

УДК 535.343+535.372+535.518+547.864

СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ФЕНАЗИНА

О.А. Рязанова¹, В.Н. Зозуля¹, И.М. Волошин¹, В.А. Карачевцев¹, В.Л. Макитрук²

¹Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины, 61103, пр. Ленина 47, Харьков. e-mail: ryazanova@ilt.kharkov.ua

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, 03143 ул. Заболотного 150, Киев, Украина
Поступила в редакцию 18 апреля 2003 г.

Исследованы спектрально-флуоресцентные свойства имидазо-[4,5-d]-феназина и трех его электронейтральных производных в этилацетате и глицерине. Спектры поглощения этих производных в видимой области состоят из двух полос, соответствующих отдельным электронным $\pi\pi^*$ переходам. Для всех производных определены значения энергии чисто электронного $S_1 \leftarrow S_0$ перехода. Поляризация флуоресценции 2-трифторметилимидазо-[4,5-d]-феназина и 1,2,3-триазоло-[4,5-d]-феназина в несколько раз выше поляризации незамещенного имидазофеназина, что делает эти производные перспективными для использования в качестве флуоресцентных зондов при исследовании молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: феназины, спектроскопия, поляризованная флуоресценция, флуоресцентный зонд.

Интерес, проявляемый к феназиновым красителям, объясняется возможностью их применения в биологии и медицине. Благодаря активному поглощению живыми тканями производные феназина широко используются для окрашивания субмолекулярных частиц [1], они являются эффективными противотуберкулезными средствами [2], а также могут быть использованы в солнечных батареях на красителях [3]. Так как производные феназина взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами путем интеркаляции [4], они могут быть также использованы для стабилизации комплексов нуклеиновых кислот. При участии одного из авторов статьи ранее были синтезированы рибозидные электронейтральные производные феназина, особенностью которых является наличие плоского тетрациклического хромофора, и осуществлено их ковалентное присоединение к олигонуклеотидам через рибозный остаток [5,6]. Преимущество такого способа присоединения по сравнению с присоединением через полиметиленовый линкер [7,8] заключается том, что хромофор красителя встраивается в олигонуклеотидную цепь подобно нуклеозиду, т.е. его положение в комплексе predetermined. В работах [9,10] методом поляризованной флуоресценции было изучено взаимодействие с различными полинуклеотидами и ДНК одного из этих производных, имидазо[4,5-d]феназина N1- β -D-рибофуранозида. При интеркаляции хромофора имидазофеназина в молекулу нуклеиновой кислоты его флуоресцентные свойства изменяются различным образом в зависимости от вторичной структуры биополимера и типа нуклеотидов в месте связывания [9], что позволяет использовать его в качестве флуоресцентного зонда молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот [11]. Однако имидазофеназин обладает и некоторыми недостатками, в частности, его длинноволновая полоса поглощения расположена близко к УФ области и имеет недостаточно высокий молярный коэффициент экстинкции. Кроме того, степень поляризации флуоресценции имидазофеназина мала, что затрудняет использование поляризационных методик для изучения комплексобразования. Поэтому целью данной работы было изучение других тетрациклических электронейтральных производных феназина для поиска более эффективного флуоресцентного зонда гибридизации нуклеиновых кислот. Нами были исследованы абсорбционные и флуоресцентные свойства агликонов имидазо-[4,5-d]-феназина (F1), 2-трифторметилимидазо-[4,5-d]-феназина (F2), 2-метилимидазо-[4,5-d]-феназина (F3), и 1,2,3-триазоло-[4,5-d]-феназина (F4) (Рис.1).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Феназиновые производные были синтезированы в ИМБГ НАН Украины (г. Киев) [5,6]. В качестве растворителей использовались спектрально чистые этилацетат и глицерин.

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре SPECORD UV/VIS (VEB Carl Zeiss, Jena), соединенном с персональным компьютером для записи информации. Измерения производили в 2 см кварцевых кюветах, концентрация красителей составляла $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Спектры и

поляризацию флуоресценции измеряли на лабораторном спектрофлуориметре с регистрацией по методу счета фотонов. Установка и методика измерений были описаны ранее [9]. Излучение регистрировалось под углом 90° к возбуждающему пучку. Полученные спектры были скорректированы с учетом спектральной чувствительности спектрофлуориметра. Исследование проводилось при комнатной температуре, за исключением серии поляризационных измерений в глицерине при температуре -12°C .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

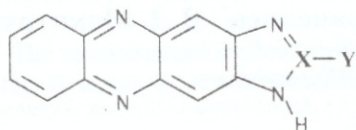


Рис.1. Структурная формула феназиновых производных

- F1: X = C Y = H
 F2: X = C Y = CF₃
 F3: X = C Y = CH₃
 F4: X = N Y - отсутствует

($\log \epsilon = 4,26$) и длинноволнового плеча, интенсивность которого составляет примерно 23% от интенсивности коротковолновой полосы ($\log \epsilon = 3,62$). Спектр флуоресценции F1 имеет колоколообразный вид с максимумом при 518 нм.

Замещение атома водорода при углероде в имидазольном кольце трифторметильной группой (F2) приводит к гиперхромизму полос поглощения и появлению в них структуры. Соотношение между коэффициентами экстинкции длинноволновой и коротковолновой полос сохраняется. Наблюдается существенное уменьшение Стоксова сдвига спектра флуоресценции. Так как электроотрицательность CF₃⁻ значительно выше, чем у H⁺, то при замещении происходит смещение электронного облака по линии σ -связей в сторону заместителя, т.е. наблюдается отрицательный индуктивный эффект [13]. Одновременно с этим осуществляется обратное смещение электронов по линии облаков π -связей за счет

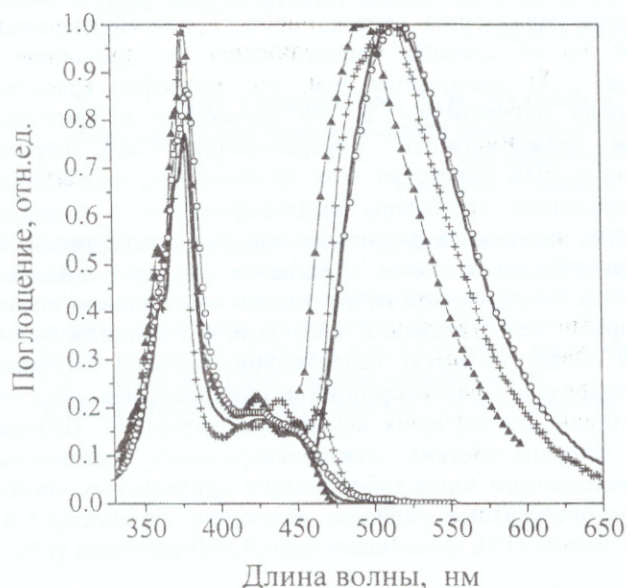


Рис.2. Нормированные спектры поглощения и флуоресценции производных феназина в этилацетате: F1 (—), F2 (—▲—), F3 (—○—), F4 (—+—), концентрация красителя $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

участия в сопряжении неподеленных электронных пар фтора. Отрицательный индуктивный эффект сильнее, чем положительный эффект сопряжения, поэтому происходит оттягивание к атомам фтора облака валентных электронов от остальной части молекулы. Замена имидазольного кольца триазольным (F4), имеющим в пятичленном кольце дополнительный атом азота, который обладает неподеленной электронной парой и является более электроотрицательным, чем углерод, приводит к батохромному смещению длинноволновой полосы поглощения на 20 нм, гиперхромизму и обострению колебательной структуры. Величина Стоксова сдвига для F4 также существенно меньше, чем для F1.

Замещение водорода по тому же положению метильной группой (F3) практически не изменяет вид спектра поглощения, приводя к небольшому увеличению коэффициента экстинкции и батохромному сдвигу на 1-2 нм. Это объясняется эффектом гиперконъюгации, когда имеет место частичное смещение σ -электронов трех C-H связей на соседнюю C-C связь, что приводит к их взаимодействию с π -электронами соседней ароматической системы. Кроме того, метильная группа является менее электроотрицательной, чем H⁺, что вызывает положительный индуктивный эффект, т.е. смещение центра тяжести электронного облака от заместителя.

Замещение имидазольного кольца триазольным (F4), имеющим в пятичленном кольце дополнительный атом азота, который обладает неподеленной электронной парой и является более электроотрицательным, чем углерод, приводит к батохромному смещению длинноволновой полосы поглощения на 20 нм, гиперхромизму и обострению колебательной структуры. Величина Стоксова сдвига для F4 также существенно меньше, чем для F1.

Форма спектров феназинов в глицерине качественно такая же, как в этилацетате, однако наблюдается bathochromный сдвиг полос поглощения и флуоресценции, обусловленный увеличением полярности растворителя и протонодонорными свойствами глицерина. В глицерине также наблюдается возрастание интенсивности флуоресценции исследуемых производных феназина.

Таблица 1. Спектрально-флуоресцентные свойства тетрациклических феназинов

| Вещество | Растворитель | Свойства растворителя | | Поглощение | | | Флуоресценция | | $E_{S_1 \rightarrow S_0}$ (эВ) |
|----------|--------------|-----------------------|----------------|---------------------|---|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| | | D ^a | n ^b | λ_1 (nm) | ϵ_1 (M ⁻¹ cm ⁻¹) | λ_2 ^c (nm) | λ_{exc} ^d (nm) | λ_{max} (nm) | |
| F1 | Этилацетат | 6.02 | 1.37 | 379 | 18400 | 426 | 440 | 518 | 2.64 |
| | Глицерин | 42.5 | 1.47 | 386 | 18000 | 440 | 440 | 550 | 2.52 |
| F2 | Этилацетат | 6.02 | 1.37 | 378 | 23900 | 423 | 440 | 493 | 2.70 |
| | Глицерин | 42.5 | 1.47 | 386 | 22700 | 433 | 440 | 532 | 2.55 |
| F3 | Этилацетат | 6.02 | 1.37 | 380 | 20600 | 427 | 440 | 521 | 2.62 |
| | Глицерин | 42.5 | 1.47 | 388 | 19600 | 440 | 440 | 557 | 2.49 |
| F4 | Этилацетат | 6.02 | 1.37 | 376 | 23400 | 437 | 440 | 512 | 2.61 |
| | Глицерин | 42.5 | 1.47 | 381 | 20000 | 450 | 440 | 537 | 2.51 |

^a D - диэлектрическая постоянная.

^b n - коэффициент преломления растворителя. Значения D и n взяты из [14].

^c λ_2 - приблизительное положение максимума поглощения длинноволновой полосы

^d λ_{exc} - длина волны возбуждения флуоресценции

В Таблице 1 приведены длины волн максимумов полос поглощения и флуоресценции и молярные коэффициенты экстинкции производных феназина в этилацетате и глицерине, а также значения энергии чисто электронного 0-0 перехода между нижними колебательными уровнями основного (S_0) и первого возбужденного (S_1) состояний молекул. Для того чтобы рассчитать значения энергии $E_{S_1-S_0}$, мы оценили частоты электронных 0-0 переходов из пересечения кривых поглощения, построенных в координатах $\frac{\alpha(\bar{\nu})}{\bar{\nu}}$ от $\bar{\nu}$, и нормированных спектров флуоресценции в координатах $\frac{I(\nu)}{\nu^3}$ от $\bar{\nu}$ [15], где $\bar{\nu}$ - волновое число в см⁻¹. Из Табл. 1 видно, что для всех производных изменения энергии чисто электронного перехода по сравнению с незамещенным имидазофеназином F1 невелики, для F2 наблюдается повышение, а для F3 и F4 - понижение энергии $S_1 \leftarrow S_0$ перехода.

Таблица 2. Степень поляризации флуоресценции производных феназина в этилацетате и глицерине.

| Растворитель | T, (°C) | F1 | | F2 | | F3 | | F4 | |
|--------------|------------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | Длина волны возбуждения | | | | | | | |
| | | 380 нм | 440 нм | 380 нм | 440 нм | 380 нм | 440 нм | 380 нм | 440 нм |
| Этилацетат | +18 | - | 0.010 | - | 0.056 | - | - | - | 0.040 |
| Глицерин | +18 | -0.010 | 0.012 | -0.072 | 0.114 | - | 0.022 | -0.064 | 0.107 |
| Глицерин | -12 | -0.041 | 0.040 | -0.096 | 0.142 | - | 0.090 | -0.083 | 0.146 |

В Таблице 2 приведены значения степени поляризации флуоресценции исследуемых производных феназина в этилацетате и глицерине. Степень поляризации флуоресценции определялась по формуле

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (1)$$

где I_{\parallel} и I_{\perp} - параллельная и перпендикулярная электрическому вектору возбуждающего света составляющие поляризованной флуоресценции. Возбуждение производилось в области длинноволновой полосы поглощения. Мы видим, что при комнатной температуре степень поляризации флуоресценции F1 мала в обоих растворителях (~0,01). Для производных F2 и F4 в этилацетате она в несколько раз, а в глицерине - на порядок выше по сравнению со значениями для F1. В охлажденных до -12 °C вязких глицериновых растворах поляризация флуоресценции для F1 увеличивается до 0,04, для F3 - до 0,09, а для F2 и F4 она достигает 0,14.

Для выяснения вопроса, соответствуют ли полосы в спектре поглощения отдельным электронным переходам, дополнительно была измерена поляризация флуоресценции в глицерине при возбуждении в области коротковолнового максимума поглощения красителей. Из приведенных в Таблице 2 данных видно, что при возбуждении в коротковолновой полосе степень поляризации флуоресценции принимает отрицательные значения, при возбуждении в длинноволновом плече - положительные. Подобная картина наблюдалась ранее для акрихина [16]. Это означает, что осцилляторы коротковолнового и длинноволнового поглощения направлены перпендикулярно или почти перпендикулярно друг другу [16], то есть длинноволновое плечо в спектре поглощения соответствует отдельному электронному переходу. На основании высокой интенсивности обеих полос поглощения в видимой области ($\log \epsilon > 3$) и bathochromного сдвига при переходе от этилацетата к более полярному протондонорному глицерину мы делаем вывод о принадлежности обеих полос поглощения к $\pi\pi^*$ типу.

Из литературных данных [17] известно, что нижним синглетным уровнем основного состояния классического феназина является уровень $\pi\pi^*$ типа. Это нефлуоресцирующая молекула с дипольным моментом равным нулю, для которой при низких температурах наблюдается фосфоресценция [18]. На основании анализа полученных нами спектров поглощения и флуоресценции можно сделать вывод об инверсии $S_{\pi\pi^*}$ и $S_{n\pi^*}$ уровней первого возбужденного состояния производных имидазофеназина по сравнению с классическим феназином. Для исследованных производных имидазофеназина низшим синглетным возбужденным уровнем энергии является уровень $\pi\pi^*$ типа. Мы считаем, что по классификации, приведенной в [19], данные тетрациклические производные феназина можно отнести к V типу молекул, для которых энергетические уровни расположены в порядке возрастания энергии следующим образом: $S_0, T_{\pi\pi^*}, S_{\pi\pi^*}, T_{n\pi^*}, S_{n\pi^*}$.

ВЫВОДЫ

Исследованы спектрально-флуоресцентные свойства четырех тетрациклических производных имидазофеназина. Показано, что модификация имидазольного кольца метильной группой (F3) слабо влияет на абсорбционные и флуоресцентные свойства красителя. В то же время, модификация имидазольного кольца трифторметильной группой (F2) или замещение его триазольным кольцом (F4) приводит к росту коэффициента экстинкции, существенному увеличению степени поляризации флуоресценции, а для F4 и понижению энергии $S_1 \leftarrow S_0$ перехода. Такие изменения спектроскопических свойств увеличивают эффективность флуоресцентных меток на основе гликозидных производных имидазофеназина, в частности, позволяя использовать поляризационную методику для регистрации молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lillie R.D. and Fulmer H.M. *Histopathologic technique and practical histochemistry*. McGraw - Hill, New York, 1976, 942 p.
- van Rensburga C.E.J., Joonéa G. K, Sirgelb F. A. et al.// *Chemotherapy* – 2000-v.46, p. 43-48.
- Jana A.K.// *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*-2000-v. 135, p. 1-17.
- Muller W., Crothers D.M. // *Eur. J. Biochem.*-1975-v.54, p.267-277.
- Makitruk V.L., Yarmoluk S.N., Shalamay A.S. et al. // *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* –1991- v.24, p. 244.
- Макитрук В.Л., Шаламай А.С., Кондратюк И.В.// *Биополимеры и клетка* –1997-v.13, №6, p.453-459.
- Зарытова В.Ф., Кутявин И.В. и др. // *Биоорганическая химия*- 1986- т.12, №7, с. 911-920.
- Lokhov S.G., Podyminogin M.A. et al. // *Bioconjugate Chem.*- 1992- v.3, № 5, с.414-419.
- Zozulya V., Blagoi Yu., Lober G., Voloshin I. et al. // *Biophys. Chem.* –1997-v.65, p. 55-63.
- Благой Ю.П., Зозуля В.Н., Волошин И.М. и др.// *Биополимеры и клетка* –1997-т.13, №1, с. 22-29.
- Zozulya V., Shcherbakova A. and Dubey I.// *J. Fluoresc.*-2000-v.10, No.1, p.49-53.
- VanAllan J.A.; Reynolds G.A.; Adel R.E.// *J. Org. Chem.*- 1962-т. 27, с.1659-1664.
- Темникова Т.И. Курс теоретических основ органической химии. Л.: ГНТИХЛ, 1962, 948 с.
- A.J. Gordon, R.A. Ford *The Chemist's Companion (a Handbook of Practical Data, Techniques, and References)*, John Wiley & Sons, New York-London-Sydney-Toronto, 1972, 541 p.
- Birks J.B. *Photophysics of Aromatic Molecules*, John Wiley & Sons, New York, 1970, 704 p.
- Феофилов П.П. Поляризованная люминесценция атомов, молекул и кристаллов. М.: Физматгиз, 1959, 288 с.
- Теренин А.Н. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений. Л.: Наука, 1967, 616 с.
- Aaron J.J., Maafi M., Parkani C., Boniface C.// *Spectrochim. Acta* –1995-v.54(A), p. 603-615.
- Нурмухаметов Р.Н. Поглощение и люминесценция ароматических соединений. М. Химия; 1971, 216с.