

Infracrevena spektroskopija gvanina

Filjar, Rea

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:724703>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Rea Filjar

Studentica 3. godine Sveučilišnog prijediplomskog studija KEMIJA

INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA GVANINA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Adriana Kenđel

Zagreb, 2024. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 12. srpnja 2024.
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 20. rujna 2024.

Mentor rada: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	2
2.1. Infracrvena spektroskopija.....	2
<i>2.1.1. Temelji infracrvene spektroskopije.....</i>	<i>2</i>
<i>2.1.2. IR spektrometri</i>	<i>6</i>
2.2. Gvanin.....	8
2.3. Infracrvena spektroskopija gvanina	11
<i>2.3.1. Anharmonične korekcije IR spektra.....</i>	<i>14</i>
2.4. Primjena infracrvene spektroskopije gvanina u antitumorskim lijekovima	16
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XIX

§ Sažetak

Za određivanje strukture gvanina koriste se različite analitičke metode, a jedna od njih je i infracrvena spektroskopija. Infracrvena spektroskopija je izvrsna metoda za određivanje strukture tvari jer omogućava identifikaciju specifičnih funkcijskih skupina koje grade molekulu. Svaka funkcijska skupina apsorbira infracrveno zračenje pri karakterističnim frekvencijama, što rezultira prepoznatljivim vrpčama u spektru. U ovom radu prikazane su osnove infracrvene spektroskopije; podjela, vrste vibracija, izborna pravila te vrste instrumenata.

U prvom dijelu rada opisana su glavna svojstva molekule gvanina, prikazana njegova struktura i opisana uloga u genetskom kodu i antitumorskim lijekovima. Zatim je analiziran snimljeni spektar gvanina i asignirane su karakteristične vrpce. Također, snimljeni spektar uspoređen je s računski dobivenim spektrom B3LYP/Gatti metodom, a za još točnije rezultate primijenjene su anharmonične korekcije spektara.

U posljednjem dijelu rada opisano je kako se infracrvena spektroskopija gvanina koristi u istraživanju antitumorskih lijekova, te kako modifikacije gvanina, poput alkilacije ili metilacije, mogu ozbiljno oštetiti DNA tumorskih stanica.

§ 1. UVOD

Gvanin je jedna od četiri baze koje čine molekulu deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA), zajedno s adeninom, citozinom i timinom. Kao ključna komponenta genetskog koda, gvanin ima značajnu ulogu u biološkim procesima kao što su replikacija DNA i ekspresija gena. Razumijevanje strukture gvanina i njegovih kemijskih svojstava ključno je za napredak u brojnim biomedicinskim područjima, posebno u razvoju antitumorskih lijekova te u općem razumijevanju mehanizama razvoja tumora.

U ovom radu istražena su strukturalna svojstva gvanina koristeći infracrvenu (engl. *infrared*, IR) spektroskopiju, s posebnim naglaskom na infracrvenu spektroskopiju s Fourierovim transformacijama (FT-IR). Infracrvena spektroskopija je tehnika koja omogućava proučavanje vibracijskih svojstava molekula, pružajući uvid u njihove kemijske strukture i interakcije. FT-IR spektroskopija, kao specifičan oblik ove metode, koristi Fourierovu transformaciju za dobivanje infracrvenog spektra, čime se postiže visoko razlučivanje i veća preciznost u analizi kemijskih spojeva.

Korištenjem FT-IR spektroskopije možemo detaljno analizirati vibracijske frekvencije unutar molekule gvanina, što nam omogućava da razumijemo njegove unutarmolekulske i međumolekulske interakcije. Ova analiza je ključna za otkrivanje potencijalnih ciljeva za antitumorske lijekove i može pružiti vrijedne informacije o načinu na koji gvanin doprinosi razvoju i progresiji tumorskih stanica.

Cilj ovog rada je detaljno istražiti strukturne karakteristike gvanina pomoću FT-IR spektroskopije te pridonijeti širem razumijevanju njegove uloge u biomedicinskim istraživanjima i terapijama.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Infracrvena spektroskopija

2.1.1. Temelji infracrvene spektroskopije

Infracrvena spektroskopija je metoda koja se koristi za proučavanje interakcija infracrvenog zračenja s molekulama. Svjetlost koja se apsorbira u infracrvenoj spektroskopiji mora imati frekvenciju koja se podudara s frekvencijom vibracije veze unutar molekule. Ova rezonancija između frekvencije svjetla i vibracijske frekvencije veze molekule omogućava prijenos energije infracrvenog zračenja na molekulu, što dovodi do pojave vrpca u vibracijskim spektrima. Vrpce su karakteristične za određene vibracijske prijelaze i omogućuju identifikaciju funkcijskih skupina unutar molekule.^{1,2}

Područje infracrvenog zračenja obuhvaća širok spektar valnih duljina koje se protežu od 0,78 do 1000 mikrometara (μm), odnosno od 12800 do 10 cm^{-1} izraženo u valnim brojevima. Ovo područje može se podijeliti na tri dijela: blisko infracrveno (engl. *near infrared*, NIR), srednje infracrveno (engl. *mid infrared*, MIR) i daleko infracrveno (engl. *far infrared*, FIR) područje.

Blisko infracrveno (NIR) područje obuhvaća valne duljine od približno 0,78 do 2,5 μm (12800 do 4000 cm^{-1}). Ovo područje karakteriziraju više frekvencije i veća energija, te se često koristi u refleksijskoj spektroskopiji, medicinskoj dijagnostici i analizi hrane. NIR spektroskopija je posebno korisna za neinvazivnu analizu bioloških tkiva i materijala, budući da NIR zračenje može prodrijeti dublje u uzorke u usporedbi s ostalim IR zračenjem.³

Srednje infracrveno (MIR) područje proteže se od 2,5 do 25 μm (4000 do 400 cm^{-1}) i najčešće se koristi u IR spektroskopiji. Ovo područje je ključno za analizu molekulskih vibracija budući da velika većina funkcijskih grupa u molekulama apsorbira IR zračenje u ovom području. MIR spektroskopija se široko primjenjuje u kemijskoj analizi, identifikaciji organskih i anorganskih spojeva, te u proučavanju strukture i dinamike biomolekula. Korištenjem FT-IR spektrometara moguće je dobiti vrlo precizne i detaljne spektralne podatke, što omogućava detaljniju analizu složenih uzoraka.

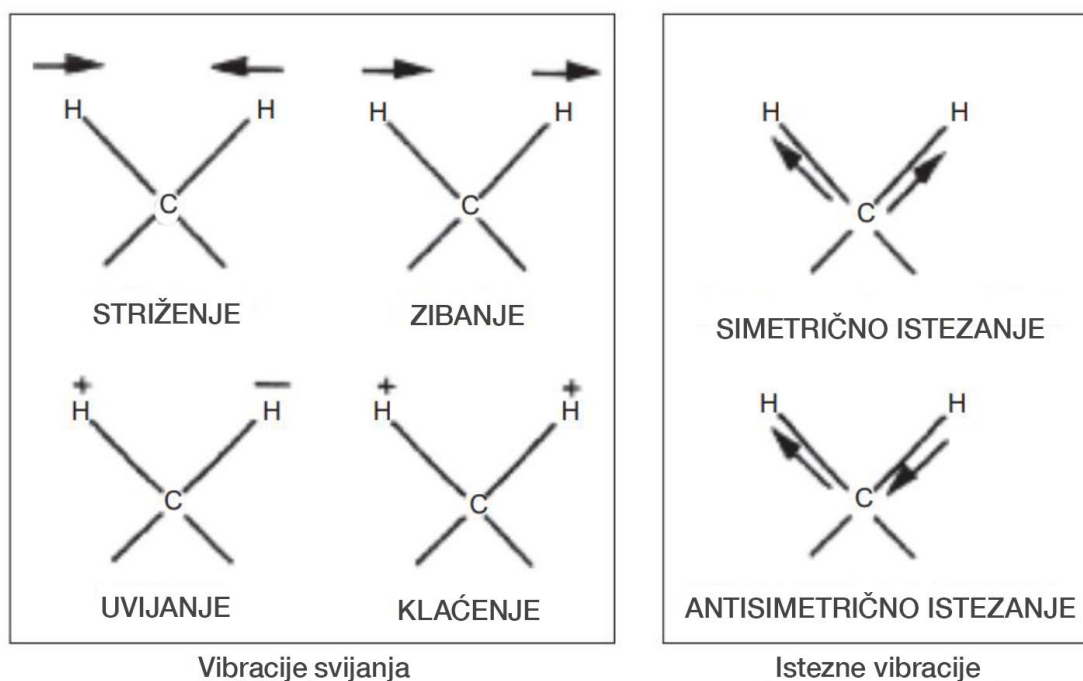
Daleko infracrveno (FIR) područje pokriva valne duljine od 25 do 1000 μm (400 do 10 cm^{-1}). Zračenje u ovom dijelu spektra ima najniže frekvencije i energiju. FT-FIR spektroskopija

se koristi za proučavanje niskofrekventnih vibracija, rotacija molekula i međumolekulskih interakcija. Primjenjuje se i za analizu polimera, proučavanje materijala na niskim temperaturama i istraživanje kvantnih efekata u čvrstim tvarima.

Infracrvenom spektroskopijom se promatraju promjene koje se zbivaju tijekom vibracija molekula. Vibracije se definiraju kao promjene relativnih položaja atoma unutar molekule i mogu se klasificirati kao istežne vibracije i vibracije svijanja ili deformacije (slika 1). Simetrične vibracije pojavljuju se kada se veze s istim atomom usklađeno skraćuju ili povećavaju. Suprotno, antisimetrične vibracije karakterizira naizmjenično povećanje i smanjenje duljine veza u odnosu na zajednički atom. Vibracije svijanja se dijele na deformacije u ravnini i deformacije van ravnine. Za troatomne sustave vibracije svijanja koje se događaju u ravnini nazivamo „striženje“ (engl. *scissoring*, sc) i „zibanje“ (engl. *rocking*, rc), dok se deformacijske vibracije koje se odvijaju izvan ravnine nazivaju „uvijanje“ (engl. *twisting*, tw) i „klačenje“ (engl. *wagging*, wg).¹ Svaka od ovih vibracija događa se pri različitoj frekvenciji koja je jedinstvena za kemijsku vezu i spoj. Te frekvencije poklapaju se s frekvencijama svjetlosti u srednjem infracrvenom (MIR) području elektromagnetskog spektra.³

Linearna molekula s N brojem atoma ima $3N-5$ temeljnih ili osnovnih vibracija, dok nelinearna molekula ima $3N-6$ načina vibriranja. Ove vibracije uključuju različite vrste kretanja unutar molekule, kao što su istežanje (promjena duljine veze), svijanje (promjena kuta između veza) i zakretanje (rotacija oko osi). Svaka od ovih vibracija može biti prikazana kao kombinacija pojedinačnih gibanja atoma unutar molekule.¹

Za infracrvenu (IR) aktivnost molekule, ključan uvjet je promjena dipolnog momenta tijekom vibracije. Dipolni moment molekule nastaje zbog razlike u elektronegativnosti atoma u molekuli, što rezultira neravnomjernom raspodjelom električnog naboja. Tijekom vibracije, ako se dipolni moment mijenja, molekula može apsorbirati infracrveno zračenje. Ova apsorpcija zračenja dovodi do prijelaza molekule u pobuđeno vibracijsko stanje.²



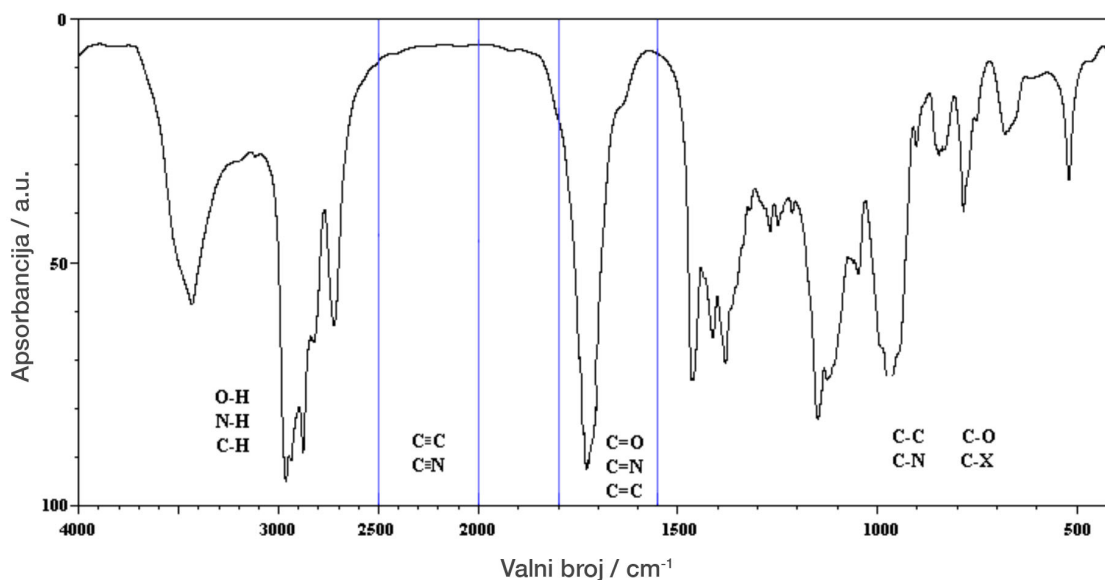
Slika 1. Prikaz vibracija svijanja i isteznih vibracija molekula (prilagođeno iz izvora 1)

Infracrveni spektar je grafički prikaz transmitiranih (ili apsorbiranih) frekvencija u odnosu na intenzitet transmisije (ili apsorpcije). Kod transmisijskog spektra vrpce se prikazuju kao smanjenje intenziteta transmitirane svjetlosti, odnosno, intenzivnije vrpce označavaju veće apsorpcije na određenim frekvencijama. Ova vrsta spektra omogućava jednostavnu vizualizaciju koje frekvencije zračenja su apsorbirane i u kojem intenzitetu. Transmisijski prikaz je najčešće korišten način prikaza IR spektara zbog njegove jasnoće i jednostavnosti interpretacije, te je stoga standard u mnogim analitičkim laboratorijima i u literaturi.⁴

Infracrveni spektar prikazuje karakteristične apsorpcijske vrpce funkcijskih skupina unutar strogo definiranih područja valnih brojeva, pri čemu je apscisa uvijek valni broj (cm^{-1}), a ordinata transmitancija (%) ili apsorbancija.⁵ Za uobičajene analize koristi se srednje infracrveno područje od 4000 do 400 cm^{-1} . Područje pri nižim valnim brojevima, između 400 i 1500 cm^{-1} naziva se područje "otiska prsta" (engl. *fingerprint region*) i jedinstveno je za svaku molekulu. Područje „otiska prsta“ je bogato vrpcama koje potječu od svijanja cijelog skeleta molekule, vrpce se često preklapaju i prilično je zahtjevno za interpretaciju.

Prilikom analize IR spektra, općenito se interpretiraju samo određene vrpce, i to većinom karakteristične vrpce funkcijskih skupina (slika 2). Na temelju valnog broja na kojem se pojavljuju određene vrpce u IR spektru, moguće je odrediti vrstu molekule, a ponekad i

kemijske veze kojom se molekule međusobno povezuju. Za potpunu strukturnu karakterizaciju nekog spoja često se infracrvena spektroskopija kombinira s drugim spektroskopskim metodama.



Slika 2. Infracrveni spektar karakterističnih vrpca (izvor 7)

Kada se molekula izloži djelovanju infracrvene svjetlosti, može apsorbirati zračenje određene frekvencije i propustiti ostatak. Dio svjetlosti također se može reflektirati. Od svih frekvencija zračenja koje prima, kemijski uzorak može apsorbirati specifične frekvencije i omogućiti prolaz preostalim frekvencijama (transmitirana svjetlost). Detektor detektira propuštene frekvencije zračenja, čime se neizravno otkriva vrijednosti apsorbiranih frekvencija.

Kada govorimo o ugljikovodicima, važno je napomenuti da se karakteristične vibracije C-H istezanja uvijek nalaze u području od $2800\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$. C-H veze s većim udjelom *s* karaktera su kraće, jače i pokazuju vibracije pri višim valnim brojevima. Tako se C-H veze na *sp* centrima javljaju u rasponu od $3000\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$, C-H veze na *sp*² centrima oko 3080 cm^{-1} , dok se C-H veze na *sp*³ centrima pojavljuju u području od $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$. Što se tiče višestrukih veza, najčešće se proučavaju vibracije istezanja CC veza. Tako CC dvostruke veze daju vrpce pri $1620\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$, dok CC trostruke veze rezultiraju vrpcama u području $2100\text{--}2260\text{ cm}^{-1}$. Važno je napomenuti da su ove vrpce odsutne u simetričnim dvostrukim i trostrukim vezama.

Kod amina i amida, najveća pažnja u interpretaciji IR spektra posvećuje se vrpca istezanja N-H veze koja se u vrlo razrijeđenim otopinama primarnih i sekundarnih amina javlja

u području od 3300-3500 cm^{-1} . Spektar primarnih amina sadrži dvije vrpce (simetričnu i antisimetričnu vibraciju), dok sekundarni amini pokazuju samo jednu vrpce zbog prisutnosti samo jedne N-H veze. Tercijarni amini nemaju N-H veze i stoga ne apsorbiraju IR zračenje u ovom području, što znači da nema pojave vrpce u opisanom karakterističnom području. Koncentriranije otopine amina pokazuju šire vrpce zbog postojanja međumolekulskih vodikovih veza. Spektri amida, osim vrpce istezanja N-H skupine, sadrže i karakterističnu vrpce za karbonilnu grupu. Prisutnost obje vrpce jasan je dokaz postojanja amida u uzorku koji se analizira.

Infracrvena spektroskopija, a posebno FT-IR spektroskopija, predstavlja moćan alat za analizu molekulskih vibracija i strukturnih karakteristika kemijskih spojeva. Njena široka primjena u različitim znanstvenim disciplinama, uključujući kemiju, biomedicinu i farmaciju, čini je nezamjenjivom tehnikom za razumijevanje i istraživanje struktura biološki važnih molekula.⁷

2.1.2. IR spektrometri

IR spektrometri su ključni instrumenti za detekciju i analizu vibracija molekulskih veza putem apsorpcije infracrvenog (IR) zračenja. Osnovni dijelovi IR spektrometra uključuju izvor zračenja, prostor za uzorak, selektor valnih duljina (poput monokromatora), detektor i računalni sustav za obradu podataka. Ovaj uređaj omogućava detaljno proučavanje struktura molekula i identifikaciju kemijskih spojeva na temelju njihovih specifičnih apsorpcijskih karakteristika.

Postoje dvije osnovne vrste IR spektrometara: disperzijski i spektrometri s Fourierovim transformacijama. Disperzijski spektrometri koriste prizme ili rešetke za selekciju valnih duljina, pri čemu monokromator kontinuirano mijenja svoj položaj kako bi propustio različite valne duljine do detektora. Detektori zatim mjere intenzitet svjetlosti i pretvaraju ga u električni signal koji se analizira kako bi se dobio IR spektar.

FT-IR spektrometri, modernija i naprednija verzija, koriste interferometar za spektralno razlaganje zračenja. Michelsonov interferometar je najčešći optički instrument u FT-IR spektrometrima. Ovaj interferometar dijeli IR zraku na dva dijela: jedan dio prolazi kroz razdjelnik, dok se drugi dio reflektira. Zrake se zatim ponovno kombiniraju i reflektiraju natrag do razdjelnika, pri čemu se duljina puta jedne zrake varira pomoću pomičnog zrcala. Ova varijacija duljine puta uzrokuje konstruktivnu ili destruktivnu interferenciju, stvarajući

interferogram koji sadrži informacije o svim frekvencijama IR zračenja. Računalo pomoću Fourierove transformacije prevodi dobivene podatke u IR spektar.

Moderni FT-IR spektrometri sadrže napredne detektore, kao što su fotodetektori i termički detektor. Fotodetektor, bazirani na interakciji fotona s poluvodičkim materijalima, omogućavaju vrlo precizna mjerenja, dok termički detektor reagiraju na promjene temperature uzrokovane apsorpcijom IR zračenja. Ovi detektor igraju ključnu ulogu u pretvaranju optičkog signala u električni, što je osnovno za dobivanje točnih podataka.

Računalni softveri koji dolaze s modernim FT-IR spektrometrima omogućavaju naprednu obradu i analizu podataka. Algoritmi za Fourierovu transformaciju pretvaraju složene interferograme u lako razumljive IR spektre, pružajući detaljne informacije o kemijskom sastavu i strukturi analiziranih uzoraka.

FT-IR spektrometri imaju brojne prednosti u odnosu na disperzijske spektrometre. Prvo, svi valni brojevi se mjere istovremeno, što značajno ubrzava proces mjerenja i omogućava bržu analizu uzoraka. Drugo, FT-IR spektrometri imaju visoku osjetljivost i rezoluciju, što omogućava precizniju identifikaciju kemijskih spojeva i detekciju čak i vrlo niskih koncentracija analita. Treće, ovi spektrometri su manje osjetljivi na vanjske smetnje i šumove, čime se povećava točnost i pouzdanost rezultata.

FT-IR spektrometri našli su široku primjenu u biomedicinskim istraživanjima i dijagnostici. Ova metoda omogućava analizu raznih bioloških uzoraka, kao što su tkiva, krv, urin, serum, plazma i ispljuvak, često prije nego što se razviju ikakve morfološke promjene. FT-IR spektroskopija može otkriti biokemijske promjene na molekularnoj razini, koje su uzrokovane metaboličkim procesima tijekom razvoja bolesti, uključujući rak.

Primjena FT-IR spektroskopije u istraživanju antitumorskih lijekova postaje sve značajnija. Ova tehnologija omogućava proučavanje interakcije između lijekova i ciljnih molekula unutar stanica raka te promjena u molekularnoj strukturi stanica kao odgovor na liječenje. FT-IR spektrometri mogu detektirati specifične biomarkere koji ukazuju na prisutnost ili progresiju raka, kao i na učinkovitost određenog tretmana. Ovi podaci pomažu u razvoju novih terapija i personaliziranim pristupima liječenju, što može poboljšati ishode za pacijente.

IR spektrometri, posebice FT-IR modeli, predstavljaju ključne alate u modernoj analitičkoj kemiji, biomedicini i istraživanju lijekova. Njihova sposobnost da pružaju brze, precizne i detaljne analize čini ih nezamjenjivima u mnogim znanstvenim i industrijskim

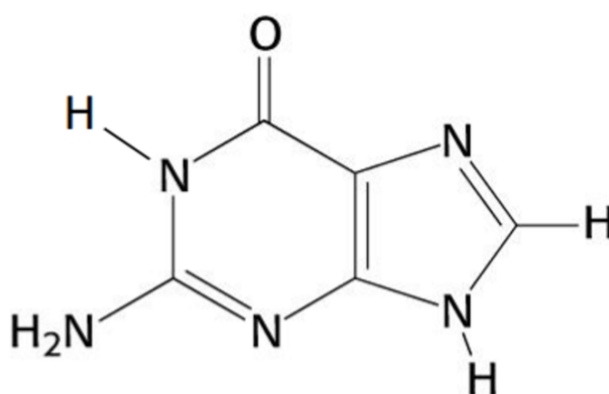
područjima. Korištenjem naprednih tehnologija i metoda, FT-IR spektroskopija nastavlja igrati važnu ulogu u razumijevanju molekulskih procesa i razvoju novih terapijskih pristupa.⁵⁻⁷

2.2. Gvanin

Nukleotidi su osnovne građevne jedinice nukleinskih kiselina i sastoje se od baze (purinske ili pirimidinske), (deoksi)riboze i fosfata. Gvanin je jedan od četiri glavne baze koje čine nukleotide u deoksiribonukleinskoj i ribonukleinskoj kiselini (engl. *ribonucleic acid*, RNA), zajedno s adeninom, citozinom i timinom (ili uracilom u RNA).

Kao purinska baza, gvanin se odlikuje svojom prstenastom strukturom, koja se sastoji od fuzioniranog imidazolskog i pirimidinskog prstena (slika 3). Ova struktura omogućava gvaninu da se uparuje s citozinom putem triju vodikovih veza, čime se osigurava stabilnost i specifičnost genetskog koda.^{8,9,10}

Prvi put je otkriven u guanu 1846. godine, a 1891. godine je izoliran iz nukleinskih kiselina iz kojih se lako priprema. Kroz povijest, gvanin je igrao ključnu ulogu u otkrićima vezanim za genetiku i molekularnu biologiju. Njegova izolacija iz guana i kasnije iz nukleinskih kiselina omogućila je značajan napredak u razumijevanju strukture i funkcije nukleinskih kiselina. Danas, istraživanje gvanina i njegovih derivata ostaje u središtu molekularne biologije i biokemije, pružajući ključne uvide u osnovne mehanizme života.



Slika 3. Strukturna formula gvanina (izvor 8)

Složeniji spojevi dobiveni iz nukleinskih kiselina uključuju nukleozide gvanozina i deoksigvanozina, u kojima je gvanin kombiniran sa šećerima ribozom i deoksiribozom, te nukleotide gvanilnu kiselinu i deoksigvanilnu kiselinu, koji su esteri fosforne kiseline

gvanozina i deoksigvanozina. Strukturne karakteristike gvanina doprinose njegovoj funkcionalnosti. Zbog sposobnosti stvaranja više vodikovih veza, gvanin formira stabilne strukture u nukleinskim kiselinama što rezultira visokom temperaturom sublimacije i otežava proučavanje gvanina u plinovitom stanju. Njegova kemijska svojstva omogućuju mu sudjelovanje u raznim biokemijskim reakcijama, uključujući metilaciju i oksidaciju, što dodatno povećava njegovu biološku važnost.^{9,10}

Gvanin je također ključan za brojne biološke procese. U nukleinskim kiselinama gvanin igra važnu ulogu u kodiranju genetskih informacija i njihovom prenošenju. Uz to, derivati gvanina, poput gvanozin-trifosfata (GTP), imaju ključnu ulogu u signalnim putevima unutar stanice i energetske dinamici. GTP je bitan za procese poput sinteze proteina, gdje služi kao izvor energije i kao molekula za prijenos signala. U istraživanjima nukleinskih kiselina, gvanin se često koristi kao marker za analizu strukturnih promjena i interakcija unutar DNA i RNA. Gvanin je kemijski stabilan spoj, što ga čini otpornim na denaturaciju pri normalnim fiziološkim uvjetima. Njegova sposobnost stvaranja vodikovih veza s citozinom osigurava visoku stabilnost dvostruke uzvojnice DNA, što je ključno za očuvanje genetskog koda.

Gvanin također ima značajna optička svojstva, uključujući fluorescenciju, što ga čini korisnim u biokemijskim i molekularnim istraživanjima. Njegova fluorescentna svojstva omogućavaju znanstvenicima da prate molekularne procese u realnom vremenu, što je posebno važno u proučavanju dinamike DNA i RNA. Osim toga, njegova sposobnost sudjelovanja u redoks reakcijama omogućava mu važnu ulogu u staničnom metabolizmu i signalizaciji. Gvanin je također poznat po svojoj visokoj toplinskoj stabilnosti, što znači da može izdržati visoke temperature bez razgradnje, čineći ga otpornim na toplinske denaturacije. Ovo svojstvo je ključno za PCR (lančanu reakciju polimeraze) i druge laboratorijske tehnike koje zahtijevaju visoke temperature.

Gvanin se koristi se i u kozmetičkoj industriji zbog svojih reflektirajućih svojstava. Ekstrakti gvanina dodaju se u proizvode poput šampona, lakova za nokte i krema za lice kako bi se postigao sjajni efekt. Ova praktična primjena naglašava svestranost ovog spoja i izvan bioloških sustava.

U genetskom kodu, gvanin igra ključnu ulogu u određivanju slijedu aminokiselina tijekom sinteze proteina. Njegovo komplementarno sparivanje s citozinom kroz tri vodikove veze osigurava točnost prijenosa genetske informacije tijekom replikacije DNA i transkripcije RNA. Ova specifična interakcija između gvanina i citozina također pomaže u održavanju

stabilnosti genetskog materijala i sprječavanju mutacija. Mutacije u bazi gvanina mogu dovesti do promjena u genetskom kodu, što može uzrokovati različite genetske bolesti i poremećaje. Primjerice, promjene u strukturi gvanina mogu utjecati na funkcionalnost gena i uzrokovati bolesti kao što su rak i neurodegenerativni poremećaji. Gvanin je također ključan za strukturu i funkciju ribosoma, kompleksa odgovornog za sintezu proteina. Ribosomi koriste gvanin za pravilno prepoznavanje i uparivanje kodona i antikodona tijekom translacije, što je ključni korak u sintezi proteina.

Gvanin i njegovi derivati igraju važnu ulogu u razvoju antitumorskih lijekova. Neki kemoterapijski agensi ciljaju DNA i RNA u tumorskim stanicama, ometajući normalnu funkciju gvanina i time inhibiraju rast i proliferaciju stanica raka. Primjerice, agensi poput cisplatina formiraju kovalentne veze s gvaninom u DNA, uzrokujući prekid lanca i smrt stanica. Ova interakcija sprječava replikaciju DNA i transkripciju RNA, što dovodi do apoptoze stanica raka. Osim toga, analozi nukleozida koji uključuju gvanin koriste se za inhibiciju enzima uključenih u sintezu DNA, što dodatno pomaže u kontroli rasta tumora. Gvaninski analozi, kao što je kladribin, koriste se za liječenje leukemija i limfoma, jer inhibiraju DNA polimerazu i induciraju apoptozu u malignim stanicama.

Uz izravne učinke na DNA, gvanin također igra ulogu u modulaciji stanične signalizacije koja može utjecati na rast tumora. Na primjer, GTP, derivat gvanina, je ključan za funkciju G-proteina koji reguliraju mnoge stanične procese, uključujući proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje stanica. Promjene u signalizacijskim putevima koji uključuju GTP mogu pridonijeti razvoju i progresiji raka. Istraživanje ovih puteva može pružiti nove ciljeve za antitumorske terapije.

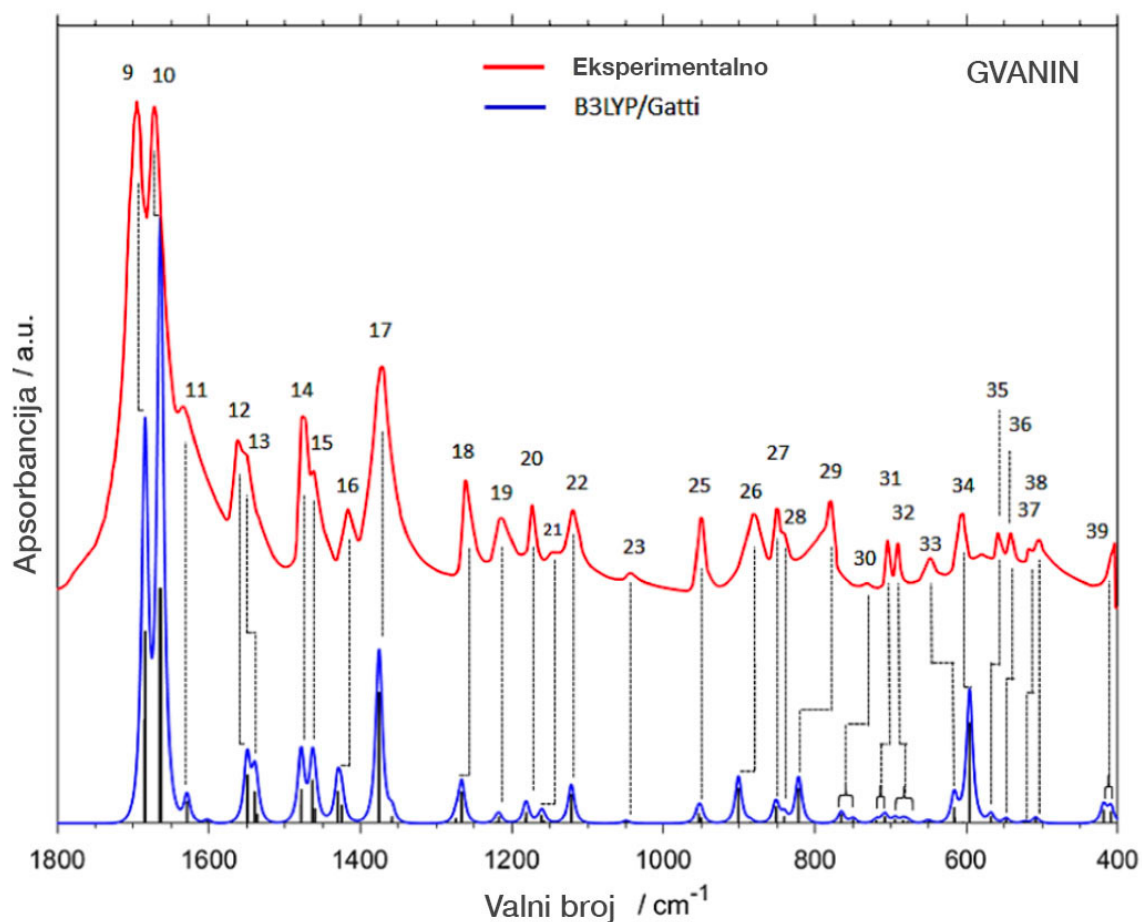
Istraživanje gvanina i njegovih uloga u različitim biološkim procesima i terapijama ostaje ključno za razumijevanje i unapređenje medicinskih i biotehnoških primjena. Njegova svestranost i važnost u molekularnim mehanizmima života čine ga neizostavnim predmetom istraživanja u molekularnoj biologiji i biokemiji.¹⁰

2.3. Infracrvena spektroskopija gvanina

Infracrvena spektroskopija je često korištena metoda u proučavanju bioloških uzoraka te su stoga vibracijska svojstva nukleobaza i njihovih derivata od velike važnosti. IR spektroskopija nudi visoku osjetljivost, specifičnost i neinvazivno istraživanje uzoraka.

Snimljeni spektar gvanina i dobiveni eksperimentalni podaci uspoređeni su s izračunatim podacima dobivenih B3LYP/Gatti metodom.¹¹ Izračuni su izvedeni koristeći B3LYP (Becke, troparametarski, Lee–Yan–Parr) jednofunkcionalnu gustoću implementiranu u Crystal softveru. Harmonične vibracijske frekvencije i intenziteti dobiveni su na Γ točki. Većina prikazanih izračuna IR spektra koristila je bazne setove koje su predložili Gatti i sur. Primijenjeni su sljedeći bazni setovi za odgovarajuće atomske centre: 3-1p1G za vodik, 6-31d1G za ugljik i dušik te 6-31d1 za atome kisika. Za preciziranje simuliranih IR spektra nukleobaza uključivanjem doprinosa neosnovnih pojaseva, potrebno je koristiti učinkovit anaharmonični pristup. Metode temeljene na vibracijskoj perturbacijskoj teoriji drugog reda (VPT2) su posebno učinkovite i stoga preferirane za ovu vrstu istraživanja. Korišten je deperturbirani VPT2 (DVPT2) pristup. Ova VPT2 varijanta uvedena je za poboljšanje tretmana rezonancija i minimiziranje mogućnosti pogrešnih rezultata za čvrsto povezane modove. Parametri za tretman povezivanja modova u DVPT2 shemi postavljeni su na zadane vrijednosti. Za uspostavljanje najučinkovitijeg pristupa, predstavljene su glavne strukturne značajke kristaliničnih nukleobaza serijom sve jednostavnijih molekularnih modela. Početna molekularna geometrija klastera izvučena je iz literature kristalnih struktura. Za informacije o unutar- i međuslojnim interakcijama čvrstih nukleobaza, bile su potrebne najmanje četiri molekule u dva sloja.

Na slici 4 prikazan je IR spektar gvanina dobiven eksperimentalno te izračunat B3LYP/Gatti metodom. U tablici 1 prikazane su uočene vrpce u IR spektrima i dana je njihova asignacija. Jaki duplet pojavljuje se u području $1750\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$, koji potječe od $\delta\text{ NH}$, $\delta\text{ NH}_2$, ili $\nu\text{ C=O}$ vibracija. U području $1500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ pojavljuje se mnoštvo vrpca slabog do srednjeg intenziteta. Ove vrpce imaju tendenciju slabijeg grupiranja kod purinskih baza. Na nižim valnim brojevima, doprinosi unutarnjih deformacija (NH, CH, i prsten) su manji.



Slika 4. Spektar gvanina dobiven eksperimentalnim podacima (crveno) i izračunom B3LYP/Gatti metodom (izvor 11)

U cijelom IR području otiska prsta nukleobaza može se uočiti značajna razina delokalizacije modova, osobito za modove koji uključuju vibracije prstena. Ove vibracije otkrivaju značajno miješanje unutarnjih koordinata. U području otiska prsta, većina normalnih koordinata nukleobaza u periodičnoj aproksimaciji sadrži značajan doprinos deformacija prstena, uključujući najintenzivnije vrpce (područja $1800\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ i $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$). Promatrana delokalizacija u potpunosti je u skladu s eksperimentalnim podacima i teoretskim predviđanjima. U području $1050\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ javljaju se odvojene i intenzivne vrpce zbog deformacije zibanja NH_2 i deformacijskih modova NH izvan ravnine.

Tablica 1. Vrpce gvanina dobivene u IR spektrima (eksperimentalno i izračunom)

Broj vrpce	Položaj vrpce (cm ⁻¹)			Asignacija
	Exp.	Neskalirani	Skalarani	
1	3326.0	3479	3312	$\nu_{ks}NH_2$
2	3113.9	3364	3209	ν_sNH_2
3	~3061	3331	3179	ν_sNH_2
4	2987.8			
5	2900.5	3264	3119	νNH
6	2847.9	3232	3090	νNH
7	~2775	3067	2940	νNH
8	2695.7	3020	2900	νNH
9	1649.4	1750	1644	$\delta_{sciss}NH_2, \delta_{ip}NH$
10	1672.0	1782	1665	$\delta_{sciss}NH_2, \delta_{ip}NH$
11	1634.1	1724	1643	$\delta_{sciss}NH_2, \delta_{ip}NH$
12	1549.5	1592	1540	$\delta_{ip}(\text{ring}), \delta_{ip}NH$
13	1476.8	1526	1478	$\delta_{ip}(\text{ring})$
14	1461.5	1510	1463	$\delta_{ip}NH$
15	1416.4	1467	1430	$\delta_{ip}CH$
16	1371.8	1423	1389	$\delta_{ip}NH$
17	1261.5	1299	1263	$\delta_{ip}NH, \delta_{ip}CH, \delta_{ip}(\text{ring})$
18	1214.8	1250	1221	$\delta_{ip}NH, \delta_{ip}CH, \delta_{ip}(\text{ring})$
19	1137.4	1182	1150	$\delta_{ip}NH, \delta_{ip}(\text{ring}), \nu CH$
20	~1148	1185	1158	$\delta_{ip}NH, \delta_{ip}CH, \delta_{ip}(\text{ring}), \nu CH$
21	1119.6	1150	1123	$\delta_{rock}NH_2, \delta_{ip}(\text{ring})$
22	1043.3	1070	1042	$\delta_{rock}NH_2$
23	950.5	970	953	$\delta_{rock}NH_2, \delta_{ip}(\text{ring})$
24	881.7	915	901	$\delta_{ip}(\text{ring}), [5\text{-ring}]$
25	850.5	863	851	$\delta_{oop}(\text{ring})$
26	~840	852	832	$\delta_{ip}(\text{ring})$
27	779.6	820	809	$\delta_{oop}NH$
28	730.9	758	749	$\delta_{oop}NH$
29	704.1	728	719	$\delta_{twist}NH_2, \delta_{oop}(\text{ring})$
30	690.5	701	694	$\delta_{twist}NH_2$
31	663.4	689	682	$\delta_{ip}(\text{ring})$
32	648.6	660	649	$\delta_{twist}NH_2, \delta_{ip}(\text{ring})$
33	604.5	600	595	$\delta_{wagg}NH_2$
34	580.9	577	570	
35	558.5	571	567	$\delta_{wagg}NH_2, \delta_{ip}(\text{ring})$
36	541.4	560	546	$\delta_{ip}(\text{ring}) [6\text{-ring}]$
37	503.8	511	508	$\delta_{ip}(\text{ring}) [6\text{-ring}]$
38	<400	420	419	$\delta_{ip}(\text{ring}) [6\text{-ring}]$
39	410	410	409	$\delta_{ip}C-N(H_2)$

ν - istezne vibracije, δ – vibracije svijanja (stiženje)

2.3.1. Anharmonične korekcije IR spektra

Anharmonični proračuni u periodičnim sustavima su zahtjevni i izuzetno skupi, što ograničava broj mogućih primjena. Ali, učinkovita anharmonična korekcija simuliranih IR spektra u kristalnom modelu mogla bi olakšati interpretaciju spektra, budući da anharmonični učinci imaju značajan utjecaj na najvažnije i najkarakterističnije vrpce nukleobaza u biospektroskopiji (N-H i deformacije prstena te istežanja C-O veze).

Implementacija VPT2 sheme omogućuje kombiniranje pojednostavljenog anharmoničnog silnog polja dobivenog na nižoj razini teorije, s harmoničnim podacima dobivenim iz proračuna višeg reda.

U tu svrhu korišteni su konačni modeli koji predstavljaju strukturne motive kristalnih nukleobaza: monomere, dimere i klastere. Geometrije dimera i klusterske strukture zahtijevale su optimizaciju kako bi postale stvarni minimumi na površini potencijalne energije. Posljedično, rezultirajuća geometrija osnovnog stanja modela bila je iskrivljena u usporedbi s kristalnom strukturom. Za minimizaciju razine deformacije povećanjem točnosti dugodosežnih disperzijskih interakcija, korišten je B3LYP funkcional gustoće s osnovnim skupom 6-31++G(d,p) i empirijsku korekciju za disperziju (GD3BJ).

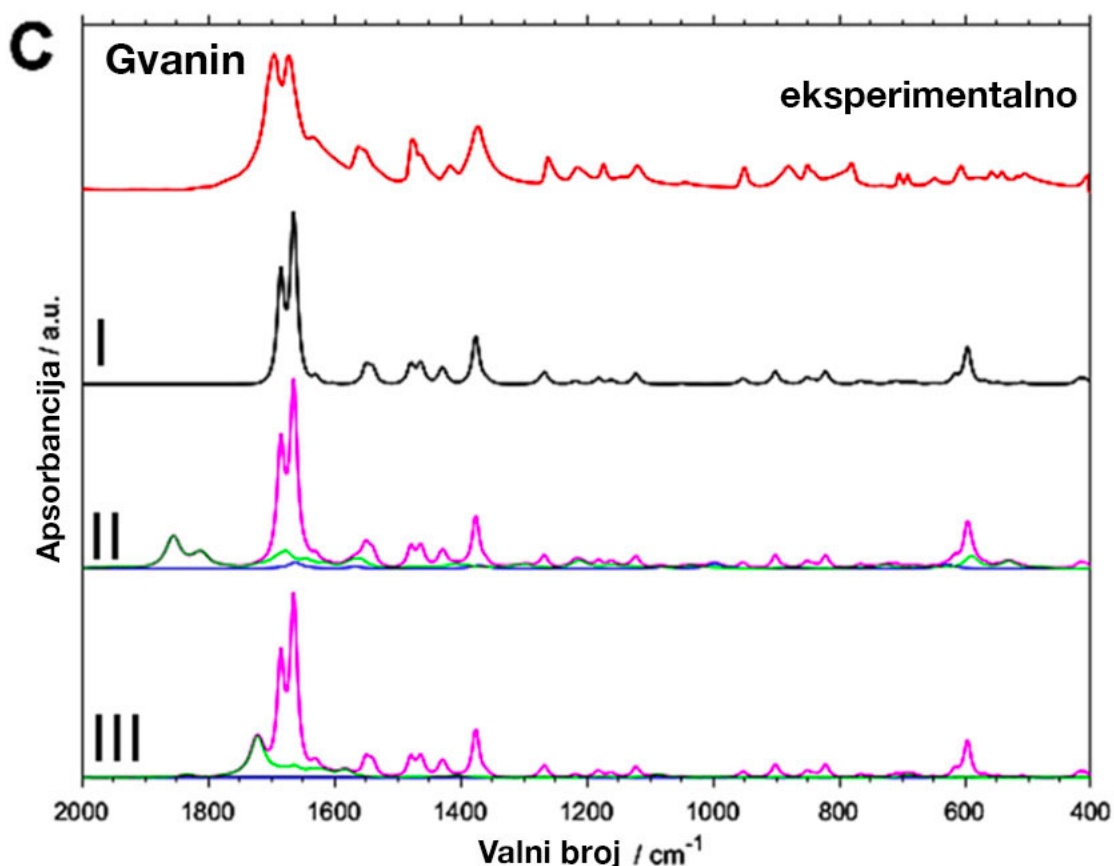
Uz povoljan trošak proračuna, aproksimacija jedne molekule pružila je poboljšanje eksperimentalnog područja otiska prsta IR spektra usporedivo s onim dobivenim iz dimera ili klastera od šest molekula.

Specifično u slučaju gvanina, korištenje dimer modela kao baze za anharmoničnu korekciju dovelo je do točnijeg simuliranog spektra.

Može se zaključiti da se ova pojednostavljena korekcija može uspješno koristiti za kvalitativno poboljšanje IR spektra simuliranih u trodimenzionalnoj periodičnoj reprezentaciji kristalnog uzorka. Ovaj pristup omogućuje objašnjenje razlika u obliku spektra uočenih u blizini δ NH/ δ NH₂ dubleta.

U IR spektru gvanina (slika 5) najočitija pojava kombiniranih vrpce može se vidjeti u području 1650–1600 cm⁻¹. Brojne kombinirane vrpce u ovom području dobivaju na intenzitetu kroz rezonanciju s jakim dubletom iz osnovnih prijelaza (1695 i 1672 cm⁻¹; glavni doprinosi; $\delta_{\text{sciss}}\text{NH}_2$ i $\delta_{\text{ip}}\text{NH}$). Najvažnije kombinacije uključuju deformaciju prstena izvan ravnine s deformacijom prstena unutar ravnine (1611 cm⁻¹), striženje NH₂ sa svijanjem NH unutar ravnine (1623 cm⁻¹) i deformaciju prstena unutar ravnine (oba prstena; simetrično) s deformacijom prstena unutar ravnine (1624 cm⁻¹; atomske pomake lokalizirane uglavnom na

C-N(H)-C dijelu peteročlanog prstena). Ove vrpce odgovorne su za širenje vrpce na 1634 cm^{-1} ($\delta_{\text{sciss}}\text{NH}_2$, $\delta_{\text{ip}}\text{NH}$; Tablica 1). Manje širenje vrpce dubleta na 1695 i 1672 cm^{-1} može se pripisati kombinacijama uvijanja NH_2 kao i svijanju NH izvan ravnine sa svijanjem NH unutar ravnine (1770 cm^{-1}). Doprinos kombiniranih vrpce također se vidi na vrpce dubleta na 1477 i 1462 cm^{-1} , na ramenu vrpce pri 1372 cm^{-1} te na vrpce pri 731 cm^{-1} . Vrpca na 605 cm^{-1} je značajno pojačana prijelazom $2(\delta_{\text{twist}}\text{NH}_2; \delta_{\text{oop}}\text{NH})$ u rezonanciji s $\delta_{\text{wagg}}\text{NH}_2$.



Slika 5. Eksperimentalni i simulirani IR spektri gvanina u području otiska prsta (I) i nakon dodatne anharmoničke korekcije, II: DVPT2//B3LYP-GD3BJ/6-31++G(d,p) monomer, III: DVPT2//B3LYP-GD3BJ/6-31G(d,p) dimer. Zelena linija, doprinos binarnih kombinacija; plava linija, doprinos prvih harmonika (izvor 11)

2.4. Primjena infracrvene spektroskopije gvanina u antitumorskim lijekovima

Nedostatak metoda za rano otkrivanje raka razlog je potrage za novim dijagnostičkim pristupima. Jedan od inovativnih pristupa je infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama (FT-IR spektroskopija). Ova metoda je pogodna zbog svoje brzine, jednostavnosti i ekonomske isplativosti te ima potencijal značajno poboljšati dijagnostiku i ishod bolesti otkrivanjem biokemijskih promjena na molekularnoj razini uzrokovanih metaboličkim procesima tijekom razvoja raka.

Tumori predstavljaju abnormalni rast stanica koje mogu biti benigni (neinvazivni) ili maligni (invazivni i skloni širenju). Maligni tumori, ili karcinomi, predstavljaju ozbiljnu prijetnju zdravlju jer se mogu širiti po tijelu (metastazirati) i ometati normalne funkcije organa i tkiva. Uzroci nastanka tumora su višestruki i uključuju genetske mutacije, izloženost kemijskim karcinogenima, ionizirajućem zračenju, viruse i druge čimbenike.

Nukleinske kiseline, DNA i RNA, igraju ključnu ulogu u razvoju tumora jer genetske mutacije i epigenetske promjene u DNA često vode do nekontroliranog rasta stanica. Gvanin, kao jedna od četiri osnovne baze u DNA i RNA, sudjeluje u kritičnim procesima unutar stanice. Mutacije koje utječu na gvanin mogu uzrokovati nepravilno funkcioniranje gena koji reguliraju staničnu diobu, popravak DNA i apoptozu (programiranu staničnu smrt).

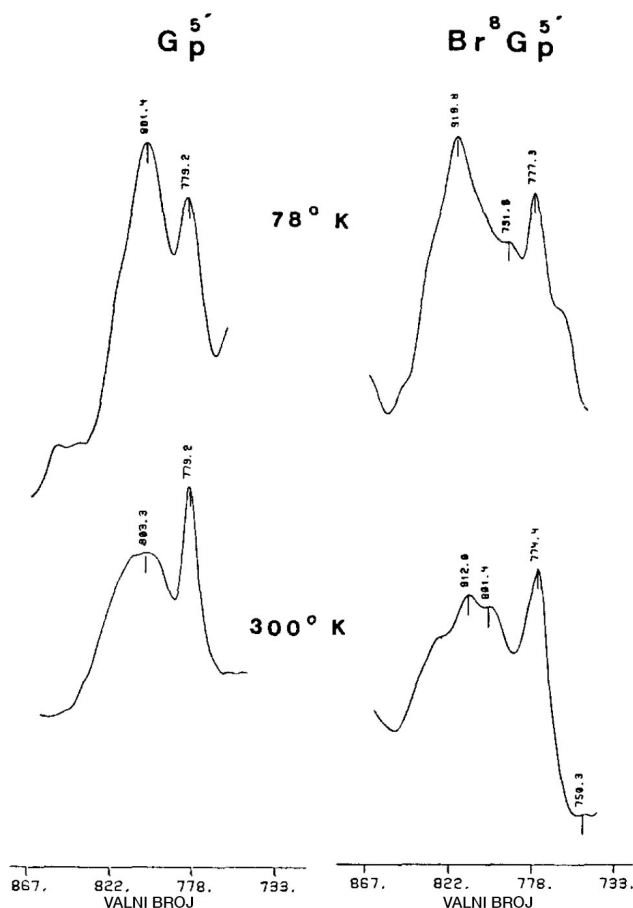
Antitumorski lijekovi djeluju na različite načine kako bi zaustavili ili usporili rast tumorskih stanica.¹³

Uloga gvanina u antitumorskoj terapiji posebno je zanimljiva zbog njegove ključne pozicije u strukturi i funkciji DNA. Modifikacije gvanina, poput alkilacije ili metilacije, mogu ozbiljno oštetiti DNA tumorskih stanica. Lijekovi koji ciljaju gvaninske baze mogu izazvati puknuće lanca DNA i spriječiti pravilnu replikaciju tumorskih stanica, što dovodi do njihove smrti.

FT-IR spektroskopija može se koristiti za analizu učinaka antitumorskih lijekova na molekularnoj razini. Ova tehnika omogućava praćenje promjena u vibracijama molekula unutar stanice, što može otkriti kako lijekovi mijenjaju strukturu i funkciju DNA. Na taj način, FT-IR spektroskopija doprinosi razvoju novih lijekova i optimizaciji postojećih tretmana.

Istražene su konformacijske promjene u gvanozinu i gvanozin-5'-monofosfatu (GMP) kada se vodikov atom na poziciji 8 (H8) gvanina zamijeni velikim, teškim atomom kao što je

brom (Br). Identificirani su različiti konformacijski oblici gvanozina i GMP-a: sin i anti konfiguracije te C2'-endo i C3'-endo konfiguracije šećera.¹² Dobiveni spektri uzoraka snimani pri 78 K i 300 K su prikazani na slici 6.



Slika 6. Infracrveni spektri gvanozina i gvanozin-5'-monofosfata pri različitim temperaturama (izvor 12)

Supstitucija na H8 s bromom značajno mijenja molekularnu konformaciju, pri čemu utječe na njezinu interakciju s određenim enzimima. Također, bromiranje stabilizira Z-DNA strukturu.

FT-IR spektri za Gp^{5'} i Br⁸Gp^{5'} u području vibracija prstena šećera prikazani su na slici 6. Spektri snimljeni na temperaturama tekućeg dušika pokazuju značajne promjene relativnih intenziteta vrpce blizu 800 cm⁻¹. Ovo područje je karakteristično za vibracije šećer-fosfat koje su indikativne za šećer C2'-endo, anti konformacije.

Infracrveni spektri dobiveni su iz vodenih otopina (0,02 M) pri 300 K i u krutom stanju iz liofiliziranih vodenih otopina na 78 K . U tim uvjetima i na sobnoj temperaturi (27 °C)

opažena je intenzivna vrpca kod Gp^{5'} i široka intenzivna vrpca kod Br⁸Gp^{5'}, koja može biti rezultat preklapanja nekoliko vrpca. Tri različite vrpce za Br⁸Gp^{5'} mogu biti posljedica triju šećernih konformacija koje stvaraju interakcije s vodom, tj., 825 cm⁻¹ (C2'-*endo, anti*), 812 cm⁻¹ (C2'-*endo, syn*) i 803,3 cm⁻¹ (C3'-*endo, anti*). Vrpca na 779,2 cm⁻¹ pripisuje se vibraciji disanja pirimidinskog prstena i može se smatrati kalibracijskom vrpcom, jer se samo neznatno mijenja pri kompleksiranju s metalom ili CS-substituciji. Nakon liofilizacije uzoraka na temperaturi tekućeg dušika (77 K), prevladavajuća vrpca za Gp^{5'} je na 801,4 cm⁻¹ (C3'-*endo, anti*), dok je za Br⁸Gp^{5'} prevladavajuća vrpca pri 818,8 cm⁻¹ koja se može pripisati (C3'-*endo, syn*) konformaciji šećera.

Ponašanje nukleobaza na niskim temperaturama ukazuje na stabilizaciju najnižih energijskih konformacija triju izomera. U prikazanom radu, najstabilnije konformacije pronađene liofilizacijom nukleotida na temperaturi tekućeg dušika čine se C3'-*endo, anti* i C3'-*endo, syn* za Gp^{5'} i Br⁸Gp^{5'}. Ovaj rezultat je zanimljiv jer je poznato da sušenjem nukleinskih kiselina dobivamo A-oblik DNA, gdje je šećer u C3'-*endo, anti* konformaciji. Međutim, ako postoji glomazna supstitucija na C8 položaju, *syn* konformacija postaje dominantnija pa je šećer u C3'-*endo, syn* konformaciji.

Karcinogen kao što je 2-acetilaminofluoren (AAF), kada je supstituiran na C8 položaju gvanina, ima tendenciju mijenjanja C2'-*endo, anti, gg* (B-DNA) konformacije u C3'-*endo, syn, gt*, što može biti preteča Z-DNA konformacije. S druge strane, antikancerogeni lijek poput cisplatina pretežno mijenja C2'-*endo, anti, gg* konformaciju (B-DNA) u C3'-*endo, anti, gg* konformaciju (A-DNA). Slične konformacijske promjene opažene su i kod interkalirajućih lijekova. Molekula DNA može mijenjati svoju konformaciju na nekoliko načina uslijed vezanja lijeka ili antibiotika modifikacijom šećera i/ili orijentacije baza. Ovo preoblikovanje dvostruke uzvojnice DNA moglo bi biti posljedica promjene u *syn-anti* konformacijama koje mogu aktivirati gene i inducirati rak ili pokazati antitumorsku aktivnost.

Sveukupno razumijevanje uloge nukleinskih kiselina i baza poput gvanina u tumorima i njihovom liječenju pruža temelj za razvoj učinkovitijih antitumorskih terapija. Kombinacija molekularne biologije, kemije i naprednih analitičkih tehnika, kao što je FT-IR spektroskopija, omogućava daljnje istraživanje i poboljšanje metoda za borbu protiv raka.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Thompson, *Infrared Spectroscopy*, Pan Stanford, Singapore, 2018, str. 7–16.
2. B. C. Smith, *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, CRC Press, Boca Raton, 2011, str. 8–19.
3. <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html> (datum pristupa: 2. srpnja 2024.)
4. https://personal.utdallas.edu/~scortes/ochem/OChem_Lab1/recit_notes/ir_presentation.pdf (datum pristupa: 2. srpnja 2024.)
5. https://www.fkit.unizg.hr/download/repository/Nastavni_tekst_Molekulska_spektroskopija.pdf (datum pristupa: 1. srpnja 2024.)
6. P. Ivić, *Primjena infracrvene spektroskopije u biotehnologiji i medicini*, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2021, str. 2–17.
7. T. Jednačak, *Ak2_seminar_5_IR_Raman*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020, str. 2–6.
8. <https://www.britannica.com/science/polymer/Synthetic-polymers> (datum pristupa: 8. srpnja 2024.)
9. P. J. Casey, H. K. W. Fong, M. I. Simonlj, A. G. Gilman, G_z, a Guanine Nucleotide-binding Protein with Unique Biochemical Properties, *The Journal of Biological Chemistry* **265** (1990) 2383–2390.
10. G. M. Bokoch, T. Katada, J. K. Northup, M. Ui, A. G. Gilman, Purification and Properties of the Inhibitory Guanine Nucleotide-binding Regulatory Component of Adenylate Cyclase, *The Journal of Biological Chemistry* **259** (1984) 3560–3567.
11. K. B. Bec, J. Grabska, M. A. Czarnecki, C. W. Huck, M. J. Woźcik, T. Nakajima, and Y. Ozaki, IR Spectra of Crystalline Nucleobases: Combination of Periodic Harmonic Calculations with Anharmonic Corrections Based on Finite Models, *J. Phys. Chem. B* **123** (2019) 10001–10013.
12. M. Polissiou, T. Theophanides, NMR and FT-IR Conformational Studies of Substituted Guanine Nucleosides and Nucleotides and Their Metal Adducts and Cancer, *Inorganica Chimica Acta* **137** (1987) 195–201.
13. K. Al-Jorani, A. Rütter, M. Martin, R. Haputhanthri, G. B. Deacon, H. Lin Li and B. R. Wood, The Application of ATR-FTIR Spectroscopy and the Reversible DNA Conformation as a Sensor to Test the Effectiveness of Platinum(II) Anticancer Drugs, *Sensors* **18** (2018) 4297.