

УДК 544.164, 543.422.3, 543.426, 547.7, 547.6, 577.323

# Исследование механизмов изменения спектральных свойств при взаимодействии с днк соединений бензозольного, индольного и фенантридиумного рядов

© 2017 г. **В. С. СИБИРЦЕВ, КАНД. ХИМ. НАУК**

Университет ИТМО, Санкт-Петербург

E-mail: vs1969r@mail.ru

Поступила в редакцию 28.11.2016

Представлены данные по спектрам поглощения и флуоресценции 16 синтетических соединений индольного, бензозольного и фенантридиумного рядов в различных средах и в присутствии различных количеств ДНК. Приведены основные положения обобщенной модели, позволяющей адекватно объяснить изменения спектральных свойств подобных соединений в зависимости от их химической структуры, характера взаимодействия с субстратом, свойств среды измерения и др., а также конструировать новые специфичные к ДНК флуорофоры с заданными свойствами.

**Ключевые слова:** флуоресцентный анализ ДНК, флуорофоры на ДНК, бензозолы, индолы.

**Коды OCIS:** 170.4580, 170.1530, 170.6280, 300.6390, 300.6280, 300.6550, 300.1030

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Соединения, способные специфически связываться с определенными последовательностями нуклеотидов в геноме, привлекают в настоящее время все более пристальное внимание. Интерес к ним связан с тем, что подобные соединения могут быть использованы при лечении различных онкологических, инфекционных, генетически обусловленных заболеваний, в качестве радиопротекторов, антисептических препаратов, в исследовательских целях (например, для сайт-направленной модификации нуклеиновых кислот или блокировки различных их участков) и др. [1–11].

А если рассматриваемые соединения помимо высокой степени сродства и избирательности к определенным участкам нуклеиновых кислот (от чего напрямую зависит биологическая активность лиганда) обладают также удобными для регистрации свойствами (например, способностью резко изменять интенсивность своего свечения при взаимодействии с полинуклеотидом, что сочетает в себе простоту регистрации с высокой ее чувствительностью и избирательностью), то это еще более расширяет сферу применения таких соединений. Тут и различные системы диагностики, включаю-

щие качественный и количественный анализ генома разных клеток живых организмов в сопоставлении с различными их состояниями, и научные исследования, и экологический мониторинг, и многое другое [1–11].

Однако до сих пор не существует достаточно разработанной теоретической базы, позволяющей заранее предсказывать свойства и особенности поведения того или иного специфичного к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) флуорофора и, соответственно, конструировать, а не подбирать эмпирически новые лиганды с требуемыми свойствами. Для того чтобы более четко выявить взаимосвязь между структурой и спектральными свойствами специфичных к ДНК флуорофоров, в качестве объекта исследования в настоящей работе было выбрано 16 синтетических соединений 2-фенилиндольного (I–II), 2-фенилбензимидазольного (III–V), 2-фенилбензоксазольного (VI–VII), 2-фенилбензтиазольного (VIII–X), бисбензимидазольного (XI–XV) и 9-фенилфенантридиумного (XVI) рядов (рис. 1), пять из которых (а именно, соединения I, II, XI, XIII и XIV) к настоящему времени уже достаточно активно используются в качестве коммерческих флуорофоров на ДНК [1–11].

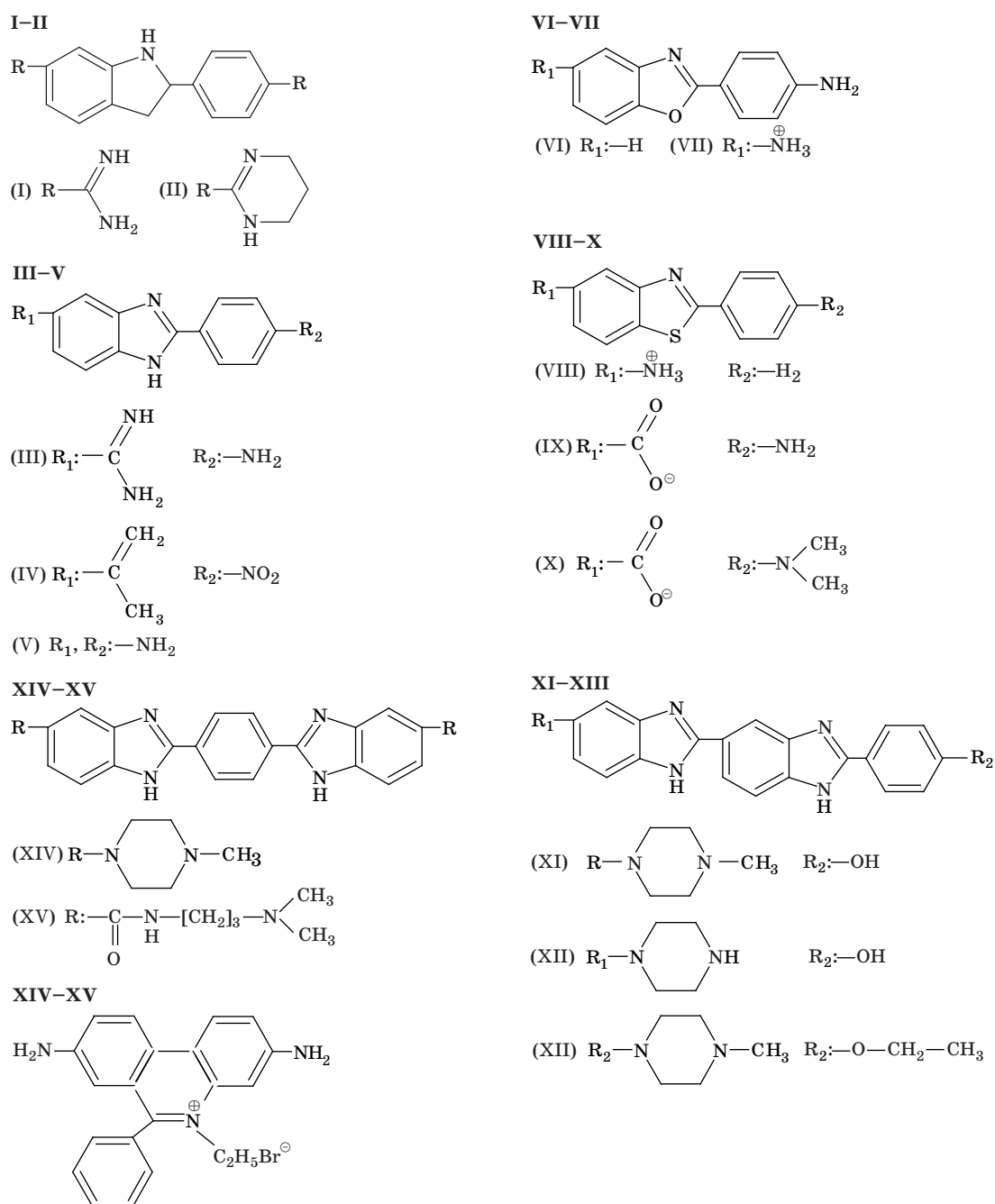


Рис. 1. Структурные формулы исследованных соединений.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Соединения III–X, XII, XIV и XV были синтезированы на кафедрах органической химии и молекулярной биотехнологии Санкт-Петербургского технологического института. Коммерческие флуорофоры I (DAPI), II (DIP1), XI (*Hoechst-33258*), XIII (*Hoechst-33342*) и XVI (этидий бромид), а также ДНК тимуса телянка (Ст-ДНК, использовавшаяся в качестве тестового субстрата при анализе спектров исследуемых флуорофоров и разработке диагностических систем, использующих эти флу-

орофоры) были получены от фирмы «*Serva*» (Германия).

Запись спектров флуоресцентной эмиссии проводилась на длине волны, соответствующей максимуму возбуждению флуоресценции исследуемого соединения. Молярный коэффициент поглощения ( $\epsilon$ ) определялся на длине волны, соответствующей максимуму в спектре поглощения. Квантовые выходы флуоресценции ( $\phi$ ) исследуемых соединений определялись относительным методом с использованием в качестве стандарта раствора

сульфата хирина в 1М серной кислоте ( $\varphi_{st} = 0,55$ ). Кроме того, для ряда соединений определялись коэффициенты флуоресцентной чувствительности  $\eta_D = (I_{D+1} - I_{D-1})/(2C_L)$ , где  $I_{D+1}$  и  $I_{D-1}$  — интенсивности флуоресценции красителя при соотношениях молярных концентраций Ст-ДНК (субстрата) и флуорофора (лиганда)  $C_S/C_L = D + 1$  и  $C_S/C_L = D - 1$ .

Измерение спектров всех соединений проводилось при температуре 20–25 °С в водном Ст-буфере с рН = 7,4, содержащем 0,01М NaCl + 0,01М Na<sub>2</sub>EDTA + 0,01М Tris (2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол). Для нарушения целостности клеточных стенок, а также внешних клеточных и ядерных мембран, и, следовательно, обеспечения доступа красителя из «внеклеточного раствора» к внутриклеточной ДНК применялась лизирующая смесь. Последняя является водным раствором, содержащим 2М NaCl + 0,1М Na<sub>2</sub>EDTA + 0,01М Tris + 0,5% (по объему) Triton X-100 (4-октил-2,4,6,8,10-деканпентол-оксибензол), с рН = 8,0. Na<sub>2</sub>EDTA, Tris и Triton X-100 были получены от фирмы «Serva» (Германия), остальные использованные реактивы — отечественного производства с маркой «ХЧ».

### 3. ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ИССЛЕДОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Спектры поглощения и флуоресценции соединений I, V–XI и XV в водном Ст-буфере в присутствии Ст-ДНК приведены на рис. 2, 3. Основные спек-

тральные свойства соединений I–XVI, исследованные в настоящей работе, представлены в табл. 1–3.

Спектры поглощения и флуоресценции соединений II–IV по своему характеру сходны с приведенными на рис. 2 спектрами соединения I, а спектры соединений XII–XIV и XVI — со спектрами соединения XI. Кроме этого следует отметить, что, во-первых, у всех исследованных в настоящей работе соединений совпадало положение максимумов в спектрах возбуждения флуоресценции и поглощения в видимой области спектра. Во-вторых, у соединений I–XVI совпадало положение максимумов в спектрах поглощения и флуоресценции в 2-пропанолу при  $C_S/C_L = 0$  и в Ст-буфере при  $C_S/C_L = 200$ . И, в-третьих, помимо основных, отмеченных в табл. 1–3, у соединений I–XVI в водных средах имеются меньшие по интенсивности максимумы в спектрах поглощения (и соответственно, возбуждения флуоресценции) в диапазоне длин волн 260–280 нм. А у соединения VIII дополнительно к этому есть максимум в спектре поглощения на длине волны 315 нм.

При связывании с ДНК в Ст-буфере основные максимумы в спектрах поглощения соединений VII и VIII сдвигаются на 5 нм в длинноволновую сторону (табл. 1). В спектрах флуоресцентной эмиссии в Ст-буфере у соединений VII и VIII имеются дополнительные максимумы на длинах волн 400 и 430 нм соответственно (рис. 3), а у соединения XV — дополнительные максимумы на длинах волн 380, 420 и 450 нм (рис. 2).

Таблица 1. Спектральные свойства 2-фенилиндолов I–II и 2-фенилбензимидазолов III–V

Соединение	I	II	III	IV	V
Длины волн максимумов поглощения в отсутствие Ст-ДНК, нм	340	355	330	330	330
Длины волн максимумов поглощения в присутствии Ст-буфера и насыщающего краситель количества Ст-ДНК, нм	350	365	340	340	330
Длины волн максимумов флуоресценции в отсутствие Ст-ДНК, нм	455	465	455	455	450
Длины волн максимумов флуоресценции в присутствии Ст-буфера и насыщающего краситель количества Ст-ДНК, нм	455	450	455	455	450
Молярный коэффициент поглощения в отсутствие Ст-ДНК, $\times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$	2,0	1,7	1,6	0,52	3,1
Квантовый выход флуоресценции в отсутствие Ст-ДНК ( $\varphi_W$ )	0,0063	0,0078	0,0047	0,0038	0,23
Квантовый выход флуоресцентной эмиссии в присутствии Ст-буфера и насыщающего краситель количества Ст-ДНК ( $\varphi_D$ )	0,20	0,22	0,10	0,09	0,13
$\varphi_D/\varphi_W$	24	32	24	23	0,55
$\varphi_A/\varphi_W$	22	30	22	21	1,1
$\eta_1 \times 10^{-6}$ *	6,0	1,5	0,54	0,74	-1,6
$\eta_{10} \times 10^{-6}$ *	4,7	3,6	0,72	0,43	-1,6
$\eta_{100} \times 10^{-6}$ *	0,50	0,59	0,39	0,23	-0,39

Примечания. \* $\eta_1$ ,  $\eta_{10}$  и  $\eta_{100}$  — коэффициенты флуоресцентной чувствительности (см. раздел 2) при соотношениях молярных концентраций Ст-ДНК и лиганда в системе 1, 10 и 100 соответственно. Индексом А обозначен 2-пропанол.

Таблица 2. Спектральные свойства 2-фенилбензоксазолов VI–VII и 2-фенилбензтиазолов VIII–X

Соединение	VI	VII	VIII	IX	X
Длины волн максимумов поглощения, нм	325	340	350	340	370
Длины волн максимумов флуоресценции, нм	390	510	520	445	465
Молярный коэффициент поглощения в отсутствие Ст-ДНК, $\times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$	1,5	0,60	1,7	1,3	2,6
Квантовый выход флуоресценции в отсутствие Ст-ДНК ( $\varphi_W$ )	0,87	0,13	0,07	0,55	0,66
Квантовый выход флуоресценции в присутствии Ст-буфера и насыщающего краситель количества Ст-ДНК ( $\varphi_D$ )	0,074	0,072	0,053	0,055	0,056
$\varphi_D/\varphi_W$	0,085	0,55	0,76	0,10	0,085

Таблица 3. Спектральные свойства бисбензимидазолов XI–XV и 9-фенилфенантридиума XVI

Соединение	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
Длины волн максимумов поглощения в отсутствие Ст-ДНК, нм	345	345	350	360	330	480
Длины волн максимумов поглощения в присутствии Ст-буфера и насыщающего краситель количества Ст-ДНК, нм	355	350	355	370	350	520
Длины волн максимумов флуоресценции в отсутствие Ст-ДНК, нм	500	495	500	555	400	595
Длины волн максимумов флуоресценции в присутствии Ст-буфера и насыщающего краситель количества Ст-ДНК, нм	455	455	455	500	400	605
Молярный коэффициент поглощения в отсутствие Ст-ДНК, $\times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$	2,7	2,4	3,6	1,7	1,3	0,56
Квантовый выход флуоресценции в отсутствие Ст-ДНК ( $\varphi_W$ )	0,011	0,013	0,0091	0,0086	0,051	0,0014
Квантовый выход флуоресценции в присутствии Ст-буфера и насыщающего краситель количества Ст-ДНК ( $\varphi_D$ )	0,49	0,50	0,48	0,40	0,42	0,014
$\varphi_D/\varphi_W$	44	40	53	46	10	9,9
$\varphi_A/\varphi_W$	38,5	36,2	35,4	42,6	9,6	9,4
$\varphi_C/\varphi_W$	7,0	7,1	6,8	10	2,0	–
$\eta_1 \times 10^{-6}$	4,9	6,5	4,2	2,1	1,2	0,48
$\eta_{10} \times 10^{-6}$	4,1	2,5	3,6	1,3	4,3	0,29
$\eta_{100} \times 10^{-6}$	1,7	1,3	2,9	0,44	3,5	0,00

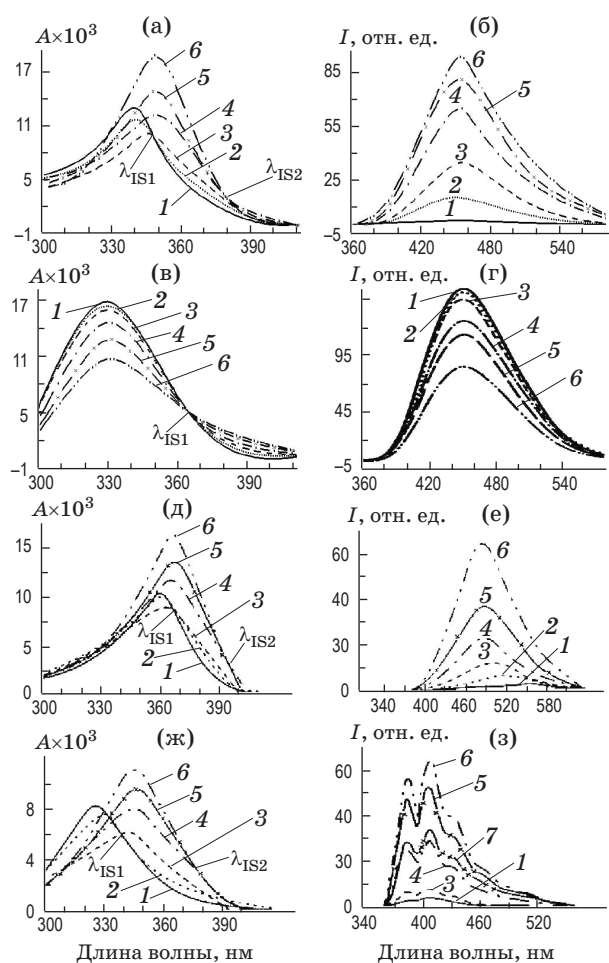
Примечания. Индексом С обозначены параметры, определявшиеся в 50% (по массе) растворе сахарозы в Ст-буфере, остальные обозначения см. в Примечаниях к табл. 1.

В видимой области спектра в водных средах для всех рассматриваемых соединений характерно наличие только одного максимума поглощения, которому соответствует аналогичный максимум в спектре возбуждения флуоресценции и один (в большинстве случаев) или несколько (в случае соединений VI, VIII и XIV) максимумов флуоресцентной эмиссии, сдвинутых по отношению к максимуму поглощения в длинноволновую сторону (рис. 2 и 3).

У водных растворов соединений I–IV и XI–XVI с увеличением  $C_S/C_L$  при  $C_L = \text{const}$  интенсивность поглощения в области 300–1100 нм сначала уменьшалась (до  $C_S/C_L \approx 10$ ), затем начинала возрастать, а при  $C_S/C_L > 100$  оставалась неизменной,

но большей (хотя и не очень значительно), чем при  $C_S/C_L = 0$ , и сдвинутой на 5–10 нм в длинноволновую сторону, исключая соединения XV и XVI, у которых этот сдвиг составлял, соответственно, 20 и 40 нм (рис. 2). Подобная неоднозначность изменения оптической плотности при двух изобестических точках в спектрах поглощения ( $\lambda_{IS}$ ) свидетельствует о наличии у данных соединений в рассматриваемых условиях, как минимум, двух типов связывания с ДНК.

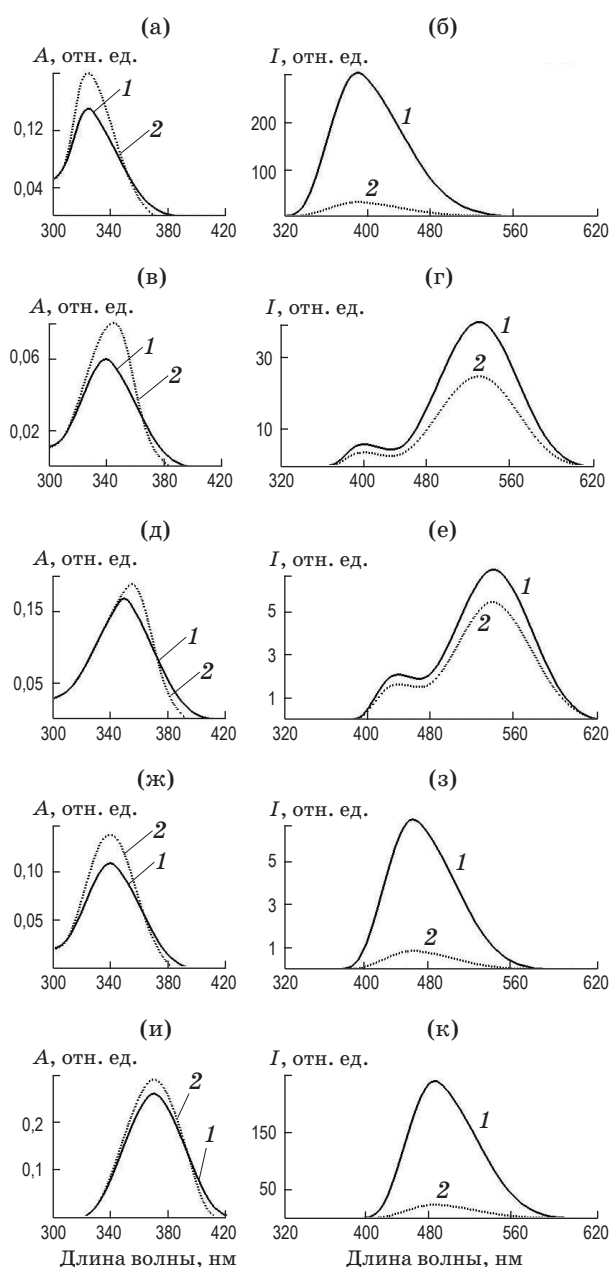
Интенсивность флуоресценции водных растворов соединений I–IV и XI–XVI с увеличением  $C_S/C_L$  при  $C_L = \text{const}$  уменьшалась лишь до  $C_S/C_L \approx 1$ , а затем начинала возрастать (причем в гораздо большей степени, чем оптическая плотность) до



**Рис. 2.** Спектры поглощения (а, в, д, ж) и флуоресцентной эмиссии (б, г, е, з) 2-фенилиндола I (а, б), 2-фенилбензимидазола V (в, г), бисбензимидазола XI (д, е) и бисбензимидазола XV (ж, з) в водном Ст-буфере в присутствии разных количеств Ст-ДНК. Концентрация каждого из флуорофоров  $6,4 \times 10^{-7}$  М. 1–7 — спектры флуорофоров при соотношениях молярных концентраций ДНК и лиганда соответственно 0, 3, 5, 10, 50, 100, 200 и 250.

$C_S/C_L \approx 200$ . При дальнейшем увеличении  $C_S/C_L$  интенсивность флуоресценции растворов больше не менялась (за исключением соединения XV, у которого при увеличении  $C_S/C_L$  в области  $C_S/C_L > 200$  интенсивность флуоресценции начинала уменьшаться). А у водных растворов соединений V–X при  $C_S/C_L = 0–200$  моль/моль с увеличением  $C_S$  при  $C_L = \text{const}$  как оптическая плотность, так и интенсивность флуоресценции в области спектра 300–1100 нм монотонно уменьшались при неизменном положении максимумов поглощения и флуоресценции.

Это свидетельствует о том, что, по-видимому, полициклические ароматические хромофорные системы соединений I–XVI способны к достаточно активной флуоресценции. Однако в полярном растворителе эта способность либо ингибируется за счет оттягивания «внешним» заместителем части



**Рис. 3.** Спектры поглощения (а, в, д, ж, и) и флуоресцентной эмиссии (б, г, е, з, к) 2-фенилбензоксазолов VI (а, б) и VII (в, г), 2-фенилбензотиазолов VIII (д, е), XI (ж, з) и X (и, к) в водном Ст-буфере в отсутствие (1,  $C_S/C_L = 0$ ) и в присутствии насыщающего красителя количества Ст-ДНК (2,  $C_S/C_L = 200$ ). Концентрация каждого из флуорофоров  $10^{-5}$  М.

электронной плотности от хромофорной системы красителя, либо усиливается, если «внешний» заместитель проявляет по отношению к связанной с ним хромофорной системе электронодонорные свойства. В то время как при специфическом взаимодействии с полинуклеотидом влияние «внешнего» заместителя на хромофорную систему лиганда в значительной мере ослабляется. И в результате общий квантовый выход флуоресценции лиганда ф



(отношение энергии, излучаемой молекулой красителя, к энергии, поглощенной той же молекулой непосредственно перед этим) становится ближе к  $\varphi$  его хромофорной системы в отсутствие каких-либо заместителей.

В пользу этого свидетельствует также и тот факт, что, как видно из табл. 1, соединения I, амидиновые заместители которого являются более сильными акцепторами электронной плотности 2-фенилиндольной хромофорной системы, чем имидазолиновые группы соединения II, имеет меньший по сравнению с последним квантовый выход флуоресценции в водном буфере в не связанном с ДНК состоянии ( $\varphi_W$ ). В то время как квантовые выходы флуоресценции соединений I и II в водном буфере в связанном с ДНК состоянии ( $\varphi_D$ ) весьма близки.

Однако в абсолютном выражении  $\varphi_D$  соединений I–II примерно в 2 раза больше, чем у соединений III–V. Это можно объяснить тем, что  $\pi$ -избыточный индольный фрагмент, входящий в состав хромофорной системы соединений I и II, обладает более сильными и устойчивыми флуоресцентными свойствами, чем аналогичный бензимидазольный фрагмент соединений III–V, проявляющий  $\pi$ -амфотерные свойства.

Соединение V имеет среди рассматриваемых в настоящей работе 2-фенилбензимидазольных производных наиболее высокое значение  $\varphi_W = 0,23$  (табл. 1, рис. 2). Однако при связывании с ДНК интенсивность и квантовый выход флуоресценции этого соединения уменьшаются, что, вероятно, является следствием присутствия в его структуре двух «внешних» аминогрупп, проявляющих по отношению к связанной с ними фенилбензимидазольной хромофорной системе электронодонорные свойства.

Соединение III имеет существенно меньшее значение  $\varphi_W = 0,0047$ , хотя отличается от соединения V только наличием у бензимидазольного конца своей молекулы не аминогруппы, а амидинового заместителя, проявляющего по отношению к полициклической хромофорной системе соединения III электроноакцепторные свойства. Однако при специфическом взаимодействии соединения III с полинуклеотидом квантовый выход его флуоресценции в водной среде увеличивается почти до того же значения ( $\varphi_D = 0,1$ ), которое характерно для связанного с ДНК красителя V.

Аналогично ведет себя и соединение IV, у которого значение  $\varphi_W = 0,0038$  — наименьшее среди рассматриваемых здесь 2-фенилбензимидазольных производных. Это, вероятно, является следствием того, что и вторая терминальная аминогруппа соединения IV (у фенильного конца его молекулы) заменена на нитрогруппу, проявляющую по отношению к связанной с ней хромофорной системе красителя электроноакцепторные свойства.

Далее, как видно из табл. 2,  $\varphi_D$  бензоксазолов VI и VII выше, чем у бензтиазолов VIII–X, но мень-

ше, чем у бензимидазолов III–V. А  $\varphi_W$  бензоксазола VII существенно меньше, чем у бензоксазола VI. Последнее может быть объяснено тем, что модифицируемая аминогруппа соединения VII находится в растворе, видимо, предпочтительно в протонированной  $H_3N^{(+)}$  форме, проявляющей по отношению к связанному с ней фенилбензоксазольному фрагменту электроноакцепторные свойства. Тогда как вторая, немодифицируемая, «внешняя» аминогруппа бензоксазолов VI и VII находится в растворе предпочтительно в неионизированной форме, проявляющей по отношению к хромофорной системе этих соединений электронодонорные свойства.

Аналогично, при замене аминогруппы соединения VIII на карбоксильную у соединения IX  $\varphi_W$  существенно увеличивается (от 0,07 до 0,55). Это может быть объяснено тем, что хотя карбоксильная группа в неионизированном состоянии должна проявлять по отношению к связанному с ней фенилбензтиазольному фрагменту электроноакцепторные свойства, однако в депротонированной  $(^-)OOC$  форме характер влияния этой группы на хромофорную систему красителя становится электронодонорным.

В случае красителей IX ( $\varphi_W = 0,55$ ) и X ( $\varphi_W = 0,66$ ) фактором, определяющим увеличение  $\varphi_W$ , оказалось, вероятно, то, что «внешняя» диметиламиногруппа соединения X в ионизированной форме является более слабым акцептором, а в неионизированной форме — более сильным донором электронной плотности фенилбензтиазольного «ядра», входящего в состав соединений IX и X, чем аналогичная аминогруппа соединения IX в соответствующих формах.

Таким образом, можно заключить, что в целом механизм изменения свечения 2-фенилбензоксазолов VI–VII и 2-фенилбензтиазолов VIII–X тот же, что и у ранее рассмотренных 2-фенилиндолов I–II и 2-фенилбензимидазолов III–V. Однако при этом необходимо дополнительно учитывать, во-первых, усиление флуоресцентных свойств в ряду «бензтиазол > бензоксазол > бензимидазол > индол» при сходном характере их заместителей. А во-вторых, возможность присутствия рассматриваемых соединений в растворе одновременно в нескольких равновесных формах, различающихся, например, степенью ионизации своих заместителей.

И наконец, характер изменения спектральных свойств бисбензимидазолов XI–XV обусловлен, вероятно, тем, что взаимное донорно-акцепторное влияние на электронную плотность различных фрагментов молекулы может быть эффективным лишь в том случае, когда все они расположены в одной плоскости. А у соединений XI–XIV и фенильный, и оба бензимидазольных фрагмента, способных к активной флуоресценции, имеют возможность активной взаиморотации. Вследствие этого соединения XI–XIV, несмотря на очевидно

электронодонорный характер своих «внешних» групп по отношению к связанной с ними фенилбисбензимидазольной хромофорной системе, имеют весьма низкие квантовые выходы флуоресценции в водном буфере в не связанном с ДНК состоянии. И лишь при специфическом связывании с ДНК они восстанавливают свои  $\phi_W$  до значений, значительно превышающих аналогичные у ранее рассмотренных фенилмонобензимидазолов III–V. В то время как длинные, разветвленные, гидрофильные диметиламинопропилкарбамоильные «терминальные» группы соединения XV, взаимодействуя с молекулами воды, стабилизируют планарную структуру фенилбисбензимидазольной хромофорной системы. Вследствие этого, вероятно, квантовый выход флуоресценции в водном буфере в не связанном с ДНК состоянии у соединения XV примерно в 5 раз больше, чем у бисбензимидазолов XI–XIV, но в 10 раз меньше, чем в связанном с ДНК состоянии соединения XV (табл. 3). Последнее, вероятно, является следствием электроноакцепторного характера «терминальных» групп соединения XV по отношению к связанной с ними фенилбисбензимидазольной хромофорной системе. Подтверждает данное утверждение и тот факт, что отношение квантовых выходов флуоресценции в не связанном с ДНК состоянии в водном буфере с добавлением сахарозы (увеличивающей вязкость среды и таким образом стабилизирующей планарную структуру молекулы красителя) и без нее ( $\phi_C/\phi_W$ ) у соединения XV было значительно меньшим, чем у бисбензимидазолов XI–XIV.

#### 4. КОНСТРУИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ НУКЛЕОТИД-СПЕЦИФИЧНЫХ ФЛУОРОФОРОВ

Таким образом, общий механизм изменения флуоресцентных свойств низкомолекулярных нуклеотид-специфичных красителей заключается, видимо, в следующем.

Во-первых, активно светиться способны, как правило, только структуры с развитой сопряженной электронной системой, включающей в себя как  $\pi$ -электроны двойных или тройных ковалентных связей, так и неподеленные  $n$ -электроны гетероатомов. Но такое сопряжение достигается обычно лишь в том случае, когда общая электронная система молекулы красителя имеет достаточно жесткую копланарную структуру (т.е. все входящие в нее фрагменты располагаются в одной плоскости — что уменьшает безызлучательные потери энергии, поглощенной молекулой красителя, и увеличивает вероятность радиационных переходов электронов из возбужденного состояния в основное). Если же это условие не соблюдается (как например, в случае бисбензимидазолов XI–XV, фрагменты молекул которых имеют возможность к достаточно активной взаиморотации), для активного све-

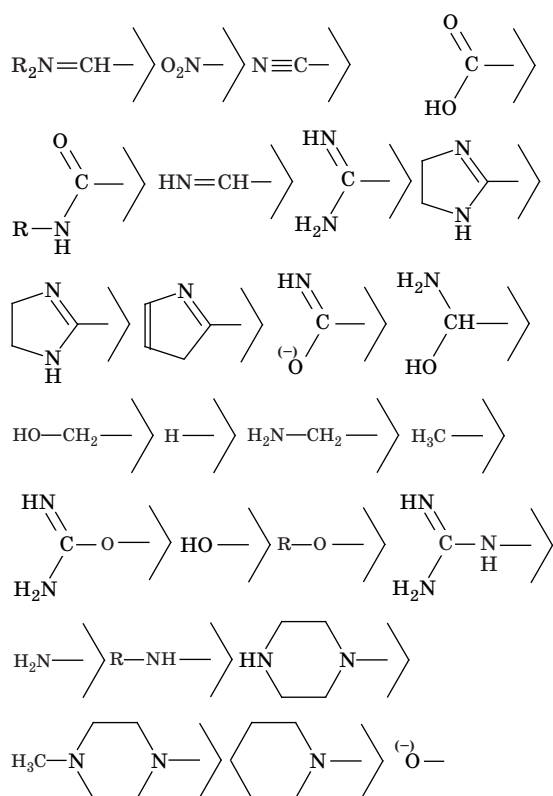
чения рассматриваемого соединения необходимо наличие дополнительных факторов, обеспечивающих стабилизацию плоскостной структуры молекулы флуорофора, в качестве которых можно назвать специфическое взаимодействие красителя с субстратом, значительную вязкость среды, в которой находится молекула красителя, наличие у молекулы красителя определенных «внешних» заместителей (таких, например, как карбамоильные группы у соединения XV) и др.

Во-вторых, если даже хромофорная система молекулы обладает достаточно развитой и жесткой сопряженной электронной структурой, квантовый выход флуоресценции такой молекулы в несвязанном состоянии в полярном растворителе может быть уменьшен введением «внешних» заместителей, электроноакцепторных по отношению к хромофору (либо увеличен, если вводимый заместитель будет проявлять электронодонорный по отношению к хромофору характер). Тогда как при специфическом взаимодействии с полинуклеотидом либо в средах с низкой диэлектрической проницаемостью (таких, например, как 2-пропанол) электронное влияние «внешних» заместителей на хромофорную систему лиганда в значительной мере ослабляется. И в результате общий  $\phi$  красителя становится ближе к  $\phi$  его хромофорной системы в отсутствие каких-либо заместителей.

В-третьих, нередко (например, в случае рассмотренных выше соединений VI–X) одно и то же соединение может присутствовать в растворе одновременно в нескольких равновесных формах, различающихся степенью ионизации хромофорной системы и ее заместителей, количеством внутри- либо межмолекулярных водородных связей и др. Причем соотношение концентраций этих форм способно меняться в зависимости от pH раствора, характера растворителя и др.

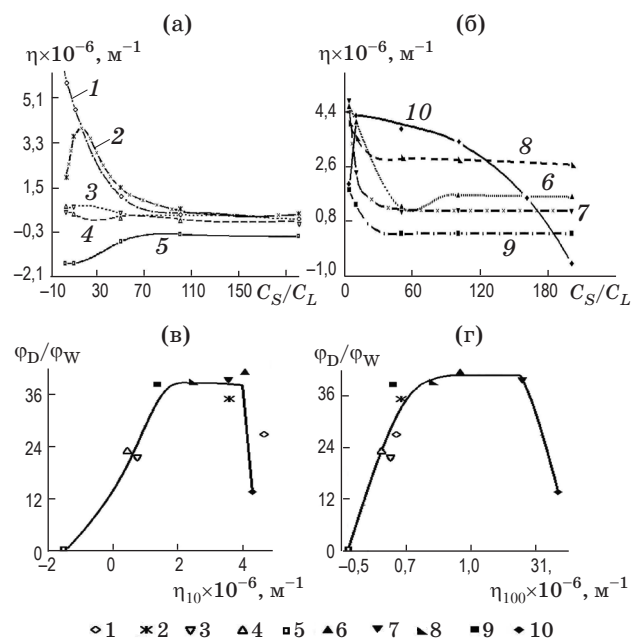
Таким образом, при конструировании эффективного флуорофора на ДНК необходимо сначала выбрать для него структуру потенциально флуоресцентно активной хромофорной системы. Она должна содержать один или несколько фрагментов, обладающих развитой системой сопряженных связей, и имеющих, желательнее, один или несколько 5- или 6-членных ароматических циклов (обязательно конденсированных, если конструируется интеркалятор) и хотя бы один гетероатом (желательнее, эндоциклический азот или кислород), который помимо прочего послужит центром специфического связывания конструируемого красителя с полинуклеотидом. Такого рода хромофорные системы имеются практически у всех известных к настоящему времени флуорофоров, специфичных к ДНК.

Кроме этого, в составе молекулы будущего субстрат-специфичного флуорофора должны присутствовать один или несколько «внешних»



**Рис. 4.** Ряд «внешних» заместителей, построенный в порядке убывания их электроноакцепторной (возрастания электронодонорной) активности по отношению к хромофорной системе красителя.

заместителей. Подбор оптимальных структуры, количества и расположения таких заместителей относительно хромофорной системы конструируемого красителя представляет собой, как правило, достаточно сложную процедуру. Однако и здесь можно сформулировать ряд общих правил. Так, подобный заместитель не должен создавать стерических затруднений взаимодействию лиганда, в состав которого он должен входить, с субстратом. Желательно, чтобы выбранный заместитель обладал гидрофильными свойствами, и чтобы в его составе имелись функциональные группы, содержащие азот или кислород, которые могли бы служить дополнительными центрами специфического связывания конструируемого флуорофора с полинуклеотидом. Желательно так же, чтобы выбранный заместитель проявлял по отношению к хромофорной системе флуорофора, в состав которого он должен входить, в условиях, при которых, предположительно, должно происходить связывание этого флуорофора с ДНК, электроноакцепторные свойства. Однако вызванное взаимодействием такого заместителя с хромофорным «ядром» молекулы красителя уменьшение интенсивности флуоресценции последнего в водных средах в не связанном с субстратом состоянии не должно быть слишком значительным. В противном случае уве-



**Рис. 5.** Зависимости коэффициента флуоресцентной чувствительности  $\eta$  соединений I–V и XI–XV от соотношений  $C_S/C_L$  (а, б) и  $\Phi_D/\Phi_W$  (в, г) в Ст-буфере. Точками 1–10 обозначены экспериментальные данные соединений I–V и XI–XV соответственно, кривыми 1–10 — аппроксимирующие зависимости, соответствующие точкам 1–10.

личение флуоресценции красителя при специфическом связывании его с субстратом в абсолютном выражении может оказаться не достаточным для достоверной его практической регистрации. Для удобства подбора заместители, удовлетворяющие перечисленным рекомендациям, можно организовать по их относительной электроноакцепторной активности в ряд, подобный тому, который представлен на рис. 4.

При выборе соединения, оптимального в плане практического его использования в качестве флуорофора на ДНК, необходимо обеспечить соблюдение следующих условий. Во-первых, спектральные и комплексообразующие свойства выбираемого соединения должны быть малочувствительными к изменениям условий измерения (температуры, pH, вязкости и др.), а также к присутствию в растворе различных примесей, которые могут изменять квантовый выход флуоресценции не связанного с субстратом «основного» лиганда, конкурировать с ним за места связывания на субстрате и др. Во-вторых, выбираемое соединение должно быть достаточно доступно в плане технологии его получения или закупки, устойчиво в растворе и др.

И наконец, соединение, выбираемое в качестве флуорофора на ДНК, должно обеспечивать максимальное значение не  $\Phi_D/\Phi_W$ , а коэффициентов флуоресцентной чувствительности, которые имеют максимальные значения, как правило, при малых  $C_S/C_L$  (рис. 5).



## ЛИТЕРАТУРА

1. *Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D.* Mechanisms of variation in fluorescent properties of bis-benzimidazole dyes // *Russian J. Bioorganic Chemistry*. 1995. V. 21. № 9. P. 633–637.
2. *Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D.* Mechanisms of interactions of some phenylbenzimidazole and phenylindole dyes with DNA // *Russian J. Bioorganic Chemistry*. 1994. V. 20. № 6. P. 644–661.
3. *Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V.* Effect of heteroatom on the spectral properties of benzazoles // *Russian J. Organic Chemistry*. 1997. V. 33. № 12. P. 1840–1843.
4. *Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D.* Spectral properties of bisbenzimidazole dyes upon interaction with DNA // *Russian J. Bioorganic Chemistry*. 1997. V. 23. № 12. P. 857–866.
5. *Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D.* Comparative study of DNA-specific dyes of the indole and benzimidazole series // *Russian J. Bioorganic Chemistry*. 2001. V. 27. № 1. P. 57–65.
6. *Sibirtsev V.S., Tolmachev A.Yu., Kovaleva M.V., Garabadzhiu A.V., Traven V.F.* Spectral study of interactions of 4,8,4'-trimethylpsoralen and 4,4'-dimethylangelicin dyes with DNA // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. V. 70. № 7. P. 822–832.
7. *Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В.* Флуоресцентные ДНК-зонды: введение в теорию и практику использования. СПб.: НОУ Экспресс, 2006. 188 с.
8. *Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V.* Spectral study of the interaction of DNA with benzothiazolyl-benz-a-chromene // *Biochemistry (Moscow)*. 2007. V. 72. № 8. P. 901–909.
9. *Sibirtsev V.S.* Study of applicability of the bifunctional system “Ethidium bromide + Hoechst-33258” for DNA analysis // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. V. 70. № 4. P. 449–457.
10. *Сибирцев В.С.* Анализ информативности различных параметров комплексообразования на примере описания взаимодействия с ДНК ряда бензозольных соединений // *Известия СПбГТИ (ТУ)*. 2013. № 19. С. 8–15.
11. *Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В., Иванов С.Д.* Механизмы изменения спектральных свойств ДНК-специфичных феноксазинов // *Известия СПбГТИ (ТУ)*. 2014. № 24. С. 35–38.