



УДК 547.785.5'55.1'963.32:535.33/34

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ДНК-СПЕЦИФИЧНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ ИНДОЛЬНОГО И БЕНЗИМИДАЗОЛЬНОГО РЯДА

© 2001 г. В. С. Сибирцев, А. В. Гарабаджи\*, С. Д. Иванов<sup>#</sup>Центральный научно-исследовательский рентгенорадиологический институт МЗ РФ,  
189646, Санкт-Петербург, Песочный 2, ул. Ленинградская, 70/4;

\* Санкт-Петербургский государственный технологический институт

Поступила в редакцию 12.05.99 г. Принята к печати 08.09.2000 г.

Рассмотрены используемые в настоящее время различные модели комплексообразования низкомолекулярных лигандов с ДНК. С помощью модели Скэтчарда произведен расчет параметров связывания флуоресцентных монофенилиндольных, монофенилбензимидазольных и бисбензимидазольных красителей с ДНК тимуса теленка. С использованием графического (непараметрического) и корреляционного анализа проведено сопоставление различных спектральных и комплексообразующих свойств указанных красителей в присутствии ДНК.

*Ключевые слова:* ДНК; комплексообразование; бензимидазолы; фенилиндолы.

### ВВЕДЕНИЕ

В последнее время в биохимии и молекулярной биологии интенсивно изучаются механизмы взаимодействия с ДНК различных ДНК-специфичных лигандов, обладающих флуоресцентными свойствами. Данные исследования имеют не только теоретическое, но и большое практическое значение, поскольку спектр применения подобных веществ весьма обширен. Они могут использоваться в диагностических целях – для оценки количественных и качественных изменений структуры нуклеиновых кислот при различных физиологических состояниях организма [1, 2], для биотестирования компонентов окружающей среды [3], в качестве векторов, специфичных к определенным фрагментам ДНК [4, 5], а также непосредственно в качестве лекарственных препаратов [6–8].

Для интегральной характеристики взаимодействия в системах ДНК–лиганд наиболее распространен в настоящее время следующий подход. Предположим, на полимере имеется  $F$  мест связывания лиганда, и все они спектроскопически эквивалентны. Допустим также, что связывание с каждым местом и происходящее при этом изменение спектральных параметров не зависят от взаимодействия с соседними местами связывания.

Примем следующие обозначения:  $m = C_L^f$  – молярная концентрация свободного лиганда в растворе;  $r = C_L^b/C_D$  – количество связанного лиган-

да, приходящееся на единицу концентрации субстрата (здесь  $C_D$  – общая молярная концентрация нуклеотидов в системе, а  $C_L^b$  – молярная концентрация связанного лиганда в растворе);  $n = r_{\max}$  – максимально возможное число молекул лиганда, которое может быть связано одной молекулой ДНК в расчете на общее число пар нуклеотидов в ней (в литературе эта величина называется также числом мест связывания, приходящимся на одну пару оснований полинуклеотида). При этом особо стоит отметить, что не следует отождествлять, как это сделано, например, в работе [9], величины  $h = C_D^b/C_L^b$  (отражающую число пар оснований полинуклеотида, собственно связываемых одной молекулой лиганда) и  $q = 1/n = [(C_D^b + C_D^f)/C_L^b]_{\min}$  (где  $C_D^b$  и  $C_D^f$  – молярные концентрации связанных лигандом и свободных нуклеотидов в системе; отражающую среднее число пар оснований на полинуклеотиде, которые при сорбции на них одной из молекул лиганда становятся недоступными для других молекул лиганда), поскольку в величину  $q$  будут входить как  $h$  собственно связываемых одной молекулой лиганда пар оснований, так и некоторое число пар оснований, с которыми лиганд в силу специфического характера взаимодействия с полинуклеотидом, в принципе, связаться не может. Так, например, для такого хорошо известного интеркалятора, как бромид этидия при связывании его с различными полинуклеотидами величина  $h$  будет всегда равна 2 п.о. (в чем можно убедиться применяя, например, рентгено-

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (812) 596-67-03; (812) 599-55-73).

структурный анализ), а  $q$  – больше или равна 2 п.о. в зависимости от вида полинуклеотида (при этом, в частности, чем больше будет у рассматриваемого полинуклеотида процентное содержание А · Т-пар и степень суперспирализации, тем при связывании с ним бромид аэтидия величина  $q$  будет больше [10]).

При  $n$  равном 1 для рассматриваемой системы справедливо будет уравнение изотермы Лэнгмюра [11]:

$$K = r/(m - mr). \quad (1)$$

Для случая же, когда  $n < 1$  (что имеет место в реальных системах ДНК–лиганд), Скэтчардом [12] было предложено преобразовать уравнение (1) к виду:

$$r/m = Kn - Kr. \quad (2)$$

При этом  $r$  и  $n - r$  могут быть интерпретированы как доли занятых и свободных мест связывания (каждое – длиной в  $h$  п.о.) на рассматриваемом полимере; а  $K$  – как эмпирическая константа, имеющая величину, обратную концентрации свободного лиганда в системе, когда им занята половина потенциальных мест связывания на субстрате. В литературе величина  $K$  часто называется константой связывания, однако мы в дальнейшем, по аналогии с моделью Лэнгмюра, будем называть ее константой адсорбции, чтобы не путать с термодинамической константой устойчивости комплекса, образуемого молекулой лиганда с  $h$  п.о. (одним местом связывания) на полинуклеотиде, как это имело место в работах [9, 13]. Некоторыми исследователями [14, 15] эта величина интерпретировалась так же, как термодинамическая константа устойчивости комплекса, образуемого единичной молекулой красителя с молекулой полинуклеотида в целом, а не с одним из мест связывания на ней. Однако такая интерпретация была бы достаточно правомерна лишь в том случае, когда и  $C_D$  в формуле (2) определялась как концентрация в растворе молекул ДНК, а не нуклеотидов, что достаточно затруднительно.

Существуют также другие модели, развивающие данный подход. Так, если предположить наличие в системе  $G$  типов комплексов с различающимися значениями  $K_i$  и  $n_i$ , то, обобщая на этот случай выводы, сделанные для уравнения (2), можно получить следующее выражение [11]:

$$r = \sum [n_i K_i m / (1 + K_i m)]; \quad i = 1-G. \quad (3)$$

Отмечено [16], что в процессе связывания с ДНК протяженных лигандов ( $h > 1$ ) образуется несколько микроформ, в одних из которых лиганды располагаются таким образом, что решетка уже не может связать ни одного дополнитель-

ного лиганда, тогда как в других еще остается место для присоединения дополнительных молекул. Все эти микроформы находятся в равновесии со свободным лигандом. При связывании лиганда с полинуклеотидом происходит постоянное его перераспределение до тех пор, пока не устанавливается некоторое конечное состояние, которое можно охарактеризовать, как насыщение полинуклеотида лигандом. Для расчета характеристик связывания в этом случае предложено [17] следующее уравнение:

$$r/m = KL[L/(L+r)]^{q-1}, \quad \text{где } L = 1 - rq, \quad (4)$$

а в случае наличия  $G$  типов комплексов с различными значениями  $K_i$  и  $n_i$ , соответственно, система уравнений вида:

$$r_i/m = K_i L^{q_i} / (L + \sum r_i)^{q_i-1}, \quad (5)$$

$$\text{где } L = 1 - \sum r_i q_i, \quad i = 1-G.$$

Взаимовлияние лигандов может быть выражено через параметр кооперативности –  $w$ , введя который, можно записать уравнение (4) с учетом кооперативных эффектов [18]:

$$r/m = KL \left( \frac{Lrw + L + r - R}{Lr(w-1)} \right)^{q-1} \left( \frac{L-r+R}{2L} \right)^2, \quad (6)$$

$$\text{где } R = \sqrt{(L-r)^2 + 4wrq}.$$

При  $w$  равном 1 (взаимодействие между лигандами отсутствует), уравнение (6) сводится к уравнению (4). Когда  $w < 1$  (антикооперативное связывание), наблюдается антагонизм при связывании лигандов с полинуклеотидом. Когда же  $w > 1$  (кооперативное связывание), сорбция на субстрате одного лиганда облегчает присоединение другого. При этом, поскольку увеличение  $q$  приводит к появлению признаков антикооперативности при связывании, то при  $w > 1$  и  $q > 1$  кривая, описываемая уравнением (6), очевидно, представляет собой результат компромисса между влиянием этих двух факторов.

Дальнейшее развитие вышеописанный подход получил в аллостерической модели Крозера [7, 19, 20]. В ней предполагается, что каждая пара оснований полинуклеотида существует в одной из двух форм (или конформаций), способных к взаимным переходам с равновесной константой  $s$  и параметром кооперативности  $\sigma$ . Величина последнего отражает затруднения при переходе одной пары оснований из формы 1 в форму 2, возникающие в несвязанной с лигандом молекуле субстрата, находящейся преимущественно в форме 1. Лиганд способен связываться с обеими формами субстрата с константами адсорбции  $K_1$  и  $K_2$  и числом мест связывания  $n_1$  и  $n_2$  соответственно. Пер-

воначально связываясь с субстратом в форме 1, лиганд способен переводить его в некоторой локальной области в форму 2. Вследствие этого, соотношение между формами 2 и 1 в молекуле полинуклеотида изменяется от  $\sigma^2s$  (в свободном состоянии) до  $s$  (при полном связывании лигандом формы 1). Подобный переход ДНК из *A*- (или *Z*-) конформации в *B*-конформацию, индуцируемый такими классическими внешнесвязывающимися красителями, как нетропсин, дистамицин А, DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндо́л) и т.п., рассматривается в работах [19, 21, 22].

Одной из общепризнанных моделей для определения констант адсорбции, числа мест связывания, выявления кооперативного и антикооперативного характера взаимодействия в системе ДНК–лиганд является также модель Заседателя–Гурского [11, 17, 23]. Кроме того, для конкретных систем в вышеуказанные модели могут вводиться дополнительные условия. Так, например, в работе [24] рассматривается модель, учитывающая интеркаляцию исследуемых красителей, их внешнее кооперативное связывание с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК, а также влияние иона натрия, конкурирующего за места связывания красителя с фосфатными группами полинуклеотида, и возможную димеризацию свободных молекул лиганда.

Таким образом, современная теория охватывает, по-видимому, почти все допустимые варианты взаимодействия молекул лиганда между собой и с молекулой полинуклеотида. Однако на практике применение такого рода моделей сопряжено с рядом трудностей, обуславливаемых их значительной зависимостью от качества полученных экспериментальных данных, а также необходимостью применения достаточно сложного специального математического и программного обеспечения. В результате, чрезмерное усложнение модели, не поддержанное достаточно надежным и устойчивым методом расчета ее параметров, может привести к ухудшению ее адекватности, что, например, имело место в работе [24]. Вместе с тем описываемые вышеуказанными моделями эффекты (кооперативный, аллостерический и т.п.) вносят заметные искажения в уравнение Скэтчарда лишь при достаточно высокой общей концентрации лиганда и низких соотношениях концентраций ДНК/лиганд в системе [9, 25]. Кроме того, статистические эффекты, описываемые уравнением (4), могут иметь место только в системах с достаточно гомогенными субстратами (например, в случае поли-АТ, но в гораздо меньшей степени с ДНК живых организмов) или с низкоспецифичными лигандами (в частности, с интеркаляторами, но не с внешнесвязывающимися соединениями). Все вышесказанное приводит к то-

му, что уравнение Скэтчарда (2) до сих пор остается одной из наиболее широко распространенных моделей при расчетах параметров комплексообразования ДНК-связывающихся соединений [9, 10, 13, 25–27].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве объекта исследования нами выбраны пять внешнесвязывающихся флуоресцентных ДНК-специфичных красителей монофенилбензимидазольного и монофенилиндольного рядов, которые мы в дальнейшем будем называть монопроизводными, поскольку они содержат только по одному способному к активной флуоресценции бензимидазольному либо индольному фрагменту:

5(6)-амино-2-(4-аминофенил)бензимидазол (I),

5(6)-амидино-2-(4-аминофенил)бензимидазол (II),

5(6)-амидино-2-(4-нитрофенил)бензимидазол (III),

4',6-диамидино-2-фенилиндо́л (DAPI) (IV),

6-(2-имидазолин-2-ил)-2-[4-(2-имидазолин-2-ил)фенил]индо́л (DIPI) (V),

а также пять лигандов бисбензимидазольного ряда, которые мы в дальнейшем будем называть биспроизводными, поскольку они содержат по два способных к активной флуоресценции бензимидазольных фрагмента:

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

2-[2-(4-гидроксифенил)бензимидазол-5(6)-ил]-5(6)-(пиперазин-1-ил)бензимидазол (VII),

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

1,4-ди[5(6)-(4-метилпиперазин-1-ил)бензимидазол-2-ил]бензол (IX),

1,4-ди[5(6)-(3-диметиламинопропилкарбамоил)бензимидазол-2-ил]бензол (X).

Для данных десяти соединений, различающихся характером не только своих терминальных групп [27], но и самого потенциально способного к активной флуоресценции “ядра” молекулы, с помощью модели Скэтчарда был осуществлен расчет параметров комплексообразования  $K$  и  $n$  с ДНК тимуса теленка. Особенности метода расчета приведены ниже.

1. Флуоресцентное титрование исследуемого красителя проводилось различными количествами полинуклеотида. Для устранения осложнений общая концентрация красителя в растворе поддерживалась постоянной и достаточно низкой

( $C_L 6.42 \times 10^{-7}$  М), а соотношения молярных концентраций ДНК/краситель задавались в диапазоне  $C_D/C_L$  от 100 до 200. Во избежание эффектов разбавления, к раствору, содержащему буфер, краситель и ДНК в концентрации, обеспечивающей соотношение  $C_D/C_L$  равное 200, добавляли аликвоты раствора, содержащего буфер с красителем в той же концентрации ( $C_L$ ).

2. По полученным значениям интенсивностей флуоресценции красителя в присутствии заданного количества ДНК ( $I_i$ ), вычислялась величина максимально возможной интенсивности флуоресценции данного красителя в исследуемой системе ( $I_{\max}$ ). Эта величина определялась экстраполяцией верхнего линейного участка кривой зависимости величины  $I$  от соотношения концентраций  $C_L/C_D$ , полученной в ходе проведения флуоресцентного титрования исследуемого красителя, к нулевому значению  $C_L/C_D$ , как это показано на рис. 1а. Следует заметить, что указанный график служит лишь для иллюстрации и выбора количества точек (в данном случае  $Q = 4$ ) в верхней части кривой  $Y = f(X)$  (где  $Y = I$ , а  $X = C_L/C_D$ ) для дальнейшей их аппроксимации по методу наименьших квадратов зависимостью:

$$Y = a_0 + a_1 X, \quad (7)$$

где

$$a_1 = \frac{\sum X_i \sum Y_i - Q \sum (X_i Y_i)}{(\sum X_i)^2 - Q \sum X_i^2}, \quad (8)$$

$$a_0 = 1/Q (\sum Y_i - a_1 \sum X_i), \quad i = 1-Q.$$

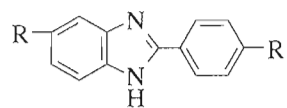
Точность величины  $I_{\max}$  при этом получается значительно выше, чем при чисто графическом ее определении, что, в свою очередь, сказывается и на точности определяемых с ее помощью параметров комплексообразования.

3. Выбрав нужное число точек аппроксимации, для соответствующих значений  $C_{D,i}$  вычисляли:

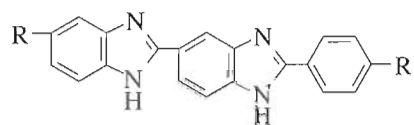
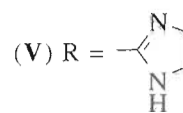
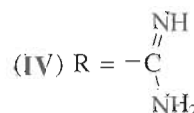
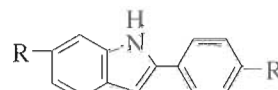
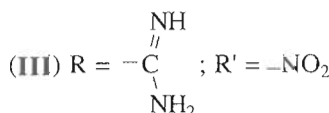
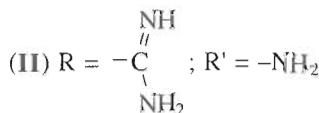
$$(C_L^b)_i = C_L (I_{\max} - I_i) / (I_{\max} - I_0), \quad (9)$$

где  $I_0$  – интенсивность флуоресценции красителя в отсутствие ДНК. Затем, приняв  $X_i = r_i = (C_L^b)_i / C_{D,i}$  при  $Y_i = r_i / m_i = X_i / (C_L - (C_L^b)_i)$  и вычислив по формулам (8)  $a_0$  и  $a_1$ , определяя  $K = -a_1$  и  $n = -a_0/a_1$ .

Из рис. 1б видно, что для соединений (IV) и (VI), выбранных в качестве типичных представителей класса моно- и биспроизводных, экспериментальные данные достаточно хорошо согласуются с расчетными. Это же подтверждает и тот



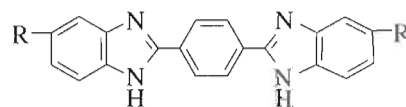
(I)  $R = R' = -NH_2$



(VI)  $R = -N(CH_2)_6N-CH_3$ ;  $R' = -OH$

(VII)  $R = -N(CH_2)_6NH$ ;  $R' = -OH$

(VIII)  $R = -N(CH_2)_6N-CH_3$ ;  $R' = -OCH_2CH_3$



(IX)  $R = -N(CH_2)_6N-CH_3$

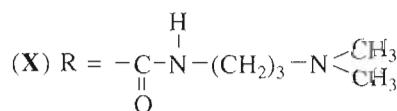


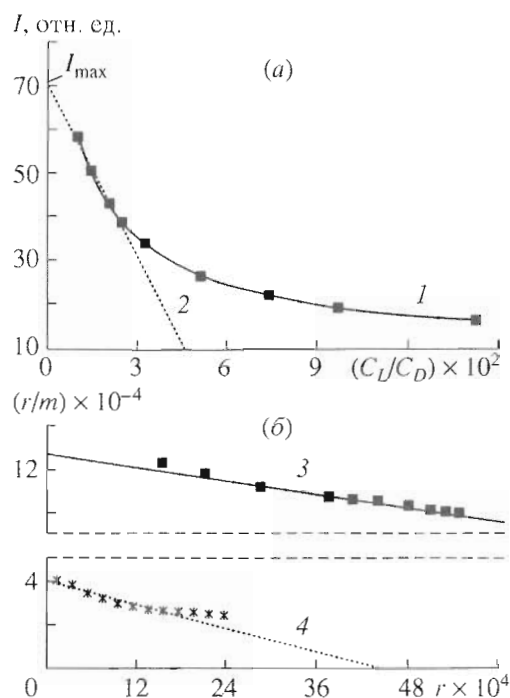
Схема.

факт, что величина относительной ошибки аппроксимации, вычислявшейся по формуле:

$$\varepsilon = 100/Q \sum (Y_{t,i} - Y_{e,i}) / Y_{e,i}, \quad (10)$$

(где  $Y_{t,i}$  и  $Y_{e,i}$  – теоретические ( $t$ ), вычисляемые по уравнению (7), и экспериментальные ( $e$ ) значения параметра  $Y$  [28]), не превышала 3% для всех исследованных в настоящей работе красителей.

После проведения расчетов полученные данные, а также другие комплексообразующие и спектральные свойства соединений (I)–(X), описанные нами ранее в работах [27, 29, 30], были собраны в таблицу и сопоставлены с химической структурой исследуемых красителей. При этом, как можно видеть, сами по себе значения пред-



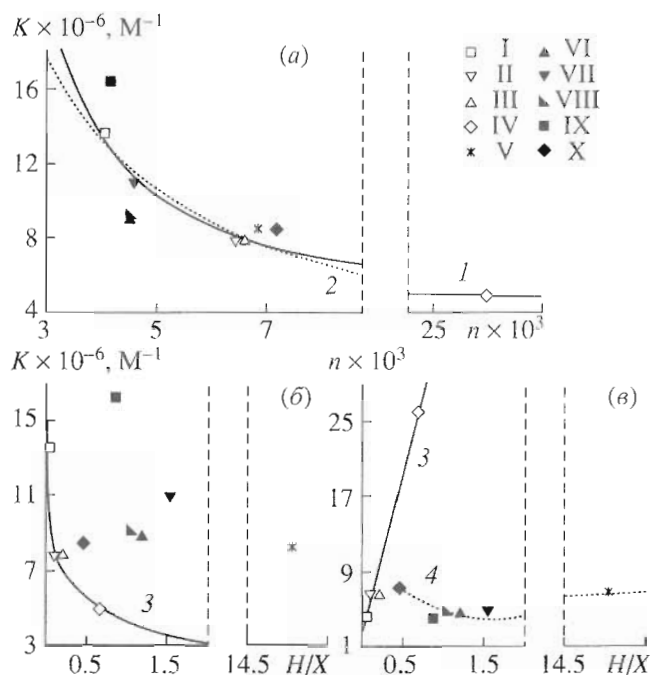
**Рис. 1.** Расчет параметров комплексообразования флуорофоров с ДНК; (а) определение максимально возможной интенсивности флуоресценции ( $I_{\max}$ ) красителя (IV) (DAPI) в присутствии ДНК; (б) представление полученных расчетных и экспериментальных данных для соединений (IV) и (VI) (Hoechst-33258) по Скэтчарду.

Кривая 1 демонстрирует зависимость, полученную после глобальной кубической сплайн-интерполяции экспериментальных данных для соединения (IV); прямая 2 получена линейной экстраполяцией верхней части кривой 1 к значению  $C_I/C_D$  равному 0 (а); прямые 3 и 4 соответствуют характеристическому уравнению модели Скэтчарда при связывании с ДНК тимуса теленка соединений (IV) и (VI) (б).

ставленных параметров не различались статистически достоверно для моно- и биспроизводных, исследованных в настоящей работе.

Зависимость между рассчитанными по модели Скэтчарда параметрами  $K$  и  $n$  также оказалась однозначно определенной для всех исследованных соединений (см. рис. 2а). При этом с увеличением специфичности исследованных соединений по отношению к субстрату (которая может быть выражена в относительном виде величиной  $q = 1/n$ ) сродство красителей к ДНК (выражаемое величиной  $K$ ) увеличивалось тем больше, чем меньше была величина  $n$ .

В отношении величины  $q$  следует еще раз отметить, что, по определению, она отражает лишь общее количество пар оснований, приходящееся в среднем на одну молекулу красителя при максимальном заполнении им полинуклеотида, включая как связывающиеся, так и несвязывающиеся



**Рис. 2.** Взаимозависимости между параметрами комплексообразования красителей (I)–(X) в присутствии ДНК, рассчитанными на основании модели адсорбции Скэтчарда ( $K$  и  $n$ ) и величины соотношения вкладов в образование специфического флуоресцентного лиганд-полинуклеотидного комплекса водородных и ионных связей ( $H/X$ ).

Условные обозначения: точками I–X показаны экспериментальные данные для соединений (I)–(X), соответственно. Кривыми 1 и 2 показаны достоверные для соединений (I)–(X) зависимости вида:  $K = 4.72 \times 10^6 + 139.6/n^2$ ,  $R = 0.850$ ,  $p < 0.01$ ,  $\epsilon = 10.8\%$  и  $K = 5.29 \times 10^4/n$ ,  $R = 0.815$ ,  $p < 0.01$ ,  $\epsilon = 17.6\%$ , соответственно (а); кривой 3 показаны достоверные для соединений (I)–(IV) зависимости вида:  $K = 4.29 \times 10^6 - 1.74 \times 10^6 \ln(H/X)$ ,  $R = -0.987$ ,  $p < 0.05$ ,  $\epsilon = 8.4\%$  (б) и  $n = 2.75 \times 10^{-3} + 0.0342H/X$ ,  $R = 0.985$ ,  $p < 0.05$ ,  $\epsilon = 16.2\%$  (в); кривой 4 показана зависимость, полученная после сглаживания данных для соединений (V)–(X) (в);  $\epsilon$  – относительная ошибка аппроксимации (см. формулу (10)).

с лигандом участки [11, 13]. Собственно же величина  $h$  (число пар оснований, связываемых одной молекулой лиганда), определяемая из данных рентгеноструктурного анализа, составляет для соединения (IV) – 3 [26], а для соединения (VI) – 4 п.о. [6]. Кроме того, некоторое недоумие может вызывать тот факт, что если в работе [26] для соединения (IV) были получены значения  $K$  и  $n$ , сходные с представленными в настоящей статье, то в работах [9, 25] значения тех же величин для ряда рассматриваемых соединений получились существенно иными. Это может быть объяснено тем, что в последнем случае использовались данные не флуоресцентного, а спектрофотометрического титрования, на которые оказывал влияние по-



Спектральные и комплексообразующие свойства исследованных красителей\*

Параметр	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)	(VIII)	(IX)	(X)
$K \times 10^{-6}, M^{-1}$	13.60	7.76	7.88	4.90	8.42	8.90	10.90	9.03	16.30	8.44
$n \times 10^3$	4.06	6.48	6.62	26.00	6.85	4.55	4.61	4.57	4.15	7.18
$K/n \times 10^{-9}, M^{-1}$	3.35	1.20	1.19	0.19	1.23	1.96	2.36	1.98	3.93	1.18
$H, \%$	0	8	15	37	90	51	57	48	44	29
$X, \%$	94	86	79	56	6	43	37	45	50	65
$H/X$	0	0.09	0.19	0.66	15.00	1.19	1.07	1.54	0.88	0.45
$\Phi$	0.55	21.60	23.40	27.10	35.40	41.60	39.10	39.60	38.80	13.80
$\eta_{10} \times 10^{-6}, \text{отн. ед. } M^{-1}$	-1.56	0.72	0.43	4.67	3.59	4.07	3.57	2.45	1.34	4.31
$\eta_{100} \times 10^{-6}, \text{отн. ед. } M^{-1}$	-0.39	0.39	0.23	0.50	0.59	1.69	2.85	1.18	0.44	3.52
$\lambda_{ex}, \text{нм}$	330	340	340	350	367	353	350	355	370	350
$\lambda_{em}, \text{нм}$	450	455	455	455	452	455	455	455	500	400

\*  $K$  – константа Скэтчарда, имеющая величину, обратную концентрации свободного красителя в системе, когда им занята половина потенциальных мест связывания на ДНК;  $n$  – максимально возможное число молекул лиганда, которое может быть связано одной молекулой ДНК, в расчете на общее число пар нуклеотидов в ней;  $H$  и  $X$  – относительные вклады водородных и ионных связей, соответственно, в образование специфического активно флуоресцирующего комплекса ДНК–краситель;  $\eta_{10}$  и  $\eta_{100}$  – коэффициенты флуоресцентной чувствительности, отражающие величину приращения интенсивности флуоресценции красителя в расчете на увеличение концентрации ДНК ( $C_D$ ) на 1 М и соотношения молярных концентраций ДНК/краситель ( $C_D/C_L$ ) равных 10 и 100, соответственно;  $\Phi = \Phi_{\max}/\Phi_0$  – отношение квантовых выходов красителя в присутствии насыщающего количества ДНК и в отсутствие полинуклеотида;  $\lambda_{ex}$  и  $\lambda_{em}$  – длины волн максимумов люминесцентного возбуждения и эмиссии красителя в видимой области спектра.

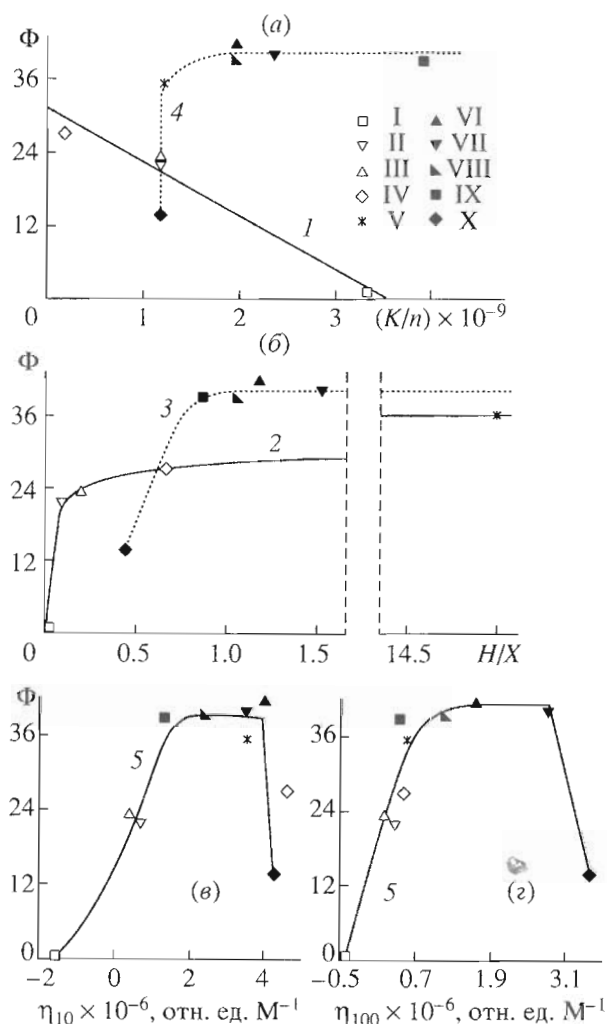
мимо сильного специфического также слабый неспецифический тип связывания лигандов с ДНК.

В то же время на примере зависимости величин  $K$  и  $n$  от соотношения вкладов в образование специфического флуоресцентного комплекса ДНК–лиганд водородных и ионных связей ( $H/X$ ) (рис. 2б, 2в) легко отметить различия в характере взаимодействия с субстратом моно- и биспроизводных бензимидазола и фенилиндола. Так, если для монопроизводных (I)–(IV) значение  $K$  с увеличением  $H$  (относительный вклад водородных связей в образование специфического флуоресцентного комплекса ДНК–лиганд) достоверно уменьшалось, а значение  $n$  – увеличивалось, то для биспроизводных (VI)–(X) и красителя (V) подобного не отмечалось.

Кроме того, для монопроизводных (I)–(IV) было отмечено статистически достоверное снижение величины отношения квантовых выходов ( $\Phi = \Phi_{\max}/\Phi_0$ ) с увеличением соотношения  $K/n$  ( $R = 0.982, p < 0.05$ , где  $R$  – коэффициент корреляции, а  $p$  – его достоверность) как в присутствии насыщающего количества ДНК, так и в отсутствие полинуклеотида. В то же время для биспроизводных (VI)–(X) и соединения (V) взаимосвязь между данными параметрами ( $\Phi$  и  $K/n$ ) отсутствовала даже по критерию ранговой корреляции Спирмена (см. рис. 3а). На рис. 3б, иллюстрирующем зависимость  $\Phi$  от  $H/X$ , различия между вышеуказанными группами соединений (I)–(IV) и

(V)–(X) хотя и заметны, однако гораздо менее отчетливы, чем в предыдущем случае. Наконец, для случая зависимости  $\Phi$  от коэффициентов флуоресцентной чувствительности  $\eta_{10}$  и  $\eta_{100}$  (отражающих величину приращения интенсивности флуоресценции рассматриваемого красителя при увеличении  $C_D$  на 1 М и соотношения молярных концентраций  $C_D/C_L$  равных 10 и 100, соответственно) данные для всех исследованных соединений ложатся на одну кривую (см. рис. 3в, 3г). Соотношения концентраций ДНК/краситель – 10 и 100 были выбраны, исходя из характера зависимостей  $\eta$  от  $C_D/C_L$  (приведенных нами для исследованных соединений в работах [27, 30]), как наиболее подходящие для отражения типичных величин коэффициентов флуоресценции рассматриваемых красителей в области малых и больших  $C_D/C_L$ .

С другой стороны, при рассмотрении зависимости коэффициентов флуоресцентной чувствительности  $\eta_{10}$  и  $\eta_{100}$  от параметров комплексообразования  $H/X$ ,  $K$  и  $n$  (рис. 4) различия между их характером для моно- и биспроизводных (к которым по совокупности своих спектральных и комплексообразующих свойств примыкает и соединение V) вновь видны весьма отчетливо. Так, для монопроизводных (I)–(IV) имеют место статистически достоверная корреляция  $\eta_{10}$  от  $H/X$  ( $R 0.969, p < 0.05$ );  $1/K$  ( $R 0.994, p < 0.01$ ) и  $\ln(n)$  ( $R 0.992, p < 0.01$ ). Кроме того, для соединений (I)–(V) бы-



**Рис. 3.** Зависимость величины отношения квантовых выходов красителей (I)–(X) в присутствии насыщающего количества ДНК тимуса теленка и в ее отсутствие ( $\Phi$ ) от параметров комплексообразования  $K/n$  (a),  $H/X$  (б) и коэффициентов флуоресцентной чувствительности ( $\eta$ ) при соотношениях молярных концентраций ДНК/краситель – 10 (в) и 100 (г).

Условные обозначения: точками I–X показаны экспериментальные данные для соединений (I)–(X), соответственно. Кривая 1 (a) показывает достоверную для соединений (I)–(IV) зависимость вида:  $\Phi = 31.24 - 8.82 \times 10^{-9} K/n$ ,  $R = -0.982$ ,  $p < 0.05$ ; кривые 2–5 демонстрируют зависимости, полученные после сглаживания данных для соединений (I)–(V), (VI)–(X), (V)–(X) и (I)–(X), соответственно.

ла отмечена зависимость  $\eta_{100}$  от  $\ln(H/X)$  ( $R = 0.966$ ,  $p < 0.05$ );  $K^2$  ( $R = -0.911$ ,  $p < 0.05$ ) и  $e^{-n}$  ( $R = -0.949$ ,  $p < 0.05$ ). В то же время для биспроизводных (VI)–(X) и соединения (V) удалось отметить лишь наличие достоверной корреляции  $\eta_{10}$  от  $K$  ( $R = -0.815$ ,  $p < 0.05$ ) и  $e^{-n}$  ( $R = -0.854$ ,  $p < 0.05$ ); кроме того, для соединений (VI)–(X) имела место зависимость  $\eta_{100}$  от  $e^{-n}$  ( $R = -0.883$ ,  $p < 0.05$ ) (см. рис. 4в, 4г).

Таким образом, сопоставленные в настоящей работе ряды соединений, содержащих по одному (монопроизводные) или два (биспроизводные) способных к активной флуоресценции бензимидазольных либо индольных фрагмента, различались не столько самими значениями спектральных и комплексообразующих параметров ( $\Phi$ ,  $\eta$ ,  $H/X$ ,  $K$ ,  $n$ ), сколько их совокупностью и характером их взаимозависимостей. Наиболее показательными в этом отношении оказались зависимости между величиной коэффициентов флуоресцентной чувствительности ( $\eta$ ) соединений (I)–(X) по отношению к ДНК и значениями параметров комплексообразования  $K$  и  $n$ , рассчитанными по модели Скэтчарда (см. рис. 4г, 4д).

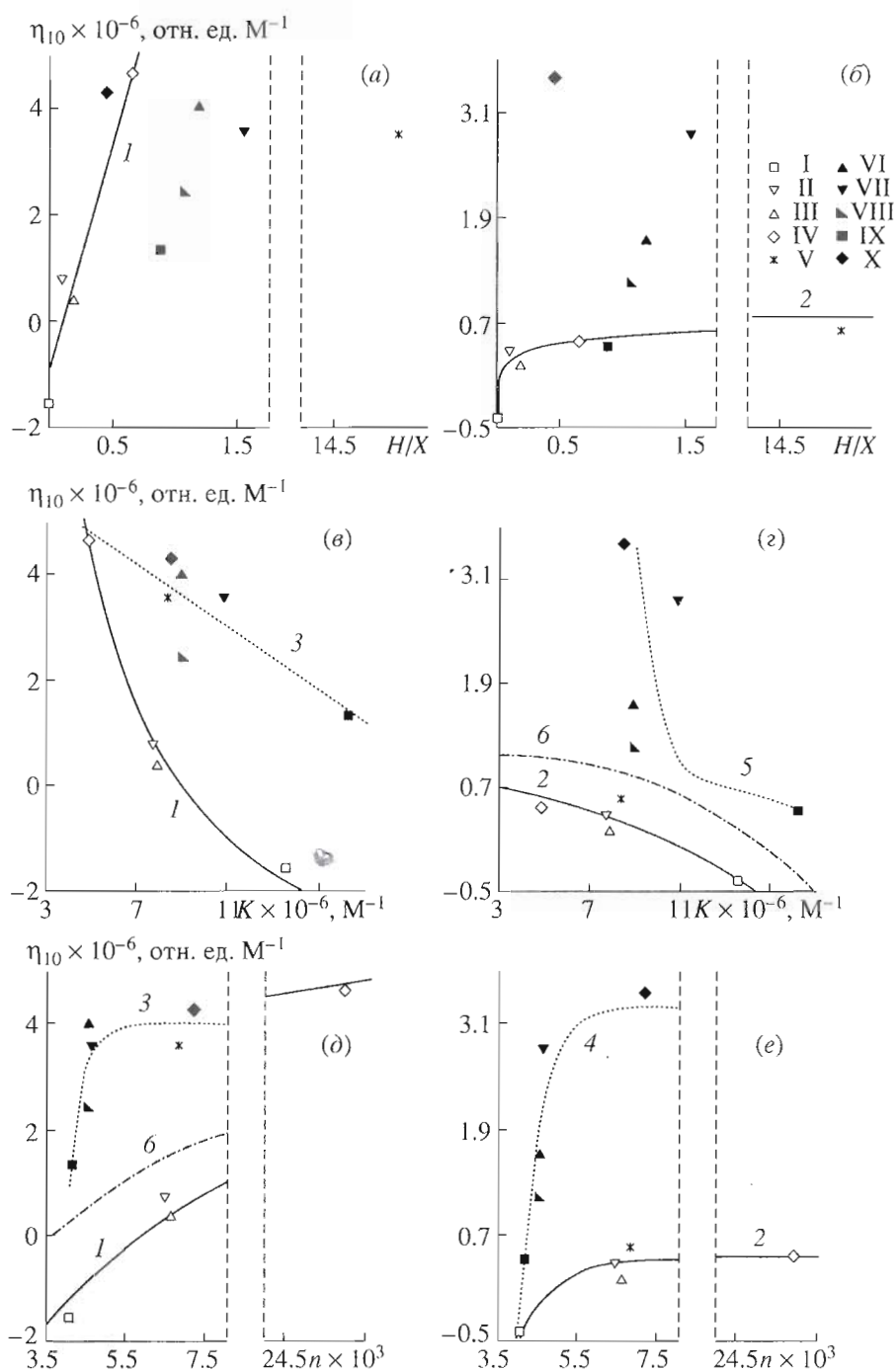
Следует отметить, что соединение (V) монофенилиндольного ряда по совокупности ряда своих спектральных и комплексообразующих характеристик занимает промежуточное положение между группами моно- и биспроизводных, очевидно вследствие наличия в составе его молекулы трех гетероциклов, входящих в единую сопряженную систему. Это весьма отчетливо прослеживается на рис. 4в–4е. Так, если при соотношении молярных концентраций в системе  $C_D/C_L$  равно 10 значения  $\eta$ ,  $K$  и  $n$  соединения (V) были ближе к кривой, характерной для биспроизводных (VI)–(X), то при  $C_D/C_L$  равно 100 значения данных параметров были ближе к кривой, характерной для монопроизводных (I)–(IV).

Кроме того, особо следует отметить наличие однозначной для всех десяти исследованных соединений статистически достоверной зависимости между величиной константы Скэтчарда ( $K$ ) и числом потенциальных мест связывания в расчете на один нуклеотид ( $n$ ):  $K = an$  или (более достоверно)  $K = b + cn^2$  (где  $a$ ,  $b$  и  $c$  – соответствующие эмпирические константы) (см. рис. 2а).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Коммерческие флуорофоры (IV)–(VII) (DAPI, DAPI, Hoechst-33258 и Hoechst-33342, соответственно) были получены от фирмы Serva (Германия). Соединения (I)–(III) и (VIII)–(X) синтезированы на кафедрах органической химии и молекулярной биотехнологии Санкт-Петербургского государственного технологического института по методикам, описанным в работах [31–33].

В качестве субстрата использовалась ДНК тимуса теленка (58% А · Т-пар; средняя молекулярная масса на один нуклеотид 326 Да, молярный коэффициент поглощения  $\epsilon_{260} 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), приготавливаемая путем растворения сухого препарата, полученного от фирмы Serva (Германия), в дистиллированной воде и обрабатываемая затем (для гомогенизации и уменьшения светорассеяния)



**Рис. 4.** Зависимость коэффициентов флуоресцентной чувствительности  $\eta_{10}$  и  $\eta_{100}$  красителей (I)–(X) от параметров их комплексообразования с ДНК:  $H/X$  (a, б),  $K$  (в, з) и  $n$  (д, е).  
 Условные обозначения для точек те же, что и на рис. 3. Кривой 1 показаны достоверные для соединений (I)–(IV) зависимости вида:  $\eta_{10} = -9.67 \times 10^5 + 8.60 \times 10^6 H/X$ ,  $R = 0.969$ ,  $p < 0.05$  (a),  $\eta_{10} = -5.38 \times 10^6 + 4.83 \times 10^{13}/K$ ,  $R = 0.994$ ,  $p < 0.01$  (в) и  $\eta_{10} = -5.73 \times 10^6 + 3.23 \times 10^6 \ln(1000n)$ ,  $R = 0.992$ ,  $p < 0.01$  (д); кривой 2 показаны достоверные для соединений (I)–(V) зависимости вида:  $\eta_{100} = 5.49 \times 10^5 + 1.21 \times 10^5 \ln(H/X)$ ,  $R = 0.966$ ,  $p < 0.05$  (б),  $\eta_{100} = 7.31 \times 10^5 - 5.80 \times 10^{-9} K^2$ ,  $R = -0.911$ ,  $p < 0.05$  (з) и  $\eta_{100} = 4.78 \times 10^5 - 5.06 \times 10^7 \exp(-1000n)$ ,  $R = -0.949$ ,  $p < 0.05$  (е); кривой 3 показаны достоверные для соединений (V)–(X) зависимости вида:  $\eta_{10} = 6.31 \times 10^6 - 0.30K$ ,  $R = -0.815$ ,  $p < 0.05$  (в) и  $\eta_{10} = 4.02 \times 10^6 - 6.67 \times 10^{11} \exp(-3000n)$ ,  $R = -0.854$ ,  $p < 0.05$  (д); кривой 4 показана достоверная для соединений (VI)–(X) зависимость вида:  $\eta_{100} = 3.35 \times 10^6 - 1.25 \times 10^{10} \exp(-2000n)$ ,  $R = -0.883$ ,  $p < 0.05$  (е); кривой 5 показана зависимость, полученная после сглаживания данных для соединений (VI)–(X) (з); кривой 6 показана граница между областями, где располагаются значения параметров моно- и биспроизводных (з, д).



ультразвуком на аппарате УЗДН-2 (Россия) в течение 15 с при силе тока 0.3 А на резонансной частоте 22 кГц, после чего средняя масса молекулы ДНК составляла 3500 Да.

Титрование проводили при постоянной концентрации красителя  $C_i$   $6.42 \times 10^{-7}$  М и различных концентрациях полинуклеотида (в диапазоне соотношений  $C_D/C_L$  100 – 200) при температуре 20–25°C в буфере следующего состава: 0.01 М NaCl, 0.01 М  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  и 0.01 М Трис (рН 7.4).

Флуоресценцию проб анализировали на спектрофлуориметре фирмы Hitachi (Япония), model 850 (при этом устанавливали щели монохроматоров возбуждения и эмиссии по 5 нм, 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 возбуждения исследуемого соединения в видимой области спектра (см. таблицу).

Квантовые выходы флуоресценции ( $\phi$ ) красителей определяли относительным методом с использованием в качестве стандарта раствора сульфата хинина в 1 М серной кислоте ( $\phi$  0.55). Коэффициенты чувствительности ( $\eta_s$ ) вычислялись по формуле:

$$\eta_s = (I_{k+1} - I_{k-1})/2C_L, \quad (11)$$

где  $I_{k+1}$  и  $I_{k-1}$  – интенсивности флуоресценции красителя (в отн.ед.) при соотношениях молярных концентраций  $C_D/C_L$  равных  $k+1$  и  $k-1$ . Величины  $H$  и  $X$  соединений (I)–(X) определялись как описано в работе [30].

Коэффициент парной корреляции для функций вида  $Y = a_0 + a_1 f(X)$  рассчитывался по формуле [28]:

$$R = \frac{\sum(y_i z_i) - (\sum y_i \sum z_i)/Q}{\sqrt{\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2/Q} \times \sqrt{\sum z_i^2 - (\sum z_i)^2/Q}}, \quad (12)$$

где  $z = f(X)$ , а  $Q$  – количество соединений в выборке. Затем, он проверялся на достоверность по критерию:  $|R| > t_{\alpha}/\sqrt{t_{\alpha}^2 + Q - 2}$ , где  $t_{\alpha}$  – табличное значение критерия Стьюдента для уровня значимости “ $\alpha$ ” и числа степеней свободы “ $Q - 2$ ”.

Процедура порядковой корреляции по Спирмену [34] состояла в следующем: пусть известно, что в исследуемой выборке величина  $X_i$  занимает  $B_i$ , а величина  $Y_i - D_i$  место, тогда если

$$\sqrt{Q-1} [1 - 6/(Q^3 - Q)] \sum (B_i - D_i)^2 > u_{\alpha},$$

где  $u_{\alpha}$  – табличное значение функции Лапласа ( $u_{0.1}$  0.2533,  $u_{0.05}$  0.125,  $u_{0.01}$  0.025,  $u_{0.001}$  0.0025), то гипотеза о независимости параметров  $Y$  и  $X$  отвергается с уровнем значимости “ $\alpha$ ”.

Для построения кривых на рис. 1–4, в случае отсутствия статистически достоверных функциональ-

ных зависимостей между исследуемыми параметрами, использовалась, с некоторыми модификациями, процедура сглаживания экспериментальных данных глобальными кубическими  $\beta$ -сплайнами, описанная в работах [35, 36].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов С.Д., Кованько Е.Г., Ремизова И.В., Стефаненко Ф.А. // Радиобиологические подходы к диагностике лучевых поражений / Ред. Комар Е.В. Л.: ЛГИУВ, 1987. С. 69–75.
2. Иванов С.Д. Пострадиационные реакции ДНК нуклеотидов лейкоцитов крови. Детектирование, закономерности, диагностическое и прогностическое значение. Дис. ... докт. биол. наук. Л.: ЦНИРРИ, 1992. 306 с.
3. Monger B.C., Landry M.R. // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. P. 905–911.
4. Nel D., Cooper R., Martin R.F. / Abstr. Intern. Congr. Radiation Research 1895–1995. Wurzburg, 1995. V. 1. P. 199.
5. Nievergelt-Egido M.C., Weinreich R., Larsson B. / Abstr. Intern. Congr. Radiation Research 1895–1995. Wurzburg, 1995. V. 1. P. 429.
6. Pjura P.E., Grzeskowiuk K., Dickerson R.E. // J. Mol. Biol. 1987. V. 197. P. 257–271.
7. Wilson F.W., Tanious A.T., Barton H.J., Jones P.L., Fox K., Wydra R.L., Strekowski L. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 8452–8461.
8. Martin R.F., Denison L. // Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 1992. V. 23. P. 579–584.
9. Колосова О.Ю. Флуоресцентные ДНК-зонды в ряду бензимидазолов. Дис. ... канд. хим. наук. Л.: ЛТИ им. Ленсовета, 1991. 159 с.
10. Morgan A.R., Lee J.S., Pulleyblank D.E., Murray N.L., Evans D.H. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. P. 547–571.
11. Заседателев А.С., Гурский Г.В., Волькенштейн М.В. // Молекул. биология. 1971. Т. 5. С. 245–251.
12. Scatchard G. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1949. V. 51. P. 660–672.
13. Рослов А.А. Исследование специфичных лигандов ДНК бензимидазольного ряда. Дис. ... канд. хим. наук. Л.: ЛТИ им. Ленсовета, 1989. 142 с.
14. Борисова О.Ф., Голова Ю.Б., Готтих Б.П., Зибров А.С., Ильичева И.А., Лысов Ю.П., Мамаева О.К., Чернов Б.К., Черный А.А., Щелкина А.К., Флорентьев В.Л. // Молекул. биология. 1989. Т. 23. С. 1535–1552.
15. Борисова О.Ф., Щелкина А.К., Каранетян А.Т., Суровая А.Н. // Молекул. биология. 1998. Т. 32. С. 855–862.
16. Crothers D.M. // Biopolymers. 1968. V. 6. P. 575–584.
17. Гурский Г.В., Заседателев А.С., Волькенштейн М.В. // Молекул. биология. 1972. Т. 6. С. 479–490.
18. McGhee J.D., van Hippel P.H. // J. Mol. Biol. 1974. V. 86. P. 469–489.
19. Hogan M., Dattagupta N., Crothers D.M. // Nature. 1979. V. 278. P. 521–524.

20. Dattagupta N., Hogan M., Crothers D.M. // *Biochemistry*. 1980. V. 19. P. 5998–6005.
21. Zimmer C., Wahnert U. // *Progr. Biophys. Molec. Biol.* 1986. V. 47. P. 31–112.
22. Eriksson S., Kim S.K., Kubista M., Norden B. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 2987–2998.
23. Нечипуренко Ю.Д., Заседателев А.С., Гурский Г.В. // *Молекул. биология*. 1984. Т. 18. С. 798–812.
24. Круглова Е.Б., Зиненко Т.Л. // *Молекул. биология*. 1993. Т. 27. С. 655–665.
25. Гарабаджиу А.В. Производные бензимидазола – комплексоны ДНК. Дис. ... докт. хим. наук. СПб.: СПбГТИ (ТУ), 1994. 286 с.
26. Barcellona M.L., Favilla R., von Berger J., Avitahile M., Ragusa N., Masotti L. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1986. V. 250. P. 48–53.
27. Сибирицев В.С., Гарабаджиу А.В., Иванов С.Д. // *Биоорган. химия*. 1994. Т. 20. С. 650–668.
28. Дубров А.М., Мхатарян В.С., Трошин Л.И., Масленченко И.В. Математико-статистический анализ на программируемых микрокалькуляторах. М.: Финансы и статистика, 1991. 176 с.
29. Сибирицев В.С., Гарабаджиу А.В., Иванов С.Д. // *Биоорган. химия*. 1995. Т. 21. С. 731–736.
30. Сибирицев В.С., Гарабаджиу А.В., Иванов С.Д. // *Биоорган. химия*. 1997. Т. 23. С. 969–978.
31. 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.-фарм. журн.* 1990. Т. 24. С. 31–33.
32. Preston I., De Winter W., Hofferbert W.I. // *J. Heterocycl. Chem.* 1969. V. 6. P. 119–121.
33. Склярова И.В., Кузнецов В.А., Соколова Н.Ю., Гарабаджиу А.В., Гинзбург А.В., Добрынин Я.В., Николаева Т.Г., Финько В.Е. // *Хим.-фарм. журн.* 1989. Т. 22. С. 697–699.
34. Ammeraal L. *Programming Principles in Computer Graphics*. N.Y.: John Wiley and Sons, 1986. V. 218.
35. Шикин Е.В., Боресков А.В., Зайцев А.А. *Начала компьютерной графики*. М.: Диалог-МИФИ, 1993. С. 138.
36. Korn G.A., Korn T.M. *Mathematical Handbook for Scientists and Engineers. Definitions, Theorems and Formulas for Reference and Review*. N.Y.: McGraw-Hill Book Company, 1968. P. 836.

## Comparative Study of DNA-specific Dyes of the Indole and Benzimidazole Series

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

\*Central Research Institute of Roentgenology and Radiology, Russian Ministry of Public Health,  
Leningradskaya ul., 70/4, Pesochny-2, St. Petersburg, 189646 Russia

\*\*St. Petersburg State Technological Institute, St. Petersburg, Russia

Various models of complex formation of low-molecular ligands with DNA are considered. Using the Scatchard model, parameters of binding of fluorescent monophenylindole, monophenylbenzimidazole, and bisbenzimidazole dyes with calf thymus DNA were evaluated. By means of graphic (nonparametric) and correlation analysis, various spectral and complexation properties of these dyes in the presence of DNA are compared.

*Key words:* DNA, complex formation, benzimidazoles, phenylindoles

# To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (812) 596-6703, 599-5573.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.