



УДК 547.785.5'55.1'963.32:535.33/34

## СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КРАСИТЕЛЕЙ БИСБЕНЗИМИДАЗОЛЬНОГО РЯДА ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ДНК

© 1997 г. В. С. Сибирцев, А. В. Гарабаджи\*, С. Д. Иванов<sup>#</sup>

Центральный научно-исследовательский рентгенорадиологический институт Минздрава РФ, 189646, Санкт-Петербург, Песочный 2, ул. Ленинградская, 70/4;

\* Санкт-Петербургский государственный технологический институт

Поступила в редакцию 28.10.96 г. Принята к печати 16.06.97 г.

Изучены спектры поглощения, люминесцентного возбуждения и эмиссии красителей бисбензимидазольного ряда в присутствии различных количеств ДНК и в средах различного состава. На основании полученных данных показаны изменения спектральных свойств исследованных соединений в зависимости от условий измерения. Изложены принципы выбора оптимального состава сред для индикации ДНК. Рассматриваются типы связывания лигандов с субстратом и динамика изменения флуоресцентных свойств красителей с различной химической структурой при взаимодействии их с ДНК.

*Ключевые слова:* ДНК, бисбензимидазолы, спектральные свойства.

В последнее время для разработки высокочувствительных экспресс-методов диагностики радиационно-химических поражений и прогноза отдаленной лучевой патологии, для быстрой оценки биологической загрязненности воды, решения экологических проблем, связанных с индикацией действия малых доз генотоксикантов, и т.п. все более широкое применение находят флуоресцентные ДНК-лиганды. Изучение и применение подобных соединений для решения различных практических задач как в нашей стране [1–4], так и за рубежом [4–7] началось уже несколько десятилетий назад. К настоящему времени одними из наиболее часто используемых в качестве флуоресцентных лигандов на ДНК являются внешне-связывающиеся соединения бисбензимидазольного ряда, такие, как Hoechst-33258, Hoechst-33342 и им подобные [8–10]. Механизмы их взаимодействия с субстратом достаточно детально описаны [11, 12]. В то же время проблема поиска новых красителей, более чувствительных, специфичных, избирательных по отношению к различным условиям среды, состоянию клеток, особенностям конформации связывающих их нуклеиновых кислот, по-прежнему остается актуальной. В частности, для разработки алгоритма направленного синтеза новых эффективных флуоресцентных лигандов на нуклеиновые кислоты интерес представляет изучение взаимосвязи между спектральными свойствами и особенностями химической структуры соединений одного типа.

С этой целью были исследованы пять соединений бисбензимидазольного ряда:

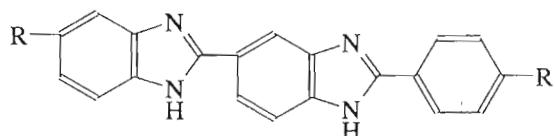
2-[2-(4-гидроксифенил)бензимидазол-5(6)-ил]-5(6)-(4-метилпиперазин-1-ил)бензимидазол (Hoechst-33258) (I);

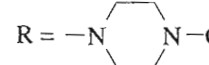
2-[2-(4-этоксифенил)бензимидазол-5(6)-ил]-5(6)-(4-метилпиперазин-1-ил)бензимидазол (Hoechst-33342) (II);

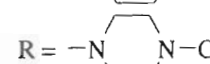
2-[2-(4-гидроксифенил)бензимидазол-5(6)-ил]-5(6)-(пиперазин-1-ил)бензимидазол (III);

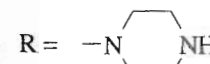
1,4-бис[5(6)-(4-метилпиперазин-1-ил)бензимидазол-2-ил]бензол (IV);

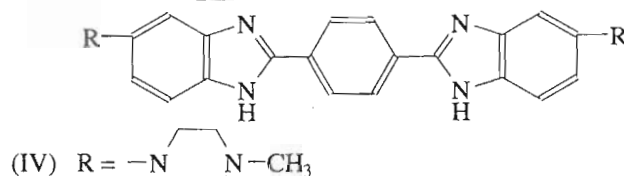
1,4-бис[5(6)-(3-диметиламинопропилкарбамил)бензимидазол-2-ил]бензол (V).

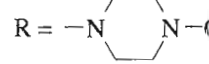


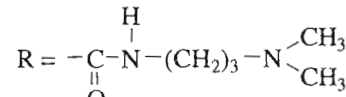
(I) R = -CH<sub>3</sub>; R' = -OH

(II) R = -CH<sub>3</sub>; R' = -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>

(III) R = NH; R' = -OH



(IV) R = -CH<sub>3</sub>

(V) R = 

<sup>#</sup> Автор для переписки.

**Таблица 1.** Длины волн (нм) максимумов люминесцентного возбуждения ( $\lambda_{\text{в}}$ ) и эмиссии ( $\lambda_{\text{эм}}$ ), а также изобестических точек ( $\lambda_{\text{и1}}-\lambda_{\text{и3}}$ ), зарегистрированных для исследованных соединений, в зависимости от состава среды и присутствия в ней ДНК\*

Характеристика	Краситель				
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)**
$(\lambda_{\text{в}}^0)_{\text{кв}}$	267	267	267	260	263
$(\lambda_{\text{в}}^{\text{max}})_{\text{кв}}$	282	282	282	275	265
$(\lambda_{\text{в}}^0)_{\text{дв}}$	345	350	345	360	327
$(\lambda_{\text{в}}^{\text{max}})_{\text{дв}}$	353	355	350	370	346
$\lambda_{\text{эм}}^0$	497	500	495	553	400
$\lambda_{\text{эм}}^{\text{max}}$	455	455	455	500	400
$\lambda_{\text{в}}^{\text{ип}}$	353	355	350	369	350
$\lambda_{\text{эм}}^{\text{ип}}$	458	458	458	504	400
$\lambda_{\text{и1}}$	350	354	349	367	332
$\lambda_{\text{и2}}$	383	385	380	395	372
$\lambda_{\text{и3}}$	363	365	362	379	350

\* Индексы "кв" и "дв" соответствуют КВ- и ДВ-максимумам флуоресцентного возбуждения (а также поглощения) исследованных красителей; индексы "о" и "max" указаны для величин, измеренных в водных буферах А–В в отсутствие ДНК и при максимальном соотношении молярных концентраций  $C_{\text{д}}/C_{\text{к}}$  (для ДВ-максимумов  $C_{\text{д}}/C_{\text{к}} > 100$ ; для КВ-максимумов  $C_{\text{д}}/C_{\text{к}} > 200$ ); индексом "ип" отмечены величины, измеренные для соединений (I)–(V) в отсутствие ДНК в изопропанолe (КВ-максимумы флуоресцентного возбуждения и поглощения у исследованных красителей при этом отсутствовали).

\*\* У соединения (V) в спектрах флуоресцентной эмиссии вне зависимости от состава среды имелись также дополнительные максимумы при длинах волн  $\lambda_{\text{эм}} = 380, 420$  и  $450$  нм.

Спектры поглощения, люминесцентного возбуждения и эмиссии этих соединений были изучены при различных соотношениях молярных концентраций ДНК и красителя ( $C_{\text{д}}/C_{\text{к}}$ ) в водных средах различного состава. Поскольку в растворах с высокой ионной силой ослабляются электростатические (ионные) связи в системе ДНК–лиганд [12, 13], а в присутствии 4 М мочевины при низкой ионной силе раствора – водородные связи [14, 15], то для изучения взаимодействия красителей (I)–(V) с ДНК были использованы буферы соответствующего состава. Кроме того, так как возрастанию свечения потенциально активных люминесцентных меток способствует неполярная природа их микроокружения [7, 13, 16, 17], спектральные

свойства соединений (I)–(V) были исследованы в отсутствие ДНК в изопропанолe (в котором молекула красителя находится в условиях микроокружения, наиболее близким тем, которые создаются для нее в узкой бороздке ДНК [13, 17]) и в присутствии неионного детергента Тритон X-100 в разных концентрациях.

Для большинства исследованных в настоящей работе красителей характерно наличие двух максимумов флуоресцентного возбуждения – длинноволнового (ДВ) и коротковолнового (КВ) – и одного максимума эмиссии. При этом максимумы в спектрах возбуждения исследованных красителей совпадали по своему положению с максимумами в спектрах их поглощения в аналогичных условиях (табл. 1). Для соединений (I)–(III), имевших одинаковую структуру ароматического фенилбисбензимидазольного "ядра" молекулы, наблюдаются и одинаковые по своему положению КВ-максимумы возбуждения (и соответственно поглощения) как в "свободном", так и в связанном с ДНК состояниях. В то же время на положение ДВ-максимумов возбуждения влияет даже замена гидроксигруппы на этоксигруппу у фенильного терминального цикла соединений (I) и (II). Таким образом, можно полагать, что КВ-полоса в спектрах возбуждения (и соответственно поглощения) исследованных соединений обусловлена в большей степени характером хромофорных групп, входящих в состав "ядра" их молекулы, а ДВ-полоса – общей структурой молекулы красителя, в том числе характером входящих в ее состав терминальных радикалов. Дополнительным аргументом в пользу этого предположения являются известные данные о том, что более развитая система сопряженных связей соединения приводит к смещению пика его поглощения в более длинноволновую область [19]. Наличие ДВ- и КВ-максимумов возбуждения (и соответственно поглощения) было показано также для других ДНК-связывающихся соединений: монофенилбензимидазольного и монофенилиндольного ряда [13, 20], нетропсина, дистамицина А [21], этидия бромида [7].

Из спектров поглощения красителей (IV) и (V) с добавлением ДНК тимуса телянка в низкосолевого буфера А\* (рис. 1) видно, что при увеличении соотношения концентраций  $C_{\text{д}}/C_{\text{к}}$  от 0 до 200 имел место батохромный сдвиг длины волны максимума поглощения ( $\lambda_{\text{п}}$ ) на 5–15 нм. Поглощательная способность раствора при этом с увеличением количества ДНК сначала уменьшалась (до молярного соотношения  $C_{\text{д}}/C_{\text{к}} \cong 10$ ), а затем начинала возрастать, выявляя две изобестические точки при длинах волн  $\lambda_{\text{и1}}$  и  $\lambda_{\text{и2}}$  соответственно.

\* Состав буферов – см. "Экспериментальную часть".

Спектры поглощения соединений (I)–(III) имели сходный характер с таковым для красителя (IV) (см. табл. 1, а также работу [13]). При этом для всех исследованных красителей соблюдался ряд  $\lambda_{и2} > \lambda_n^{\max} > \lambda_{и1} > \lambda_n^0$  (где  $\lambda_n^{\max}$  и  $\lambda_n^0$ , нм – длины волн, соответствующие ДВ-максимумам поглощения при соотношении молярных концентраций  $C_d/C_k > 10$  и в отсутствие ДНК). Подобная неоднозначность изменения поглощательной способности системы при наличии двух изобестических точек свидетельствует, как показано в работах [13, 14], о наличии у исследованных соединений в данных условиях двух типов связывания с полинуклеотидом. Таким образом, по мере увеличения концентрации ДНК в системе изменяется тип взаимодействия между лигандом и субстратом. При соотношениях концентраций в системе  $C_d/C_k < 10$  преобладает один тип взаимодействия, соответствующий  $\lambda_{и1}$ , а при  $C_d/C_k > 10$  – другой тип связывания, соответствующий  $\lambda_{и2}$ .

Как уже отмечалось, кроме рассмотренного выше ДВ-максимума, в спектрах поглощения у всех исследованных соединений имелся также второй – КВ-максимум. Это можно видеть на рис. 2, где представлены спектры поглощения и флуоресценции красителей (I)–(V) в низкосолевом буфере А в отсутствие ДНК. Однако область локализации меньшего по своей интенсивности КВ-максимума поглощения исследуемых красителей совпадала с областью поглощения ДНК (260–280 нм), что оказывало значительное маскирующее влияние. В то же время на спектры флуоресцентного возбуждения красителей ДНК не оказывает подобного маскирующего влияния, поскольку в свободном состоянии при комнатной температуре полинуклеотид практически не люминесцирует. Поэтому в спектрах флуоресцентного возбуждения исследованных соединений (на примере красителей (IV) и (V) в низкосолевом буфере А в присутствии ДНК тимуса телят (рис. 3) также можно наблюдать два максимума. С изменением соотношения концентраций  $C_d/C_k$  в системе поведение данных максимумов было несколько различно. В частности, интенсивность свечения при ДВ-возбуждении соединений (I)–(IV) монотонно возрастала с увеличением  $C_d/C_k$  от 0 до 200. В то же время при КВ-возбуждении с увеличением концентрации ДНК в области значений  $C_d/C_k > 100$  свечение исследованных соединений начинало убывать (рис. 3). Исключение составило соединение (V), у которого при  $C_d/C_k > 160$  свечение начинало уменьшаться как при КВ-, так и при ДВ-возбуждении (поглощательная способность соединения при этом оставалась неизменной). Кроме того, у красителя (V) в данных условиях ( $C_d/C_k > 160$ ) появлялся дополнительный КВ-максимум возбуждения при длине волны ( $\lambda_n$ ) 280 нм.

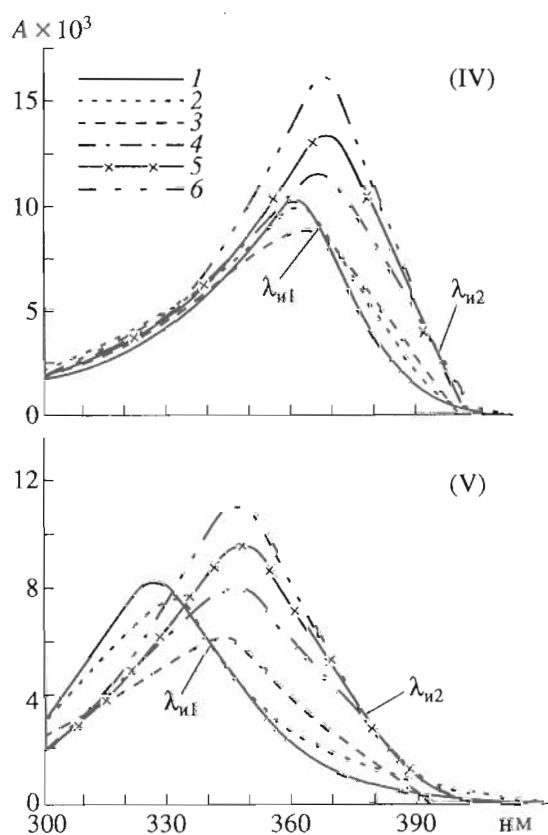


Рис. 1. Спектры поглощения соединений (IV) и (V) в присутствии ДНК в низкосолевом буфере А (см. "Экспериментальная часть"). Кривым 1–6 соответствуют отношения молярных концентраций  $C_d/C_k = 0, 3.5, 10, 50, 100$  и  $200$ .  $\lambda_{и1}$  и  $\lambda_{и2}$  указывают положение изобестических точек, зарегистрированных для исследованных соединений.

Спектры флуоресцентной эмиссии исследованных красителей в присутствии ДНК в низкосолевом буфере А при ДВ-возбуждении (рис. 4) свидетельствуют о том, что у соединения (IV) в рассматриваемых условиях наблюдается лишь один максимум флуоресцентной эмиссии. Отметим, что для красителей (I)–(IV) рассматриваемые спектры имеют сходный характер (см. табл. 1 и работу [13]). При увеличении соотношения концентраций  $C_d/C_k$  в системе в диапазоне  $C_d/C_k = 0–30$  длина волны максимума флуоресцентной эмиссии соединений (I)–(IV) испытывала значительный гипсофлорный сдвиг ( $\cong 50$  нм), а затем (при дальнейшем увеличении  $C_d/C_k$  в системе) оставалась неизменной. В то же время соединение (V) выявляло в присутствии ДНК структурированность своих эмиссионных спектров с максимумами при длинах волн  $\lambda_{эм} = 380, 400, 420$  и  $450$  нм соответственно. Положение этих максимумов с увеличением соотношения концентраций  $C_d/C_k$  в системе не менялось. Величины стоксовых сдвигов для соединений (I)–(V) при увеличении  $C_d/C_k$  в системе уменьшались,

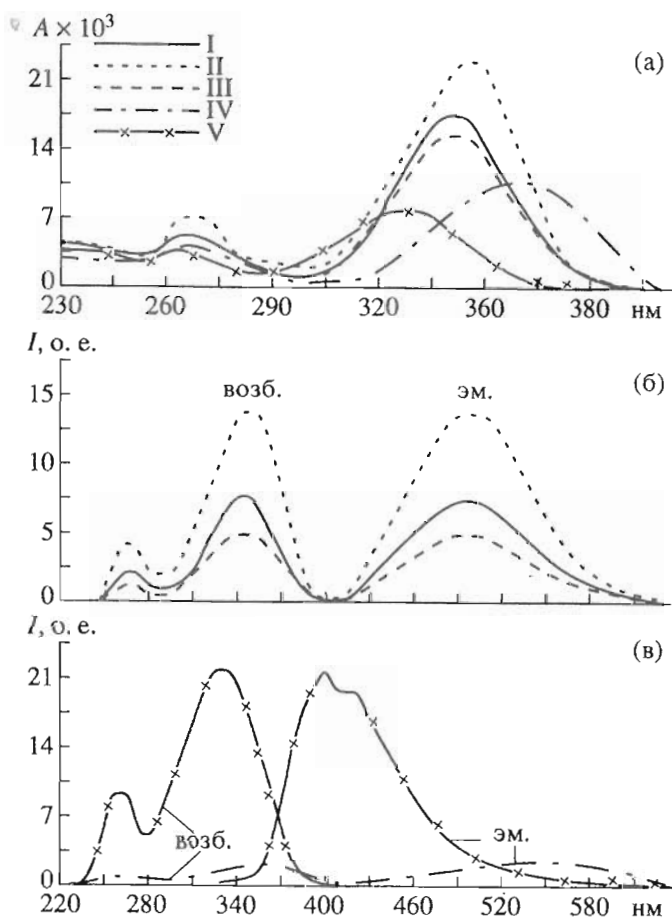


Рис. 2. Спектры поглощения (а), флуоресцентного возбуждения (б) и эмиссии (в) исследованных соединений в низкосолевого буфере А в отсутствие ДНК. Кривые I-V соответствуют соединениям (I)-(V).

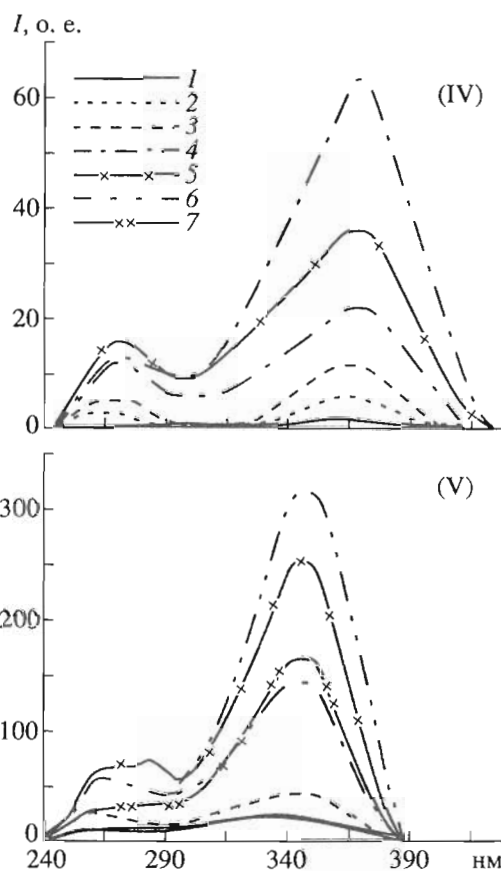


Рис. 3. Спектры флуоресцентного возбуждения соединений (IV) и (V) в присутствии ДНК в низкосолевого буфере А. Кривым 1-6 для соединения (IV) соответствуют отношения молярных концентраций  $C_d/C_k = 0, 3.5, 10, 50, 100$  и  $200$ ; кривым 1-7 для соединения (V) —  $C_d/C_k = 0, 3.5, 10, 50, 100, 160$  и  $230$ .

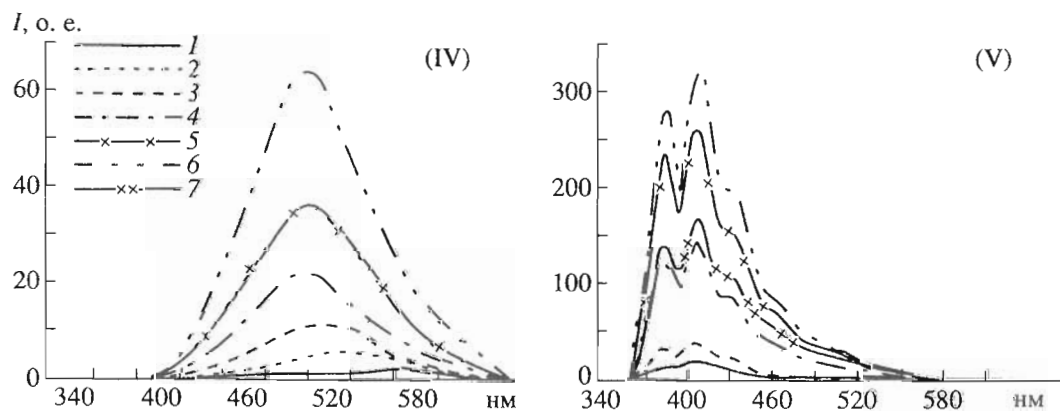


Рис. 4. Спектры флуоресцентной эмиссии соединений (IV) и (V) в присутствии ДНК в низкосолевого буфере А. Условные обозначения те же, что и на рис. 3.

кроме случая КВ-возбуждения для соединения (V) (см. табл. 1).

Характер изменения спектров соединения (I) в присутствии ДНК в буферах Б\* (с мочевиной) и В

\* Состав буферов — см. "Экспериментальную часть".

(с высокой ионной силой) (рис. 5) в целом был сходен с ранее наблюдавшимся для него в низкосолевого буфере А (рис. 2). В то же время из данных, представленных на рис. 5 и в табл. 2, можно видеть, что по сравнению с буфером А в буферах Б и В имело место менее значительное изменение

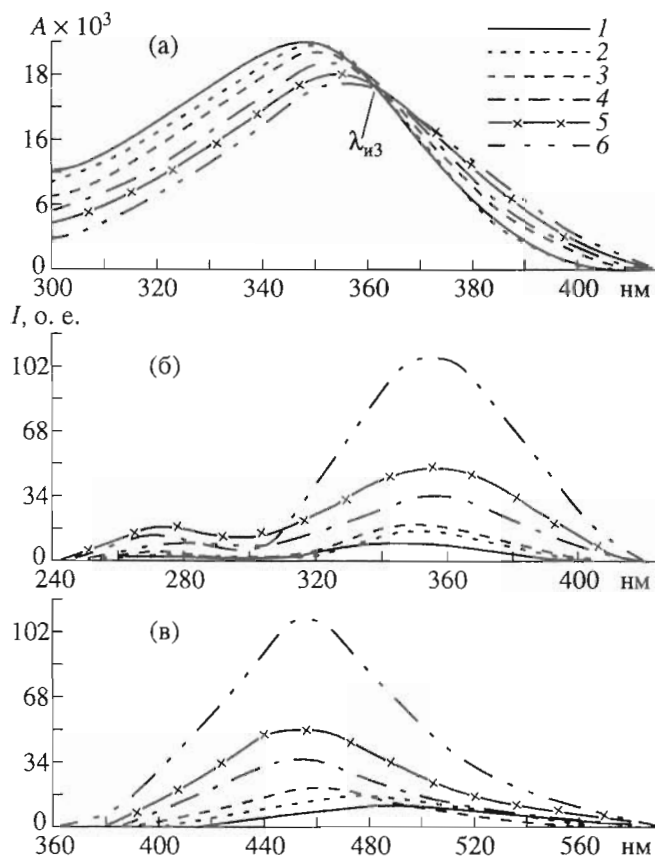


Рис. 5. Спектры поглощения (а), флуоресцентного возбуждения (б) и эмиссии (в) соединения (I) в присутствии ДНК в буфере В с высокой ионной силой (см. "Экспериментальную часть"). Кривым 1–6 соответствуют отношения молекулярных концентраций  $C_d/C_k = 0, 3, 5, 10, 50, 100$  и  $200$ .

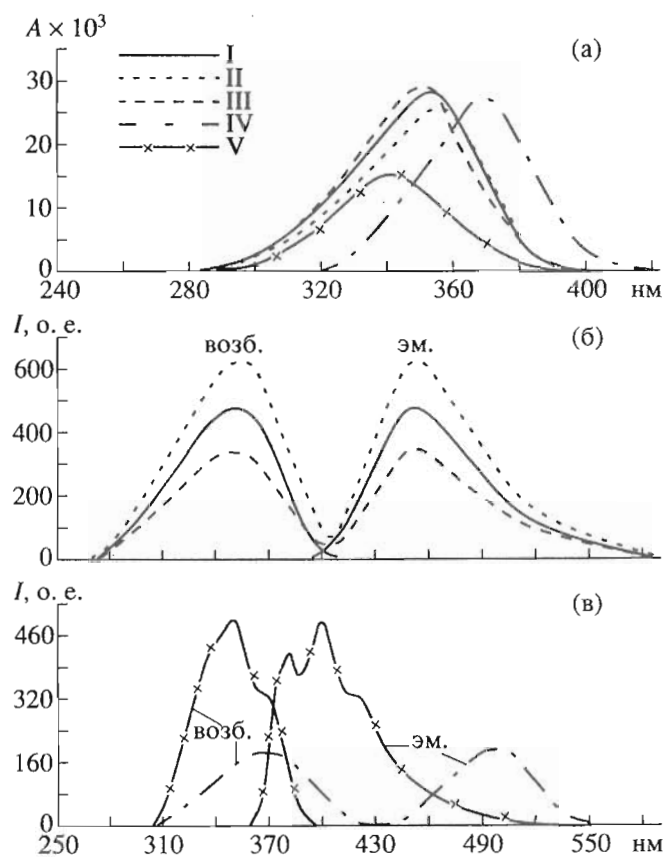


Рис. 6. Спектры поглощения (а), флуоресцентного возбуждения (б) и эмиссии (в) исследованных соединений в отсутствие ДНК в изопропанол. Кривые I–V соответствуют соединениям (I)–(V).

спектральных характеристик красителя при увеличении концентрации ДНК. Кроме того, в буфере В происходило монотонное уменьшение поглощательной способности соединения (I) во всем исследуемом диапазоне соотношений концентраций  $C_d/C_k$  в системе при том же батохромном сдвиге длины волны максимума поглощения, что и в буфере А, и выявлялась единственная изобестическая точка при длине волны  $\lambda_{из}$ , промежуточной между длинами волн двух изобестических точек ( $\lambda_{и1}$  и  $\lambda_{и2}$ ), характерных для данного соединения в низкосолевых буферах А и Б. Аналогичная закономерность изменения спектральных характеристик в описанных буферах наблюдалась для красителей (II)–(V) (см. табл. 1, 2).

Спектральные данные, полученные для исследованных красителей в отсутствие ДНК в изопропанол, представлены на рис. 6. При сопоставлении приведенных результатов (см. рис. 1–4, 6 и табл. 1, 2) можно заключить, что спектральные характеристики ДВ-области поглощения и флуоресценции красителей (I)–(V) в изопропанол (имеющем величину диэлектрической проницае-

мости среды  $\chi = 20.1$ ) были более близки к данным, полученным в низкосолевом водном буфере А ( $\chi = 78$ ) при высоких значениях  $C_d/C_k$ , чем к данным, полученным при отсутствии в этом буфере ДНК. В КВ-области максимумы поглощения, а соответственно и флуоресцентного возбуждения у исследованных соединений, помещенных в спиртовую среду, пропадали.

Добавление неионного детергента оказывало на спектры исследуемых соединений влияние, подобное изопропанолу. В качестве примера на рис. 7 приведены спектры поглощения и флуоресценции соединения (I) в низкосолевом буфере А в присутствии неионного детергента в различных концентрациях. Видно, что с увеличением содержания в среде неионного детергента происходит монотонное увеличение интенсивности только ДВ-максимума возбуждения (и соответственно поглощения) красителя при батохромном сдвиге его, аналогичном наблюдающемуся для системы ДНК–лиганд. При этом в спектрах поглощения соединения (I) в присутствии Тритона X-100 (Т) выявлялась изобестическая точка при длине



Таблица 2. Спектральные свойства исследованных соединений в средах различного состава и в присутствии различных количеств ДНК

Характеристика	Краситель					Характеристика	Краситель				
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)		(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)
$\Phi_0 \times 10^3$	10.7	15.4	8.1	5.0	66.8	$\epsilon_{дв} \times 10^{-3}$	27.3	35.5	24.4	17.1	12.5
$\Phi_{max}$	0.45	0.60	0.32	0.20	0.92	$\epsilon_{кв} \times 10^{-3}$	8.1	11.1	6.5	5.6	6.2
$(\Phi_{max}/\Phi_0)_A$	41.60	39.10	39.60	38.80	13.80	$\mu_{дв} \times 10^{-6}$	11.7	21.6	7.8	3.4	33.3
$(\Phi_{max}/\Phi_0)_B$	18.20	18.20	15.30	19.90	9.45	$\mu_{кв} \times 10^{-6}$	3.4	6.5	2.0	1.0	14.5
$(\Phi_{max}/\Phi_0)_B$	21.90	19.30	23.00	17.60	4.71	$\eta_1^A \times 10^{-6}$	4.90	4.23	6.06	2.13	1.16
$\Phi_{ип}/\Phi_0$	38.50	35.42	36.18	35.61	12.60	$\eta_{10}^A \times 10^{-6}$	4.07	3.57	2.45	1.34	4.31
$\Phi_{сах}/\Phi_0$ [18]	7.0	6.4	6.9	8.4	2.0	$\eta_{100}^A \times 10^{-6}$	1.69	2.85	1.18	0.44	3.52
$H, \%$	51	48	57	44	29	$\eta_{10}^B \times 10^{-6}$	1.50	1.47	0.72	0.77	3.63
$X, \%$	43	45	37	50	65	$\eta_{10}^B \times 10^{-6}$	1.23	1.35	1.04	0.39	1.37
$H/X$	1.19	1.07	1.54	0.88	0.45	$\Psi$	0.82	0.92	1.44	0.51	0.38
$E/R$ [18]	5.76	6.04	5.54	4.10	11.80						

Примечания.  $\Phi$  – квантовые выходы красителей; индексами “А”, “В”, “В” и “сах” обозначены величины, полученные для исследованных соединений в водных буферах А–В и 50% растворе сахарозы; остальные индексы – как в табл. 1;

$H$  и  $X$  – относительные вклады водородных и ионных связей в образование специфического активно флуоресцирующего комплекса ДНК–краситель (см. “Экспериментальную часть”);

$E$  и  $R$  – относительные вклады процессов внутримолекулярного донорно-акцепторного взаимодействия и ротационной диффузии в изменение флуоресценции молекулы красителя в растворе при взаимодействии ее с ДНК (из работы [18]);

$\epsilon$  ( $M^{-1} cm^{-1}$ ) и  $\mu$  (о. е.  $M^{-1} cm^{-1}$ ) – молярные коэффициенты поглощения и флуоресценции исследованных соединений в отсутствие ДНК в низкосолеовом буфере А при ДВ- и КВ-возбуждении;

$\eta$  (о. е.  $M^{-1}$ ) – коэффициенты флуоресцентной чувствительности исследованных соединений по отношению к ДНК (см. “Экспериментальную часть”) в буферах А–В при ДВ-возбуждении и отношениях молярных концентраций  $C_d/C_k = 1, 10$  и  $100$  соответственно; для соединения (V) (как и в случае вычисления величин  $\epsilon$  и  $\mu$ ) взят максимальный из зарегистрированных для него пиков эмиссии;  $\Psi = \eta_{10}^B / \eta_{10}^A$ .

волны  $\lambda_{и4} = 346$  нм, а положение максимума и интенсивность флуоресценции в спектрах эмиссии при ДВ-возбуждении с увеличением соотношения молярных концентраций  $C_d/C_k$  в среде менялись так же, как и в системе полинуклеотид–лиганд с увеличением соотношения  $C_d/C_k$  (см. рис. 5, 7).

Таким образом, с практической точки зрения для достижения максимальной флуоресцентной чувствительности используемого красителя (лиганда) по отношению к взаимодействующему с ним субстрату (ДНК) в качестве среды измерения следует выбирать водный буфер с достаточной ионной силой для образования водородных и ионных связей между лигандом и ДНК, но без примесей, которые или мешают образованию таких связей, или уменьшают диэлектрическую проницаемость буферного раствора. Увеличение вязкости раствора также ухудшает флуоресцентную чувствительность ДНК–лигандов, что было показано нами для 50% раствора сахарозы [18]. Эти данные ( $\Phi_{сах}/\Phi_0$ ) приведены в табл. 2. Кроме того, подобрать условия, позволяющие получить мак-

симально возможную флуоресцентную чувствительность используемого красителя по отношению к полинуклеотиду, невозможно без учета оптимальных диапазонов значений температур и pH среды измерения (который должен определяться из предварительных исследований для каждого красителя, как показано, в частности, в работах [22, 23]), а также соотношений концентраций  $C_d/C_k$  в ней (см. рис. 8а и табл. 2).

Для иллюстрации высказанных положений в качестве количественного критерия нами был использован показатель  $\eta$  – величина флуоресцентной чувствительности соединения по отношению к полинуклеотиду (см. “Экспериментальную часть”), взятая как наиболее представительная с практической точки зрения для характеристики способности красителя быть эффективным флуорофором на требуемый субстрат. При этом значения  $\eta$  и относительного квантового выхода уменьшались как при повышении ионной силы буфера, так и при снижении полярности растворителя в спирте (см. табл. 2). Для соединений (I)–(V)

данные величины уменьшались также в присутствии значительных количеств мочевины (буфер В) и сахарозы [18].

Это можно объяснить тем, что, хотя для всех исследованных соединений наблюдалось два типа связывания с полинуклеотидом в низкосолевым буферах, изменение флуоресценции в рассматриваемых системах ДНК–краситель определял в основном лишь один из них – специфический, для которого характерно было образование как водородных, так и ионных связей. Аналогичные результаты для красителя Hoechst-33258 были получены, в частности, в работе [11]. При этом если сумма относительных величин вкладов водородных ( $H$ ) и электростатических ( $X$ ) связей в образование специфического флуоресцентного комплекса в системе ДНК–лиганд для всех исследованных в настоящей работе красителей была близка к 100%, то их соотношение ( $H/X$ ) варьировало от 1.54 у соединения (III) до 0.45 у соединения (V) (см. табл. 2). В соответствии с этим изменялось и отношение флуоресцентных чувствительностей ( $\eta$ ) данных красителей в растворах с высокой ионной силой и с мочевиной, ингибирующих образование ионных и водородных связей в системах ДНК–лиганд. В частности, между значениями  $\Psi$  (отражающими отношения величин  $\eta$  для красителя при  $C_d/C_k = 10$  в буферах В и Б) и  $H/X$  у соединений (I)–(V) наблюдалась линейная корреляция с коэффициентом  $r = 0.935$  ( $p < 0.05$ ) (см. табл. 2 и рис. 8б).

Между величиной  $H$  и флуоресцентной чувствительностью ( $\eta$ ) красителей (I)–(V) по отношению к полинуклеотиду при низких соотношениях концентраций  $C_d/C_k$  в стандартном низкосолевым буфере А также наблюдалась положительная линейная корреляция с коэффициентом  $r_{H\eta} = 0.937$  ( $p < 0.05$ ) (см. рис. 8в). Этот факт свидетельствует о том, что при достаточно большой степени насыщенности полинуклеотида красителем ( $C_d/C_k = 1$ ) на флуоресцентную чувствительность в системе ДНК–лиганд определяющее влияние, по-видимому, оказывает образование в ней водородных связей. Однако с уменьшением степени насыщенности полинуклеотида красителем ведущее влияние водородной составляющей на величину  $\eta$  снижалось ( $r_{H\eta}$  уменьшалось до  $-0.603$  при  $C_d/C_k = 100$ ), а более значительный вклад в образование флуоресцирующего комплекса ДНК с красителем вносили ионные связи ( $r_{X\eta} = 0.988$  для соединений (I)–(III)). Сходные результаты были получены нами для ДНК-связывающихся красителей монофенилиндольного и монофенилбензимидазольного ряда [13].

Возможные причины, приводящие к увеличению квантового выхода флуорофоров без ДНК (и соответственно к уменьшению флуоресцент-

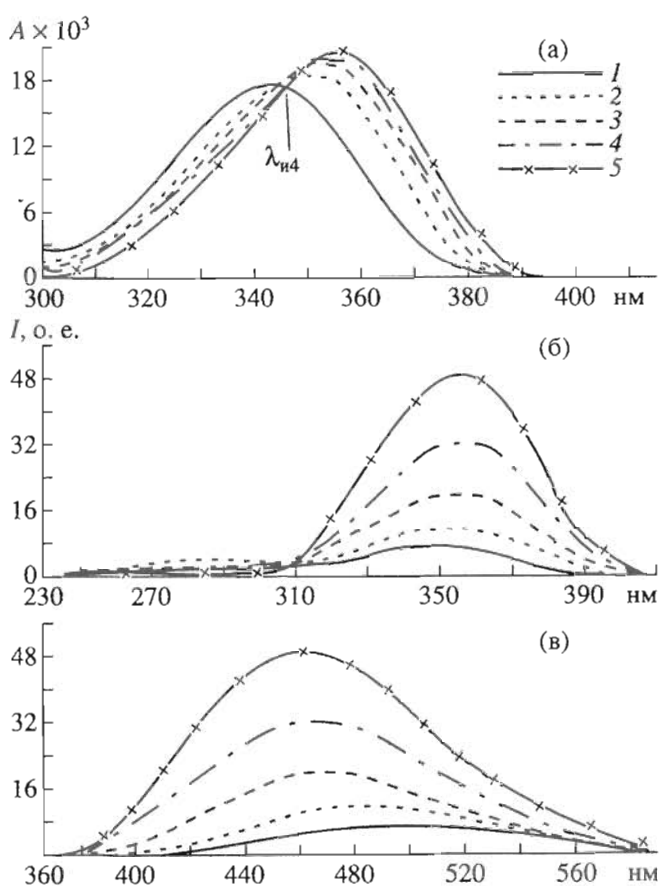
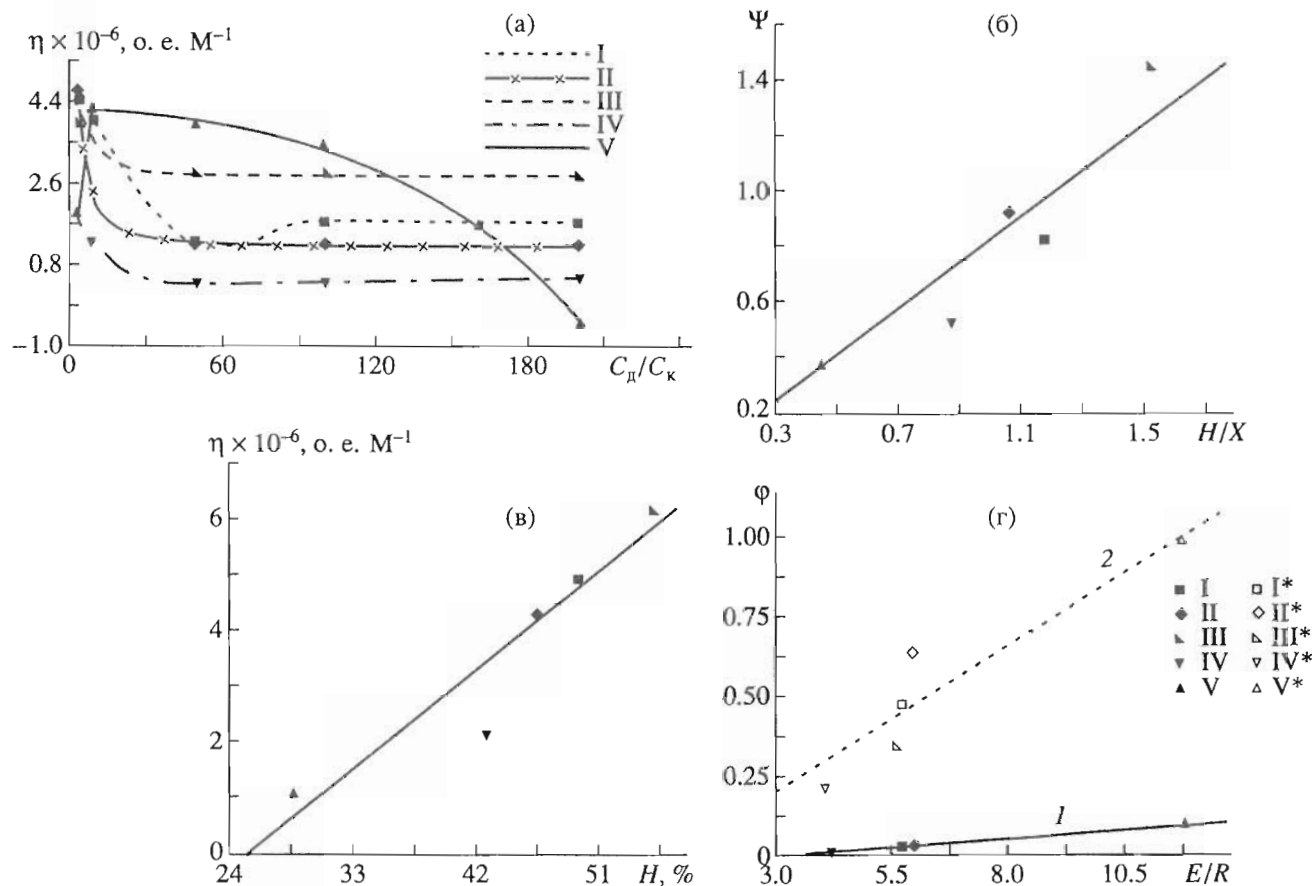


Рис. 7. Спектры поглощения (а), флуоресцентного возбуждения (б) и эмиссии (в) соединения (I) в отсутствие ДНК в низкосолевым буфере А с добавлением Тритона X-100. Кривым 1–5 соответствуют отношения молярных концентраций  $C_T/C_K = 0, 3.5, 10, 20$  и  $50$ .

ной чувствительности их по отношению к полинуклеотиду) при уменьшении диэлектрической проницаемости среды (в присутствии спиртов или каких-либо неионных детергентов) и при увеличении вязкости раствора (в присутствии сахарозы), связаны с общими механизмами флуоресценции. Так, характер спектральных свойств соединений, подобных исследуемым в настоящей работе, как было показано ранее [18, 24, 25], очевидно, определяется действием некоторого смешанного механизма.

С одной стороны, этот механизм должен учитывать известный факт: интенсивно флуоресцировать могут только достаточно жесткие, плоские, сопряженные электронные системы. Если структура молекулы красителя не обладает требуемой жесткостью, то даже при наличии в ее составе способных к флуоресценции фрагментов в свободном состоянии в водных растворах она будет светиться слабо, поскольку для нее в этом случае значительной будет вероятность безызлучательных переходов из возбужденного состояния в основное за счет ротационной диффузии.





**Рис. 8.** Зависимости, характерные для спектральных свойств исследованных соединений в низкосолевом буфере А в присутствии ДНК.

(а) – зависимость величины коэффициента флуоресценции чувствительности ( $\eta$ ) соединений (I)–(V) (кривые I–V) от величины отношения  $C_d/C_k$  в системе; (б) – зависимость соотношения величин коэффициентов флуоресцентной чувствительности исследованных красителей при  $C_d/C_k = 10$  в буферах с высокой ионной силой и с мочевиной ( $\Psi = \eta_{10}^B / \eta_{10}^0$ ; см. табл. 2) от соотношения вкладов в образование специфического флуоресцентного комплекса лиганд–полинуклеотид водородных и ионных связей ( $H/X$ ); (в) – зависимость величин коэффициентов флуоресцентной чувствительности ( $\eta$ ) соединений (I)–(V) при соотношении концентраций  $C_d/C_k = 1$  от относительного вклада в образование специфического флуоресцентного комплекса лиганд–полинуклеотид водородных связей ( $H$ ); (г) – зависимость величин нулевого ( $\phi_0$ , кривая 1) и максимального ( $\phi_{max}$ , кривая 2) квантовых выходов исследованных соединений от величины  $E/R$  (см. табл. 2). Точками I–V показаны данные для соединений (I)–(V) на рис. (а)–(в), а также для линии 1 на рис. (г); точками I\*–V\* – данные для соединений (I)–(V) для линии 2 на рис. (г).

При специфическом взаимодействии с полинуклеотидом (или в растворе сахарозы, имеющем значительную вязкость) может происходить стабилизация молекулы флуорофора, исключая для нее возможность совершать колебательные движения, вследствие чего доля радиационных переходов, а значит, и квантовый выход у данного соединения будут увеличиваться.

С другой стороны, на  $\pi$ -электронную систему соединений, структуры молекул которых обладают примерно равной степенью жесткости и планарности, влияют, в частности, электронно-акцепторные терминальные заместители. В полярном растворителе в случае несвязанного состояния молекулы красителя эти заместители будут ингибировать свечение молекулы флуорофора, в состав

которой они входят. Однако при специфическом взаимодействии с субстратом (или в неполярном растворителе, например в изопропанол), когда происходит разобщение электронных плотностей заместителей и способного к активной флуоресценции “ядра” молекулы, соединение будет восстанавливать свои флуоресцентные свойства [13, 16].

Величина соотношения вкладов вышерассмотренных донорно-акцепторных и ротационно-диффузионных факторов в изменение флуоресценции соединений (I)–(V) при взаимодействии их с ДНК была определена нами ранее [18] и, обозначенная как  $E/R$ , приведена в табл. 2 настоящей работы. Зависимости между соотношением  $E/R$  и



величинами нулевого ( $\Phi_0$ ) и максимального ( $\Phi_{\max}$ ) квантовых выходов исследованных в настоящей работе соединений в низкосолевым буфере А в присутствии ДНК представлены на рис. 8г. Видно, что при увеличении соотношения  $E/R$  для исследованных красителей значения  $\Phi_0$  возрастали незначительно, тогда как значения  $\Phi_{\max}$  увеличивались в большей степени. Эти данные могут свидетельствовать о ведущем вкладе электронно-донорных факторов в свечение лигандов при снижении ротационно-диффузионных факторов в случае высоких соотношений концентраций  $C_d/C_k$  в системе и коррелируют с полученными ранее для красителей (I)–(V) результатами [18].

Таким образом, при конструировании структуры потенциального флуорофора – с точки зрения максимального относительного квантового выхода, который он может обеспечить в присутствии ДНК – следует уделять внимание как максимальной интенсивности флуоресценции, которую может обеспечить “ядро” конструируемого соединения, так и степени жесткости его молекулы, а также присутствию в ее составе согласованных по активности с “ядром” терминальных электронно-акцепторных заместителей.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Коммерческие красители (I) и (II) (Hoechst-33258 и Hoechst-33342 соответственно) получены от фирмы Serva (ФРГ). Соединения (III)–(V) синтезированы на кафедре молекулярной биотехнологии Санкт-Петербургского технологического института [26, 27]. В качестве субстрата использовалась ДНК тимуса телят фирмы Serva (ФРГ) (58% АТ-пар; средняя молекулярная масса на один нуклеотид 326 Да, молярный коэффициент поглощения  $\epsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ). Для гомогенизации и уменьшения светорассеяния ДНК предварительно обрабатывали ультразвуком на аппарате УЗДН-2 в течение 15 с при силе тока 0.3 А на резонансной частоте 22 кГц (при этом средняя масса молекулы ДНК составляла 3500 Да).

Вещества анализировали в буферах следующего состава: А – 0.01 М NaCl, 0.01 М Na<sub>2</sub>EDTA и 0.01 М трис (рН 7.4); Б – буфер А, содержащий дополнительно 4 М мочевины (рН 7.6); В – 2 М NaCl, 0.01 М Na<sub>2</sub>EDTA, 0.01 М трис (рН 8.0).

Спектральные характеристики соединений (I)–(V) также определялись в растворе изопропанола и в низкосолевым буфере А с добавлением неионного детергента Тритон Х-100 (до конечного соотношения молярных концентраций  $C_T/C_k = 50$ ).

Все изменения проводили при постоянной концентрации красителя  $C_k = 6.4 \times 10^{-7} \text{ М}$  и различных концентрациях полинуклеотида при 20–25°C. Во избежание эффектов разбавления к “нулевому” раствору, содержащему буфер с красителем,

добавляли аликвоты раствора, содержащего буфер, краситель и ДНК в концентрации, обеспечивающей  $C_d/C_k = 200$ . Спектры поглощения исследуемых растворов регистрировали на спектрофотометре фирмы Beckman (Австрия), Model 35. Флуоресценцию проб анализировали на спектрофлуориметре фирмы Hitachi (Япония), Model 850. При записи спектров на флуориметре щели монохроматоров возбуждения и эмиссии устанавливали по 3 нм, скорость сканирования – 120 нм/мин, время отклика – 2 с, усиление ФЭУ – нормальное. Запись спектров возбуждения проводили при длине волны, соответствующей наибольшему максимуму эмиссии, а спектров эмиссии – при длине волны, соответствующей максимуму ДВ-пика возбуждения исследуемого соединения при каждом конкретном соотношении концентраций  $C_d/C_k$  в системе.

Нулевые квантовые выходы флуоресценции ( $\Phi_0$ ) исследуемых красителей определяли относительным методом с использованием в качестве стандарта раствора сульфата хирина в 1 М серной кислоте ( $\Phi_0 = 0.55$ ) [16]. Так как перекрывание спектров поглощения и флуоресценции у соединений (I)–(V) практически отсутствовало, расчет относительных квантовых выходов  $\Phi_{\text{ДНК}}/\Phi_0$  и  $\Phi_{\text{ип}}/\Phi_0$  осуществляли исходя из максимумов величин поглощения и флуоресценции в соответствующих условиях по формуле

$$\Phi_2/\Phi_1 = (I_2 A_1)/(I_1 A_2),$$

где  $I_1, I_2$  и  $A_1, A_2$  – величины интенсивности флуоресценции и оптической плотности исследуемого соединения в состояниях 1 и 2 [18].

Величины относительных квантовых выходов  $\Phi_{\text{сax}}/\Phi_0$ , а также соотношений вкладов процессов внутримолекулярного донорно-акцепторного взаимодействия и ротационной диффузии в изменение флуоресценции соединений (I)–(V) при их специфическом взаимодействии с ДНК ( $E/R$ ) были взяты из работы [18]. Значения молярных коэффициентов поглощения и флуоресценции определялись в виде  $\epsilon = A/C_k$  и  $\mu = I/C_k$ . Для измерения использовались стандартные кюветы квадратного сечения с длиной оптического пути 1 см.

Относительные вклады водородных и электростатических связей в образование активно флуоресцирующего комплекса исследуемых красителей с полинуклеотидом ( $H$  и  $X$  соответственно) вычисляли по формулам

$$X = \frac{(\Phi_{\max}/\Phi_0)_B - 1}{(\Phi_{\max}/\Phi_0)_A - 1} 100\%,$$

$$H = \frac{(\Phi_{\max}/\Phi_0)_B - 1}{(\Phi_{\max}/\Phi_0)_A - 1} 100\%,$$



где  $(\Phi_{\max}/\Phi_0)_A$ ,  $(\Phi_{\max}/\Phi_0)_B$  и  $(\Phi_{\max}/\Phi_0)_C$  – максимальные относительные квантовые выходы в присутствии ДНК для данного красителя в буферах А, Б и В [13].

Коэффициенты чувствительности ( $\eta_S$ ), отражающие величину приращения интенсивности флуоресценции исследуемого красителя на 1 М ДНК при соотношении концентраций  $C_d/C_k = S$ , вычислялись по формуле

$$\eta_S = (I_{S+1} - I_{S-1}) / (2C_k),$$

где  $I_{S+1}$  и  $I_{S-1}$  – интенсивности флуоресценции исследуемого красителя (в отн. ед.) при соотношениях молярных концентраций  $C_d/C_k = S + 1$  и  $C_d/C_k = S - 1$ .

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барский И.Я., Папаян Г.В., Фаддеева М.Д. // Цитология. 1969. Т. 11. С. 64–70.
2. Гурский Г.В., Заседателев А.С., Волькенштейн М.В. // Молекуляр. биология. 1972. Т. 6. С. 479–490.
3. Заседателев А.С., Жузе А.Л., Циммерман К., Гроховский С.Л., Туманян В.Г., Гурский Г.В., Готтих Б.П. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 231. С. 1006–1009.
4. Zasedatelev A.S., Gursky G.V., Zimmer Ch., Thrum H. // Mol. Biol. Rep. 1974. V. 1. P. 337–342.
5. Lerman L.S. // J. Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 18–30.
6. Ward D.C., Reich E., Goldberg I.H. // Science. 1965. V. 149. P. 1259–1265.
7. Le Pecq J.B., Paoletti C. // J. Mol. Biol. 1967. V. 27. P. 87–106.
8. Słokke T., Holte H., Davies C.L., Steen H.B., Sverre O.L. // Cytometry. 1990. V. 11. P. 686–690.
9. Denison L., Haigh A., D' Cunha G., Martin R.F. // Int. J. Radiat. Biol. 1992. V. 61. P. 69–81.
10. Monger B.C., Landry M.R. // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. P. 905–911.
11. Заседателев А.С., Михайлов М.В., Крылов А.С., Гурский Г.В. // Молекуляр. биология. 1981. Т. 15. С. 690–705.
12. Pjura P.E., Grzeskowiuk K., Dickerson R.E. // J. Mol. Biol. 1987. V. 197. P. 257–271.
13. Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В., Иванов С.Д. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 650–668.
14. Barcellona M.L., Favilla R., von Berger J., Avitabile M., Ragusa N., Masotti L. // Arch. Biochem. Biophys. 1986. V. 250. P. 48–53.
15. Georgiev G.P. // Annu. Rev. Genet. 1969. V. 3. P. 155–205.
16. Иванов С.Д., Квитко И.Я., Ртищев Н.И., Фомина Е.И., Нагорская Л.П. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 648–655.
17. Jin R., Breslauer K.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 8939–8942.
18. Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В., Иванов С.Д. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 731–736.
19. Нурмухаметов Р.Н. Поглощение и люминесценция ароматических соединений. М.: Химия, 1971. 216 с.
20. Skoczylas B. // Acta Biochem. Polon. 1988. V. 35. P. 225–231.
21. Zimmer C., Wahnert U. // Prog. Molec. Biol. 1986. V. 47. P. 31–112.
22. Умецкая В.Н., Рослов А.А., Розанов Ю.М., Гарабаджиу А.В. // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. С. 379–387.
23. Колосова О.Ю. Флуоресцентные ДНК-зонды в ряду бензимидазолов: Дис. ... канд. хим. наук. Л.: ЛТИ им. Ленсовета, 1991.
24. Kapuscinski J., Skoczylas B. // Nucl. Acids Res. 1978. V. 5. P. 3775–3799.
25. Рослов А.А. Исследование специфичных лигандов ДНК бензимидазольного ряда: Дис. ... канд. хим. наук. Л.: ЛТИ им. Ленсовета, 1989.
26. Скларова И.В., Кузнецов В.А., Соколова Н.Ю., Гарабаджиу А.В., Гинзбург О.Ф., Добрынин Я.В., Николаева Т.Г., Финько В.Е. // Хим.-фармацевт. журн. 1988. Т. 22. С. 697–699.
27. Соколова Н.Ю., Кузнецов В.А., Гарабаджиу А.В., Гинзбург О.Ф., Добрынин Я.В., Николаева Т.Г., Финько В.Е., Иванова Т.П. // Хим.-фармацевт. журн. 1990. Т. 24. С. 31–33.

## Spectral Properties of Bisbenzimidazole Dyes upon Interaction with DNA

V. S. Sibirtsev\*, A. V. Garabadzhiu\*\*, and S. D. Ivanov\*

\*Central Research X-Ray and Radiological Institute, Ministry of Public Health and Medical Industry of Russia, ul. Leningradskaya 70/4, Pesochnyi 2, St. Petersburg, 189646 Russia

\*\*St. Petersburg State Technological Institute, Zagorodnyi pr. 49, St. Petersburg, 198013 Russia

Absorption and fluorescence spectra of a series of bisbenzimidazole dyes were studied in the presence of various concentrations of DNA and in diverse media. Variations in spectral properties of the compounds under study were found to depend on the measurement conditions. The bases for selecting the optimal composition of the media for DNA detection were presented. The modes of substrate–ligand binding and the dynamics of the alterations of fluorescent properties of structurally varying dyes upon their interaction with DNA were considered.

*Key words:* DNA, bisbenzimidazoles, spectral properties