге являются причиной гибели клетки. Нарушения структуры двойной спирали немедленно сказываются на оптических спектрах ДНК (De Voe, Tinoco, 1962). Таким образом, в этом случае мы наблюдаем образование не индивидуальных продуктов, а среднестатистическое повреждение структуры ДНК.

Мы провели исследования реакции высокомолекулярной ДНК с цисплатином при различных соотношениях платина/нуклеотид [Pt]: [P] — 1:5, 1:15, 1:50 и 1:150; последний случай соответствует субмикромолярной [Pt]. Во всех случаях наблюдались значимые спектральные изменения (рис. 3). Поскольку скорость образования связей с ДНК на порядки превосходит скорости гидролиза хлоридных лигандов, процесс взаимодействия ДНК выглядит как двухстадийный, а скорость стадий зависит от [Cl-]. С течением времени экситонная полоса поглощения ДНК на 260 нм увеличивается по интенсивности и смещается в область больших длин волн, что свидетельствует о нарушении идеальности двойной спирали (De Voe, Tinoco, 1962). Эти изменения при МГК-анализе выражаются ГК-2 (рис. 3, а). Еще раз напомним, что главные компоненты являются промежуточными абстрактными конструкциями, они не имеют в общем случае соответствия с конкретными веществами или стадиями реакции. ГК представляют собой взаимно независимые спектральные изменения за исследуемый период, расположенные в порядке убывания их значимости, при этом ГК-1 в выбранной нами реализации метода содержит также среднее значение спектрального отклика (средние значения всех остальных ГК равны нулю). Прямой физико-химический смысл имеет только вид зависимости приведенных концентраций от времени. Ход реакции сопровождается увеличением вклада ГК-2 в спектр (рис. 3, б), таким образом, поглощение в области 240-270 нм уменьшается (ГК-2 меньше нуля), а в области 270-310 нм возрастает (ГК-2 больше нуля), что соответствует вышеупомянутому сдвигу полосы ДНК. Увеличение интенсивности полосы поглощения ДНК при 260 нм описывается ростом вклада ГК-1, который имеет схожую зависимость от времени (на рис. 3 не показан).



Рис. 3. Анализ кинетических серий спектров для реакции цисплатина с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка при различных соотношениях.

а — старшие ГК; *б* — приведенные концентрации, соответствующие ГК-2, полученные совместным анализом 4 кинетических серий. Условия: 37 °С, 10 мМ NaCl, [ДНК] = 40 мкг/мл [Pt] : [P] составляет 1 : 5—1 : 150.

Влияние соотношения платина/нуклеотид на изменение оптических спектров в реакции цисплатина с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка

		Число знанимых
Coortholie $\kappa_{eff}, \times 10^5 \mathrm{c}^{-1}$ [Pt] : [P]	w_2/w_1	главных ком- понент
$1:5$ 2.45 ± 0.02 $1:15$ 2.01 ± 0.02 $1:50$ 2.20 ± 0.20	0.0260 0.0130 0.0074	4 3 3
1:150 2.25 ± 0.07	0.0029	3

Наиболее вероятно, что составляющая изменений спектра, выражаемая ГК-2, вызвана в основном образованием структурных повреждений — платиновых сшивок. В пользу этого свидетельствует и загиб начального участка кинетических кривых (рис. 3, б). Отметим, что кинетические кривые, изображенные на рис. 3, б, получены совместным МГК-анализом всех четырех кинетических серий после их выравнивания по концентрации ДНК. Сама возможность такого анализа наряду со слабой зависимостью формы ГК-2 от соотношений [Pt] : [P], полученных независимым применением МГК в каждой серии, указывает на то, что основное направление реакции при разных соотношениях одинаково. Сравнение ГК имеет смысл только в случае, когда поведение сходных систем измерено на одинаковых промежутках времени (как в нашем случае) либо когда кинетические серии промерены до достижения равновесного состояния.

Кинетические кривые за период 2—22 ч (без начального участка) были проанализированы нелинейным МНК в модели псевдопервого порядка. Результаты МНК, а также количество значимых ГК приведены в таблице. Относительное количество образовавшихся аддуктов можно охарактеризовать отношением w_2 (величины изменений вклада ГК-2) к w_1 (пропорциональному концентрации нуклеотидов). Отношения w_2/w_1 для разных соотношений [Pt] : [P] также приведены в таблице.

Полученные нами данные согласуются с имеющимися представлениями о процессе платинирования ДНК in vitro. Во-первых, скорость спектральных изменений не зависит существенно от соотношения [Pt] : [P], поскольку она лимитируется гидролизом цисплатина и имеет эффективный нулевой порядок по концентрации ДНК. Во-вторых, количество таких повреждений за фиксированное время (22 ч) растет медленнее, чем соотношение [Pt] : [P]. Это можно объяснить тем, что концентрация сайтов GG и AG, взаимодействие с которыми вызывает выраженные изменения в спектре ДНК (описываемые ГК-2), меньше, чем концентрация нуклеотидов. Чем выше относительная концентрация цисплатина, тем большая часть его расходуется на образование непродуктивных монофункциональных аддуктов. В-третьих, поведение системы при соотношении [Pt] : [P] = 1 : 5, когда цисплатин находится в избытке над количеством сайтов АG и GG на ДНК, становится более сложным (появление ГК-4, изменение формы ГК-3, заметное отклонение кинетической кривой С₂ от экспоненты в области больших времен). Это объясняется, на наш взгляд, аналогичными причинами. При [Pt] : [P] = 1 : 5 сайты GG и AG насыщаются и образуется большое количество минорных структурных повреждений, различающихся временем формирования и своим влиянием на спектр ДНК. При малых же [Pt] : [P] большая часть цисплатина связывается в сайтах GG и минорные повреждения не образуются.

Взаимодействие цисплатина с L-Меt. L-Меt является биологической молекулой, наиболее эффективно взаимодействующей с платиновыми препаратами (Bell et al., 1987), но ее роль в механизме действия платиновых препаратов остается противоречивой и спорной (Reedijk, 1999). По данным ЯМР, при высоких концентрациях платины и более чем 2-кратном избытке L-Меt он быстро вытесняет все лиганды цисплатина с образованием *бис*-метионинового комплекса платины. Реакция при 37 °С идет через четыре стадии, причем предполагается, что третья стадия очень быстрая (Berners-Price et al., 1998; Heudi et al., 1998):

$$uc-[Pt(NH_3)_2Cl_2] + Met \rightarrow$$

$$uc-[Pt(NH_3)_2(S-Met)Cl] + Cl^-,$$

 μc -[Pt(NH₃)₂(S-Met)] + Met \rightarrow mpahc-[Pt(S-Met)₂(NH₃)Cl] + NH₃,

mpahc-[Pt(S-Met)₂(NH₃)Cl] $\leftrightarrow \mu c$ -[Pt(S-Met)₂(NH₃)Cl],

 μc -[Pt(S-Met)₂(NH₃)Cl] \rightarrow μc -[Pt(S,N-Met)₂] + NH₃ + Cl-.

Образующийся продукт изомеризуется в равновесную смесь *цис*- и *транс*-изомеров с характерным временем, равным десяткам часов (Norman et al., 1992).

Метиониновые комплексы платины обладают заметным поглощением в дальней УФ-области, что облегчает их исследование нашими методами. На рис. 4 представлены результаты МГК-анализа кинетической серии спектров в реакции 10-кратного избытка L-Met с цисплатином при относительно малой [Pt] (50 мкМ; в данной системе можно надежно исследовать системы с [Pt] до 5 мкМ). Анализ сингулярных чисел указывает на то, что достоверно значимыми являются 5 ГК. Значение w_5 относительно мало, соответствующие ему ГК-5 и С5 не показаны на рис. 4. Результат соответствует кинетической схеме, описанной выше, которая содержит 6 спектрально различных компонентов плюс равновесное состояние ($Cl^- = 15$ мM, а NH_3 не обладает заметным УФ-поглощением), связанных двумя стехиометрическими уравнениями для платины и L-Met (итого 5 линейно независимых спектральных компонентов).

Очевидно, кинетическая схема реакции L-Met с цисплатином может быть решена только численно. Программное обеспечение, сочетающее МГК, численное решение кинетических уравнений, и нелинейный МНК в настоящий момент находятся в процессе создания, поэтому мы не можем провести количественный анализ кинетических кривых. Тем не менее наличие интермедиатов может быть установлено «на глаз» путем анализа фазовой траектории (рис. 5). Последовательные стадии реакции отображаются на фазовой плоскости отрезками, образующими ломаную линию, вдоль которой плавно изгибается фазовая траектория. По нашему предположению, точки I_1 и I_2 соответствуют *цис*-[Pt(NH₃)₂(S-Met)Cl] и mpahc-[Pt(S-Met)₂(NH₃)Cl], но это предположение требует дальнейшей проверки. Конечный продукт в реакции по спектру соответствует бис-метиониновому комплексу (Norman et al., 1992).



Рис. 4. Анализ кинетической серии спектров для реакции цисплатина с 10-кратным избытком *L*-метионина. *a* — старшие ГК; *б* — старшие приведенные концентрации (для наглядности нормированы). Условия: 37 °C, 15 мМ NaCl, [Pt] = 50 мкМ. Число спектров *M* = 163, размерность спектра *N* = 251.

Таким образом, можно заключить, что используемое нами сочетание методов дает хорошие результаты. Исследования простейших систем с высокими концентрациями платины приводят к результатам, совпадающим с данными литературы, качество получаемых кинетических кривых очень высокое. При сочетании с численным решением кинетических уравнений метод потенциально может использоваться для количественного исследования более сложных систем. В то же время метод обладает запасом по чувствительности и может применяться в микро- и субмикромолярной областях концентраций, характерных для живых систем. Проведенные исследования показывают, что такие важные модельные системы, как цисплатин—ДНК и цисплатин—метионин, при низких и высоких концентрациях платины ведут себя принципиально сходным образом.

Описанный в работе методический подход может быть легко обобщен на широкий класс задач молекулярной биологии и биофизики, если изменить физический смысл t и к в выражениях. Например, в исследованиях по равновесному связыванию в качестве t будет выступать входное соотношение веществ, а в качестве к — константы равновесия; в экспериментах по титрованию: t — pH, а к — pK и коэффициента Хилла; в экспериментах по денатурации биополимеров: t — текущая температура, к — температуры плавления; хроматографии и т. д. Главными требованиями остаются линейность спектров по концентрации (поэтому метод применим к ИК- и ЯМР-спектрам и



Рис. 5. Сечения фазового пространства спектров реакции цисплатина с10-кратным избытком *L*-метионина, иллюстрирующие возможность идентификации промежуточных состояний *I*₁ и *I*₂ (указанные положения промежуточных состояний на графиках — грубо приблизительные).

По осям отложены приведенные концентрации.

другим линейным по концентрации эффектам) и нелинейность модели по t и к.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01072-а) и программы президента РФ для молодых кандидатов наук (МК-5692.2008.4).

Список литературы

Голуб Дж., Ван Лоун Ч. 1999. Матричные вычисления. М.: Мир. 458 с.

Кельнер Р. 2004. Аналитическая химия. Проблемы и подходы (в 2 т.). М.: Мир АСТ. 1 : 608 с., 2 : 728 с.

Ллойд Э., Лидерман У., Тюрин Ю. Н. 1989. Справочник по прикладной статистике (в 2 т.). М.: Финансы и статистика. 1:510 с.

Ллойд Э., Лидерман У., Тюрин Ю. Н. 1990. Справочник по прикладной статистике (в 2 т.). М.: Финансы и статистика. 2 : 526 с.

Поляничко А. М., Чихиржина Е. В., Андрущенко В. В., Костылева Е. И., Wieser Н., Воробьев В. И. 2004. Влияние ионов Ca²⁺ на компактизацию ДНК в комплексе с негистоновым хромосомным белком HMGB1. Молекуляр. биол. 38 (4) : 701— 712.

Скворцов А. Н., Воробьев В. И. 2006. Численные методы анализа спектров оптического диапазона в исследованиях равновесного связывания и кинетики реакций биополимеров. В кн.: Структура и динамика молекулярных систем. Уфа: ИФМК УНЦ РАН. XIII, II : 239—244.

Стеценко А. И., Адамов О. М., Рамм Е. И., Дмитриева Е. С. 1990. Спектры кругового дихроизма комплексных соединений платины (II) с инозином. Коорд. химия. 16 (2) : 274— 279.

Тулуб А. А. 1998. Кинетические механизмы связывания *цис*-дихлородиамминоплатины (II) и ее моно-аква-формы с олигонуклеотидами. Молекуляр. биол. 32 (5): 859—854.

Чихиржина Е. В., Поляничко А. М., Скворцов А. Н., Костылева Е. И., Уссье К., Воробьев В. И. 2002. НМG1-домены: заложники обстоятельств. Молекуляр. биол. 36 (3) : 525— 531.

Bancroft D. P., Lepre C. A., Lippard S. J. 1990. ¹⁹⁵Pt NMR kinetic and mechanistic studies of *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum (II) binding to DNA. J. Amer. Chem. Soc. 112 : 6860–6871.

Barnham K. J., Djuran M. I., Murdoch P. d.-S., Ranford J. D., Sadler P. J. 1995. L-methionine increases the rate of reaction of 5'-guanosine monophosphate with the anticancer drug cisplatin: mixed-ligand adducts and reversible methionine binding. J. Chem. Soc. Dalton Trans. 10: 3721—3726.

Bell J. D., Norman R. E., Sadler P. J. 1987. Coordination chemistry in biological media: reactions of antitumor Pt (II) and Au (III) complexes with culture media. J. Inorg. Biochem. 31: 241–246.

Berners-Price S. J., Appleton T. G., Gahan L. R., El-Khateeb M., Charles B. G., Bolton A.-M. 1999. Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. J. Inorg. Biochem. 77 : 13–21.

Brereton R. G. 2007. Applied chemometrics for scientists.Chichester: Wiley and Sons. 396 p.Bruijnincx P. C., Sadler P. J. 2008. New trends for metal com-

Bruijnincx P. C., Sadler P. J. 2008. New trends for metal complexes with anticancer activity. Curr. Opin. Chem. Biol. 12: 197–206.

Coley R. F., Martin D. S. 1973. Kinetics and equilibria for the acid hydrolysis of dichloro(ethylenediamine)platinum (II). Inorg. Chim. Acta. 7: 573—577.

De Voe H., Tinoco I., jr. 1962. The hypochromism of helical polynucleotides. J. Mol. Biol. 4 : 518–527.

Fichtinger-Schepman A. M. J., van der Veer J. L., den Hartog J. H. J., Lohman P. H. M., Reedijk J. 1985. Adducts of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II) with DNA: formation, identification, and quantitation. Biochemistry. 24 : 707— 713.

Galyuk E. N., Fridman A. S., Vorob'ev V. I., Haroutiunian S. G., Sargsyan S. A., Hauruk M. M., Lando D. Y. 2008. Compensation of DNA stabilization and destabilization effects caused by cisplatin is partially disturbed in alkaline medium. J. Biomol. Struct. Dyn. 25 : 407–417.

Gemperline P. 2006. Practical guide to chemometrics. Boca Raton; London; New York: Taylor and Francis Group. 541 p.

Heudi O., Cailleux A., Allain P. 1998. Kinetic studies of the reactivity between cisplatin and its monoaquo species with L-methionine. J. Inorg. Biochem. 71 : 61–69.

Jamieson E. R., Lippard S. J. 1999. Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts. Chem. Rev. 99 : 2467–2498.

Johnson W. C., jr. 1988. Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17: 145—166.

Manavalan P., Johnson W. C., jr. 1987. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. Anal. Biochem. 167 : 76–85.

Norman R. E., Ranford J. D., Sadler P. J. 1992. Studies of platinum (II) methionine complexes: metabolites of cisplatin. Inorg. Chem. 31 : 877–888.

Pancoska P., Bitto E., Janota V., Urbanova M., Gupta V. P.,
 Keiderling T. A. 1995. Comparison of and limits of accuracy for statistical analyses of vibrational and electronic circular dichroism spectra in terms of correlations to and predictions of protein secondary structure. Protein Sci. 4 : 1384—1401.
 Polyanichko A., Chikhirzhina E., Andrushchenko V., Vorob'-

Polyanichko A., Chikhirzhina E., Andrushchenko V., Vorob'ev V. I., Wieser H. 2006. The effect of manganese (II) on the structure of DNA/HMGB1/H1 complexes: electronic and vibrational circular dichroism studies. Biopolymers. 83 : 182—192.

Prenzler P. D., McFadyen W. D. 1997. Reactions of cisplatin and the *cis*-diamminediaqua platinum (II) cation with TRIS and HEPES. J. Inorg. Biochem. 68 : 85–92.

Reed E., Ozols R. F., Tarone R., Yuspa S. H., Poirier M. C. 1987. Platinum-DNA adducts in leukocyte DNA correlate with disease response in ovarian cancer patients receiving platinum-based chemotherapy. PNAS. 84 : 5024—5028.

Reedijk J. 1996. Improved understanding in platinum antitumor chemistry. Chem. Comm. 10: 801–806.

Reedijk J. 1999. Why does cisplatin reach G-N7 with competing *S*-donor ligands available in the cell. Chem. Rev. 99 : 2499—2510.

Reishus J. W., Martin D. S., jr. 1961. cis-Dichlorodiammineplatinum (II). Acid hydrolysis and isotopic exchange of the chloride ligands. J. Amer. Chem. Soc. 83 : 2457–2462.

Skvortsov A. N., de Vekki D. A., Stash A. I., Belsky V. K., Spevak V. N., Skvortsov N. K. 2002. Synthesis, crystal structures and optical activity of *cis*- and *trans*-(–)-dichloro[(S)-methyl *p*-tolylsulfoxide]pyridyl platinum (II) complexes. Tetrahedron: Asymmetry. 13: 1663—1671.

Stoer J., Burlich R. 1993. Introduction to numerical analysis. New York: Springer-Verlag. 660 p.

Wilkinson G. 1987. Comprehensive coordination chemistry. Theory and background. Oxford et al.: Pergamon Press. 1 : 613 p.

Zamble D. B., Lippard S. J. 1995. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. Trends Biol. Sci. 20 : 435–439.

Поступила 25 IX 2008

EFFICIENT METHOD OF ANALYSIS OF OPTICAL SPECTRA FROM KINETIC STUDIES

A. N. Skvortsov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: skvor@mail.cytspb.rssi.ru

The application of principal components for the analysis of kinetic data obtained by optical spectroscopy is described. The use of singular value decomposition (SVD) for stable and reproducible generation of principal components, details of realization, advantages and drawbacks of the method are discussed. The described method with minor modifications may be used in a wide variety of UV-spectroscopy applications in molecular biology and biophysics. The developed method was applied to study the reaction of platinum anticancer drug, cisplatin, with DNA and methionine. Use of sensitive UV-spectroscopy allowed to study low platinum concentrations, typical for biological systems. It has been shown, that reactions of cisplatin with DNA and *L*-methionine generally follow the same pathway both at high and low concentrations.

Key words: UV-spectroscopy, kinetic studies, chemometrics, principal component analysis, spectrum analysis, cisplatin, platinum drugs.