

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ИНСТИТУТ ХИМИИ РАСТВОРОВ

УСПЕХИ ХИМИИ ПОРФИРИНОВ

Том 2

Ответственный редактор
доктор химических наук, профессор
О. А. Голубчиков

Санкт-Петербург
НИИ химии СПбГУ
1999

КОМПЛЕКСЫ ПОРФИРИНОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ ТИПА ГОСТЬ-ХОЗЯИН: КАНАЛЫ ДЕЗАКТИВАЦИИ ЭНЕРГИИ ЭЛЕКТРОННОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ ПОРФИРИНОВ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МОЛЕКУЛЯРНЫМ КИСЛОРОДОМ

Б. М. Джагаров¹, Н. Н. Крук¹, В. С. Чирвоный¹,
В. А. Галиевский¹, П.-И. Турпен²

¹Институт молекулярной и атомной физики НАНБ, Минск, Беларусь,

²Университет им. Пьера и Марии Кюри, Париж, Франция

ВВЕДЕНИЕ

Способность водорастворимых катионных порфиринов к ассоциации с нуклеиновыми кислотами, высокая эффективность фотосенсибилизированного образования синглетного молекулярного кислорода, возможность взаимодействий с переносом заряда между порфиринами и нуклеиновыми кислотами в составе комплекса, а также то, что нуклеиновые кислоты являются одной из вероятных мишеней при фотодинамическом воздействии на клетку, обусловили многочисленные исследования взаимодействия водорастворимых катионных порфиринов с ДНК, поли-, олиго- и мононуклеотидами. Образование комплекса между порфирином и ДНК обнаружено в 1979 г. Филом с соавт. [1], которые показали, что катионный 5,10,15,20-тетракис(4-*N*-метилпиридил)-порфирин взаимодействует с ДНК посредством встраивания между парами нуклеотидов (интеркалирует). Для исследования этого явления применялись различные методы: абсорбционная и ИК-спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма, РКР (в УФ и видимом диапазонах), флуоресценция, методы ЯМР и ЭПР, квантово-химические расчеты и др. В результате за неполные 20 лет достигнут значительный прогресс в изучении комплексообразования порфиринов с ДНК [1 - 32].

Установлено, что природа образующегося комплекса зависит, с одной стороны, от состава и последовательности нуклеотидов в двойной спирали ДНК, которые определяют возможные типы сайтов для образования комплексов, с другой стороны, от строения и свойств порфирина [наличие периферических заместителей, природа иона металла (в случае мегаллокомплексов порфиринов), которая определяет присутствие аксиальных лигандов] и, наконец, от соотношения концентраций порфирина и пар оснований ДНК. Структура, стабильность и свойства комплексов также подвержены влиянию внешних условий: температуры, величины pH и ионной силы раствора.

Принято считать, что существует два основных типа образования комплексов: интеркаляция, когда порфирин встраивается между парами оснований так, что плоскость порфиринового макроцикла перпендикулярна оси двойной спирали ДНК, и внешнее связывание, когда молекула порфирина фиксируется на поверхности спирали ДНК в большой или малой бороздках за счет электростатических взаимодействий по-

ложительно заряженных периферических заместителей с отрицательно заряженным сахаро-фосфатным остовом ДНК. Первый тип комплекса характерен для участков ДНК, насыщенных парами нуклеотидов GC и CG, а также для содержащих эти нуклеотиды синтетических полимеров. Молекула порфирина, чтобы интеркалировать, должна быть или свободным основанием, или металлокомплексом без аксиальных лигандов, а также не должна иметь объемных периферических заместителей или заместителей, которые могут создавать стерические затруднения для встраивания и препятствовать проникновению молекулы порфирина между парами оснований ДНК. Второй тип комплекса отмечается преимущественно для участков ДНК, насыщенных AT- и TA-парами нуклеотидов и синтетических полимеров соответствующего строения. Для молекулы порфирина, чтобы образовать комплекс в данных сайтах, не имеется столь жестких требований, как в случае интеркаляции. В случае металлокомплексов с аксиальными лигандами (H_2O) и порфиринов-лигандов с объемными или жестко фиксированными периферическими заместителями комплексообразование с ДНК происходит, как правило, в данных сайтах. При высоком соотношении концентраций порфиринов и пар оснований ДНК возможна сборка на матрице ДНК упорядоченных порфириновых агрегатов.

Ассоциация порфиринов с ДНК приводит к существенным изменениям спектральных характеристик как порфирина, так и ДНК. Для порфиринов в составе комплексов наиболее характерными изменениями являются сдвиг полосы Soret в область больших длин волн, который сопровождается гипохромными или гиперхромными эффектами (т. е. уменьшением или увеличением коэффициента экстинкции), а также индуктирование полос в спектрах кругового дихроизма в области полосы Soret. Для интеркалированных порфиринов характерны большой красный сдвиг максимума полосы Soret (≥ 15 нм) и существенный гипохромизм (≥ 35 %), а также отрицательная индуцированная полоса в спектре КД. Для случая внешнего связывания красный сдвиг полосы Soret имеет существенно меньшую величину (≤ 8 нм), для нее наблюдается небольшой гипохромизм (≤ 10 %) или гиперхромизм, а индуцированная полоса в спектре КД порфирина имеет положительный знак.

Фоторазрушение ДНК в присутствии различных водорастворимых порфиринов описано в работах [33 - 37]. При этом отмечается, что катионным порфиринам присуща более высокая фотодинамическая активность, которая, вероятно, обусловлена их способностью к образованию комплексов с ДНК. В то же время авторы расходятся во мнении о механизмах сенсibilизированных порфиринами фотохимических реакций, приводящих к повреждению ДНК. Ряд данных указывает на то, что повреждение ДНК происходит под действием синглетного молекулярного кислорода $^1\Delta_g$, образование которого опосредовано порфиринами (фотореакции типа II), в то время как другие эксперименты позволяют утверждать, что фотовозбужденный порфирин непосредственно взаимодействует с субстратом и переводит его в свободнорадикальное состояние (фотореакции типа I), или оба механизма работают одновременно. Противоречие обусловлено отсутствием прямых данных об эффективности фотосенсibilизированного образования синглетного молекулярного кислорода порфиринами в составе комплексов с нуклеиновыми кислотами, а также тем, что механизмы первичных фото процессов в порфиринах, ассоциированных с нуклеиновыми кислотами, практически не изучены.

Для установления механизма(ов) фотодинамического действия катионных порфиринов в составе комплексов необходимы исследования фотофизических и фотохимических характеристик порфиринов в данных системах, которые до настоящего времени не проводились. В качестве объекта исследования нами выбран водорастворимый катионный 5,10,15,20-тетракис(4-N-метилпиридил)порфирин, который обладает наибольшей фотодинамической активностью среди катионных порфиринов [38 - 40]. Це-

лью работы было изучение фотофизических характеристик молекул порфирина в комплексах с ДНК и полинуклеотидами, исследование процессов тушения возбужденных триплетных состояний порфиринов молекулярным кислородом, а также фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода $^1\Delta_g$ с помощью развитого в Институте молекулярной и атомной физики НАН Беларуси метода его прямой регистрации по фосфоресценции в ИК-диапазоне [41, 42].

Данная работа обобщает результаты исследований последних трех лет, проведенных в лаборатории фотоники молекул Института молекулярной и атомной физики Национальной Академии наук Беларуси (Минск) в сотрудничестве с лабораторией биомолекулярной и клеточной физической химии Университета им. Пьера и Марии Кюри (Париж).

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Водорастворимый катионный 5,10,15,20-тетракис(4-*N*-метилпиридил)порфирин (H_2TMPyP^{4+}) в виде тозилатовой соли получен от Aldrich. Нативная ДНК из тимуса теленка, синтетические [поли(dA-dT)]₂ и [поли(dG-dC)]₂ полинуклеотиды получены от Sigma Chemical, гексадезоксирибонуклеотиды [d(TACGTA)]₂ и [d(TAGCTA)]₂ синтезированы компанией Genosys, Co. Все соединения использованы без дополнительной очистки. Для изучения фотофизических характеристик порфиринов в составе комплексов образцы готовили в фосфатном буфере (рН = 7,0, ионная сила 0,1 М), которые обескислороживались продувкой гелием в течение 20 мин непосредственно перед измерениями. Тушение возбужденных триплетных состояний порфиринов молекулярным кислородом и фотосенсибилизированное образование синглетного кислорода исследовали для образцов, приготовленных в дейтерированном фосфатном буфере (рD = 7,0, ионная сила 0,1 М) при атмосферном давлении. Концентрации порфиринов и нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически с использованием известных коэффициентов экстинкции, они составляли соответственно $2 \cdot 10^{-5}$ М и $1,2 \cdot 10^{-3}$ М (в динуклеотидах). Все измерения выполнены при температуре 293 К.

Фотофизические характеристики порфиринов, константы скорости тушения возбужденных триплетных состояний молекулярным кислородом, а также квантовые выходы фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода определены по известным методикам. Данные методики и характеристики использованного экспериментального оборудования и реактивов подробно описаны в работах [27, 28, 31, 32].

СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА H_2TMPyP^{4+} В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСОВ С ДНК, [ПОЛИ(dA-dT)]₂ И [ПОЛИ(dG-dC)]₂

Спектры поглощения и флуоресценции

Спектры поглощения и флуоресценции H_2TMPyP^{4+} при образовании комплексов с ДНК, [поли(dA-dT)]₂ и [поли(dG-dC)]₂ испытывают существенные изменения. Как видно из рис. 1А, на котором представлены спектры поглощения H_2TMPyP^{4+} в области полосы Sore, природа образующихся комплексов различна. Молекулы H_2TMPyP^{4+} интеркалируют между парами оснований в [поли(dG-dC)]₂, о чем свидетельствует большой красный сдвиг полосы Sore и сильный гипохромизм (41 %). Комплекс с [поли(dA-dT)]₂ образуется посредством внешнего встраивания, что приводит к существенно меньшему красному сдвигу полосы Sore и небольшой величине гипохромизма (15 %). В случае взаимодействия H_2TMPyP^{4+} с ДНК образуются комплексы как той, так и дру-

гой природы. на что указывает несимметричная и существенно уширенная форма полосы Sore. Полученные результаты находятся в соответствии с данными по строению комплексов, полученными другими методами.

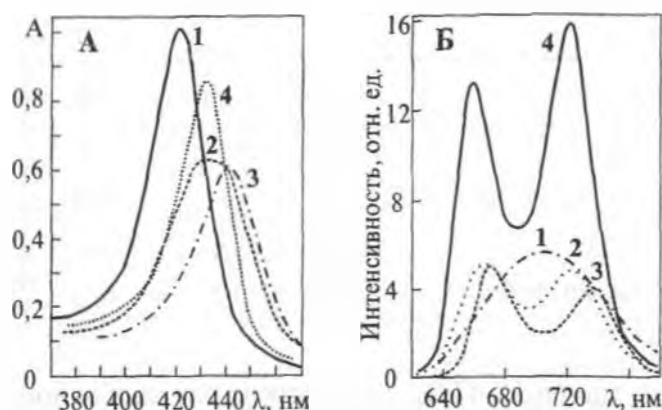


Рис. 1. Спектры поглощения H_2TMPyP^{4+} в области полосы Sore (А) и спектры флуоресценции (Б): в водном растворе — 1 и в комплексах с ДНК — 2, [поли(dG-dC)]₂ — 3, [поли(dA-dT)]₂ — 4. Спектры флуоресценции зарегистрированы при $\lambda_{возб} = 520$ нм

ется для комплекса с [поли(dA-dT)]₂, а в составе ассоциата с [поли(dG-dC)]₂ флуоресценция порфирина тушится.

Спектр флуоресценции H_2TMPyP^{4+} в комплексе с [поли(dA-dT)]₂ близок к спектру, зарегистрированному для H_2TMPyP^{4+} в метаноле, поэтому было предположено, что причина спектральных изменений заключается в пониженной по сравнению с водой локальной полярности в местах связывания порфиринов [7]. Подобная трансформация спектров обнаружена также для комплекса H_2TMPyP^{4+} с дезоксимононуклеотидами dAMP, dTMP, dCMP в работе [26], авторы которой также предполагают, что это обусловлено изменением диэлектрической проницаемости микроокружения порфирина вследствие понижения доступа воды к π -орбиталям порфирина. Тушение флуоресценции красителей, способных к интеркаляции в [поли(dG-dC)]₂, хорошо известно [7] и объясняется окислительно-восстановительными взаимодействиями между молекулой красителя в возбужденном состоянии и гуанином. Подобное объяснение было предложено нами и для комплекса H_2TMPyP^{4+} с [поли(dG-dC)]₂ [27].

Каналы дезактивации энергии электронного возбуждения

Фотофизические характеристики H_2TMPyP^{4+} в комплексах с ДНК и полинуклеотидами приведены в табл. 1. Анализ представленных данных показывает, что способ релаксации энергии электронного возбуждения порфирина определяется свойствами его микроокружения, т. е. характеристиками сайтов связывания.

Прежде всего следует отметить, что для свободного порфирина в водном растворе сумма квантовых выходов образования триплетного состояния и флуоресценции $\Phi_T + \Phi_{fl}$ составляет ~0,9 [27]. Эта величина, хотя и очень близка к 1,0 (с учетом ошибки измерений), тем не менее позволяет предполагать, что в полярном окружении порфирин имеет низколежащий внутримолекулярный уровень с переносом заряда, соответствующий миграции электрона от порфиринового макроцикла на пиридильные заместители [43]. Уровень с переносом заряда (ПЗ-уровень) лежит на ~0,1 эВ выше S_1 -состояния [43]. Это может привести к смешиванию ПЗ- и S_1 -состояний и, как следствие, к

появлению нового канала безызлучательной $S_1 \rightsquigarrow S_0$ дезактивации (внутренней конверсии) с квантовым выходом $\Phi_{\text{вк}} \sim 0,1$.

Таблица 1. Фотофизические свойства молекул $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в водном растворе и в составе комплексов с ДНК, $[\text{поли}(\text{dA-dT})]_2$ и $[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$.

Образец	$\Phi_{\text{фл}}$	$\tau_{\text{фл}}$, нс	Φ_{T}	τ_{T} , мс	$\Phi_{\text{вк}}$
Водный буфер	0,044	4,6	0,85	0,17	0,1
ДНК	0,041	2,5 (50 %), 11,0 (50 %)	0,77	—	0,19
$[\text{поли}(\text{dA-dT})]_2$	0,085	12,0	0,95	1,6	отс.
$[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$	0,027	2,5 (70 %), 7,0 (30 %)	0,44	1,3	0,53

В составе комплекса $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ с $[\text{поли}(\text{dA-dT})]_2$, также как и для свободного порфирина в растворе, большая часть молекул $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ релаксирует с уровня S_1 через триплетное состояние ($\Phi_{\text{T}} = 0,95$). Сумма $\Phi_{\text{T}} + \Phi_{\text{фл}}$ в данном случае равна единице в пределах точности измерений. Это означает, что внутренняя конверсия $S_1 \rightsquigarrow S_0$ практически не принимает участия в дезактивации уровня S_1 . Вероятно, в данном случае локальная полярность в местах связывания порфирина ниже, чем в воде, что приводит к увеличению энергии ПЗ-состояния. В результате величина смешивания ПЗ- и S_1 -состояний уменьшается, и вероятность внутренней конверсии $S_1 \rightsquigarrow S_0$ становится пренебрежимо малой.

Поведение $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в комплексе с $[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$ существенно отличается от предыдущих двух случаев. Во-первых, квантовый выход образования триплетного состояния Φ_{T} для этого комплекса составляет всего 0,44. Во-вторых, квантовый выход флуоресценции $\Phi_{\text{фл}} = 0,027$, что примерно в 3 раза меньше, чем для комплекса с $[\text{поли}(\text{dA-dT})]_2$ ($\Phi_{\text{фл}} = 0,085$). Можно предположить, что дезактивация уровня S_1 в значительной мере обусловлена внутренней конверсией $S_1 \rightsquigarrow S_0$ с квантовым выходом $\Phi_{\text{вк}}$, примерно равным 0,5 ($\Phi_{\text{вк}} = 1 - \Phi_{\text{T}} - \Phi_{\text{фл}}$).

Появление нового канала безызлучательной дезактивации состояния S_1 должно привести к сокращению длительности флуоресценции (табл. 1). Кинетика затухания флуоресценции для комплекса $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ – $[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$ оказалась двухэкспоненциальной, однако время жизни флуоресценции каждого из двух компонентов (2,5 и 7,0 нс) значительно меньше, чем для комплекса с $[\text{поли}(\text{dA-dT})]_2$ (12,0 нс). Таким образом, в данном случае реализуется новый канал безызлучательной дезактивации S_1 -состояния, который успешно конкурирует с заселением триплетного состояния, которое не тушит-ся, на что указывает удлинение времени жизни триплетного состояния по сравнению с водным раствором до 1,3 мс. Что же касается двухэкспоненциальности кинетики затухания флуоресценции, то это может быть вызвано различной эффективностью тушения, т. е. существованием двух групп интеркалированных молекул, для которых эффективность внутренней конверсии различна, если она вообще имеет место для компонента с временем затухания флуоресценции 7,0 нс.

Ассоциаты $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ с ДНК гетерогенны, в GC-сайтах ДНК молекулы порфирина образуют комплекс посредством интеркаляции, в AT-сайтах формируются внешне связанные комплексы. Таким образом, фотофизические характеристики $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в комплексе с ДНК представляют собой величины, усредненные по двум типам связывания, а в кинетике флуоресценции присутствуют компоненты, соответствующие различным типам комплексов.

**Возможный механизм безызлучательной дезактивации
 $S_1 \sim \sim \sim \rightarrow S_0$ в комплексе $H_2TMPyP^{4+} - [поли(dG-dC)]_2$**

Рассмотрим возможный механизм дезактивации $S_1 \sim \sim \sim \rightarrow S_0$ в молекулах H_2TMPyP^{4+} , ассоциированных с $[поли(dG-dC)]_2$. Тушение S_1 -состояния порфирина за счет переноса энергии по механизму Ферстера на основания ДНК невозможно, так как не выполняются необходимые условия перекрытия спектров испускания донора и поглощения акцептора. Нуклеотиды не содержат тяжелых атомов, поэтому тушение посредством внешнего тяжелого атома также исключается. Очевидно, что необходимо рассмотреть взаимодействия с переносом заряда, которые могут протекать между молекулой порфирина в возбужденном состоянии (P^*) и нуклеотидами (N) по реакции $P^* + N \rightarrow P^{\cdot(+/-)} + N^{\cdot(-/+)}$. Изменение стандартной свободной энергии $\Delta G^0_{ПЗ}$ при образовании пары ионных радикалов, разделенных раствором, описывается уравнением Рема-Феллера (1а,б) [44]. Так как заранее неизвестно, является ли порфирин в данной реакции акцептором (1а) либо донором (1б), необходимо рассматривать обе возможности. Нуклеотид восстанавливается:

$$\Delta G^0_{ПЗ} = e [E_0(P^+/P) - E_0(N/N^{\cdot-})] - E_{0,0}(P) + \Delta G^0(e) \quad (1a)$$

Нуклеотид окисляется:

$$\Delta G^0_{ПЗ} = e [E_0(N^+/N) - E_0(P/P^{\cdot-})] - E_{0,0}(P) + \Delta G^0(e), \quad (1б)$$

где $E_0(P^+/P)$, $E_0(P/P^{\cdot-})$ и $E_0(N^+/N)$, $E_0(N/N^{\cdot-})$ – одноэлектронные окислительно-восстановительные потенциалы порфирина и нуклеотидов соответственно, $E_{0,0}(P)$ – энергия 0-0-перехода порфирина, $\Delta G^0(e)$ – поправка, учитывающая энергию взаимодействия двух ионных радикалов и энергию гидратации ионов водой, принятая равной -0,1 эВ [45].

Нами не зафиксированы какие-либо радикальные продукты реакции, что свидетельствует о коротком времени жизни радикальной пары (по крайней мере меньше времени разрешения системы флеш-фотолиза – 30 нс) и что фотоиндуцированная ион-радикальная пара исчезает за счет быстрой обратимой реакции переноса электрона. В данном случае не образуется разделенная растворителем ион-радикальная пара и, следовательно, член $\Delta G^0(e)$ может не учитываться. При осуществлении такой быстрой и полностью обратимой реакции переноса заряда более правильно описывать процесс тушения состояния S_1 посредством заселения межмолекулярного ПЗ-уровня, лежащего ниже состояния S_1 . Этот ПЗ-уровень должен находиться между уровнями S_1 и T_1 , поскольку уровень T_1 , как указывалось выше, не подвержен тушению.

Окислительно-восстановительные потенциалы, определенные относительно водородного электрода, равны: для гуанина $E_0(N^+/N) = 1,47$ В, $E_0(N/N^{\cdot-}) \leq -2,74$ В; для цитозина $E_0(N^+/N) = 2,12$ В, $E_0(N/N^{\cdot-}) = -2,23$ В [45]; для H_2TMPyP^{4+} $E_0(P^+/P) > 1,54$ В; $E_0(P/P^{\cdot-}) = -0,31$ В [46]. Анализ этих данных показывает, что при $E_{0,0} = 1,84$ эВ, только для пары (гуанин) $^{\cdot+}$ - (P) $^{\cdot-}$ наблюдается небольшое отрицательное значение $\Delta G^0_{ПЗ}$, указывающее на то, что межмолекулярный уровень ПЗ будет лежать ниже состояния S_1 . Большие потенциалы окисления для других оснований (1,94 В для аденина, 2,09 В для тимина, 2,12 В для цитозина и $\geq 2,37$ В для урацила [45]) исключают любую другую возможность переноса электрона между основаниями и H_2TMPyP^{4+} в возбужденном состоянии S_1 . Таким образом, тушение S_1 -состояния H_2TMPyP^{4+} в комплексе с $[поли(dG-dC)]_2$ происходит вследствие межмолекулярных перенос-зарядовых взаимодействий с гуанином. Следует отметить, что такой же механизм был предложен позднее для тушения возбужденного состояния S_1 посредством H_2TMPyP^{4+} в комплексе с dGMP [26].

ЛОКАЛЬНАЯ ПОЛЯРНОСТЬ В САЙТАХ СВЯЗЫВАНИЯ H_2TMPyP^{4+} В ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК

**Использование H_2TMPyP^{4+} в качестве флуоресцентного зонда
для определения локальной полярности в сайтах связывания**

Для качественного объяснения ряда спектральных и фотофизических характеристик молекул H_2TMPyP^{4+} в составе комплексов с нуклеиновыми кислотами были привлечены представления об уменьшении локальной полярности в сайтах связывания [7, 26, 27]. Однако в данных работах рассмотрение носит качественный, феноменологический характер. Для детального анализа спектральных и фотофизических свойств молекул необходимо оценить полярность в соответствующих сайтах. Согласно Райхарду [47], полярность представляет собой обобщенную сольватационную способность среды, которая зависит от всех возможных взаимодействий между гостевой молекулой и средой, исключая те из них, которые приводят к ее химической модификации. Полярность растворителя (среды) в общем случае не может быть описана с помощью какой-либо одной физической величины. Наиболее широко применяются для определения полярности два подхода. Первый из них использует уравнение Липперта-Матаги, которое учитывает общие эффекты среды, заключающиеся во взаимодействии дипольных моментов флуорофоров с реактивными полями, индуцируемыми в окружающей среде [48, 49]. Второй использует эмпирическую шкалу полярности $E_T(30)$ [47, 50]. Нами были использованы оба подхода и проведен совместный анализ полученных результатов.

В качестве параметра, который использовался как маркер полярности микроокружения, был выбран стоксов сдвиг. В этом случае сдвиги спектров поглощения и флуоресценции при образовании комплексов, которые обусловлены возможными изменениями взаимного расположения плоскостей макроцикла порфирина и пиридинных заместителей (уменьшение двугранного угла между ними приводит к батохромному смещению спектров [14, 51]), вычитаются и величина стоксова сдвига отражает только изменение полярности микроокружения. Данный выбор обеспечил также возможность совместного анализа результатов, полученных при использовании обоих подходов, поскольку уравнение Липперта-Матаги рассматривает стоксов сдвиг как функцию диэлектрической проницаемости и показателя преломления среды:

$$\nu_n - \nu_{fn} = 2((\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1) - (n^2 - 1)/(2n^2 + 1))(\mu^* - \mu)^2/hca^3 + \text{const}, \quad (2)$$

где μ^* и μ – дипольные моменты молекулы в возбужденном и основном состояниях, a – радиус объема, занимаемого флуорофором, остальные величины имеют обычное значение. Поскольку член $(\mu^* - \mu)^2$ предполагается постоянным для данной молекулы, величина стоксова сдвига $\nu_n - \nu_{fn}$ (в см^{-1}) будет пропорциональна величине ориентационной полярности

$$\Delta f = (\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1) - (n^2 - 1)/(2n^2 + 1) \quad (3)$$

Таким образом, построив градуировочные кривые зависимости $\nu_n - \nu_{fn}$ от Δf и определив величину стоксова сдвига для молекул в окружении с неизвестной полярностью, можно определить его полярность. В случае использования шкалы $E_T(30)$ (применялась в нормированной форме E_TN) процедура определения полярности была такой же. Зависимости стоксова сдвига от Δf и E_TN , полученные для молекул H_2TMPyP^{4+} в смесях этиловый спирт–вода и в составе комплексов с [поли(dG-dC)]₂ и [поли(dA-dT)]₂, показаны на рис. 2.

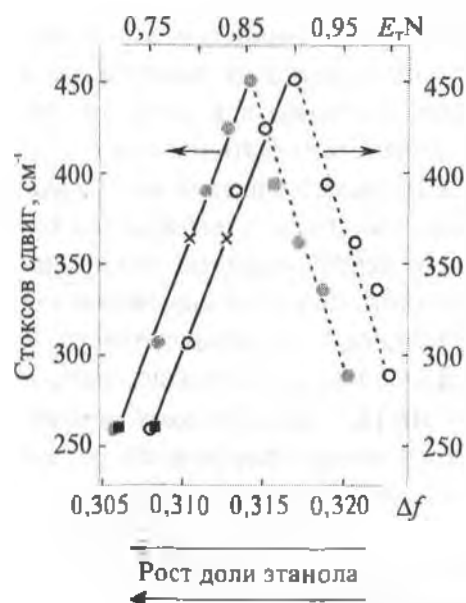


Рис. 2. Стоксов сдвиг как функция ориентационной поляризуемости Δf (●) и параметра полярности $E_T N$ (○) в смесях этанола с водой. Символы ■ и × соответствуют стоксовым сдвигам, измеренным для комплексов H_2TMPyR^{4+} с [поли(dA-dT)]₂ и [поли(dG-dC)]₂

Решенных полос. Очевидно, что величины стоксова сдвига, измеренные для H_2TMPyR^{4+} в комплексах с полинуклеотидами, находятся в области, где флуоресцирующее состояние имеет $\pi\pi^*$ -природу, т. е. в области, где стоксов сдвиг уменьшается с уменьшением полярности. Следует отметить, что соответствующие зависимости $\nu_n - \nu_{fl}$ для электроноколебательной $Q_x(0,1)$ -полосы имеют такой же ход и величины. Как Δf , так и $E_T N$, в обоих случаях совпадают в пределах погрешности определения величины $\nu_n - \nu_{fl}$ ($\pm 25 \text{ см}^{-1}$). Ориентационная поляризуемость для комплексов с [поли(dA-dT)]₂ и [поли(dG-dC)]₂ составляет соответственно $\leq 0,3065$ и $0,3099$. В выражении, определяющем ориентационную поляризуемость, член, зависящий от показателя преломления, имеет намного меньшее значение, чем член, определяемый величиной ϵ . Поэтому, положив величину показателя преломления микроокружения $n = 1,35$, получим значения эффективной диэлектрической проницаемости микроокружения $\epsilon_{эфф}$, соответственно, $\leq 55,5 \pm 2,5$ и $62,5 \pm 2,5$. Локальная полярность в сайтах связывания, определенная с помощью шкалы $E_T N$, для комплекса с [поли(dA-dT)]₂ не больше $0,76 \pm 0,03$, а для комплекса с [поли(dG-dC)]₂ равна $0,82 \pm 0,03$. В случае комплекса с [поли(dA-dT)]₂ дана лишь верхняя оценка величины, поскольку стоксов сдвиг при концентрациях этанола более 50 % по объему в пределах погрешности измерений остается неизменным.

Из приведенных данных следует, что локальная полярность сайтов в [поли(dA-dT)]₂ ниже, чем в местах интеркаляции порфирина в [поли(dG-dC)]₂. При этом измеренные значения полярности существенно ниже, чем для воды ($\epsilon = 80$, $E_T N = 1$). Полученные значения находятся в хорошем соответствии с тенденцией изменения формы спектра флуоресценции H_2TMPyR^{4+} от широкой бесструктурной полосы в воде к четкому двухполосному спектру в водно-этанольных смесях и в составе комплексов.

Более низкая величина локальной полярности, полученная для комплекса с [поли(dA-dT)]₂, на первый взгляд, выглядит удивительной. Очевидно, что для сайтов,

На зависимостях отчетливо видны два участка: при увеличении доли этилового спирта в растворе до 20 % по объему (на рисунке справа налево) стоксов сдвиг увеличивается, а затем уменьшается. Такое поведение, вероятно, обусловлено тем, что при низком содержании этанола в растворе, т. е. при высокой полярности среды, имеет место существенное смешивание низколежащего внутримолекулярного ПЗ-состояния с возбужденным S_1 -состоянием, и рост стоксового сдвига при уменьшении полярности можно приписать молекуле H_2TMPyR^{4+} с дипольным моментом в возбужденном состоянии $\mu_{\pi\pi^*}$. При уменьшении полярности, когда доля этанола достигает 20 % по объему и более, смешивание состояний ПЗ и S_1 становится пренебрежимо малым и молекула H_2TMPyR^{4+} имеет флуоресцирующее состояние чисто $\pi\pi^*$ -природы с дипольным моментом μ_{S_1} .

Смешивание состояний ПЗ и S_1 , как отмечалось выше, отражается в форме спектра флуоресценции: при высокой полярности он представляет собой широкую бесструктурную полосу, при ее понижении он состоит из двух хорошо разре-

где порфирин образует комплексы посредством встраивания в большой или малой бороздке, доступ молекул воды будет выше, чем для интеркалированных комплексов в $[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$. Однако молекулы $\text{H}_2\text{TMPyR}^{4+}$ могут быть доступны для воды, но локальная полярность, обеспечиваемая сайтом в ДНК, при этом может быть низкой.

Действительно, при условии, что нет специфических взаимодействий между молекулами $\text{H}_2\text{TMPyR}^{4+}$ и воды (в данном случае это именно так, что подтверждается хорошим взаимным соответствием значений, полученных с использованием эмпирической шкалы полярности и упрощенного подхода Липперта-Матаги), только локальная полярность в сайтах будет определять фотофизические свойства связанных молекул. К тому же, диэлектрическая проницаемость воды вблизи ионов намного меньше, чем соответствующая величина в объеме растворителя ($\epsilon = 5 - 10$) [52 - 54]. Поэтому молекулы воды, находящиеся вблизи отрицательно заряженного сахара-фосфатного остова ДНК, по-видимому, не вносят существенного вклада в увеличение локальной полярности в сайтах связывания.

Влияние локальной полярности на фотофизические свойства $\text{H}_2\text{TMPyR}^{4+}$ в составе комплексов

Проанализируем фотофизические характеристики молекул $\text{H}_2\text{TMPyR}^{4+}$ в составе комплексов на основании полученных оценок локальной полярности в местах связывания. Как указывалось выше, для $\text{H}_2\text{TMPyR}^{4+}$ в комплексе с $[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$ кинетика затухания флуоресценции оказалась двухэкспоненциальной. Было предположено, что два компонента в кинетике с временами 2,5 и 7,0 нс относятся к молекулам, у которых различная эффективность перенос-зарядовых взаимодействий с гуанином. Однако не исключено, что долгоживущий компонент принадлежит молекулам, которые не участвуют в таких межмолекулярных процессах.

Известно, что время жизни флуоресценции $\text{H}_2\text{TMPyR}^{4+}$ обнаруживает тенденцию к увеличению с уменьшением полярности раствора [43]. Время жизни флуоресценции в смеси вода-метанол с диэлектрической проницаемостью около 60 составляет ~7,0 нс. Прослеживается взаимное соответствие этой величины и значения 7,0 нс для долгоживущего компонента флуоресценции в интеркалированном комплексе ($\epsilon_{\text{эфф}} = 62,5 \pm 2,5$). Очевидно, этот компонент принадлежит молекулам $\text{H}_2\text{TMPyR}^{4+}$, которые не участвуют в перенос-зарядовых взаимодействиях с гуанином. Удлинение времени жизни флуоресценции с 4,6 до 7,0 нс обусловлено уменьшением полярности микроокружения при интеркаляции молекул $\text{H}_2\text{TMPyR}^{4+}$ между парами оснований в $[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$. Возможно, эффективность межмолекулярных взаимодействий с гуанином различна для молекул порфирина, интеркалировавших в сайты 5'GC3' и 5'CG3' в $[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$. Однако также возможно, что часть молекул в каждом из сайтов не участвует в данных межмолекулярных процессах. Этот вопрос будет нами рассмотрен ниже.

Большая длительность флуоресценции $\text{H}_2\text{TMPyR}^{4+}$, измеренная для комплекса с $[\text{поли}(\text{dA-dT})]_2$ (12,0 нс) также может быть объяснена уменьшением локальной полярности. Для данного комплекса полярность ниже, чем для интеркалированных молекул, и длительность флуоресценции, следовательно, еще больше. Более того, поскольку в комплексе $\text{H}_2\text{TMPyR}^{4+}$ с $[\text{поли}(\text{dA-dT})]_2$ нет никаких межмолекулярных взаимодействий с нуклеиновыми основаниями, длительность флуоресценции может быть использована для оценки нижней границы полярности микроокружения. Согласно литературным данным [43], в случае линейной зависимости длительности флуоресценции от диэлектрической проницаемости время жизни флуоресценции 12,0 нс должно соответствовать величине $\epsilon \sim 25 - 30$.

Таким образом, наблюдаемые изменения спектральных и фотофизических характеристик $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ при образовании комплексов с полинуклеотидами и ДНК могут быть удовлетворительно объяснены с помощью представлений об уменьшении локальной полярности в местах связывания порфиринов, а сами порфирины можно использовать в качестве зондов для оценки полярности микроокружения.

ТУШЕНИЕ ВОЗБУЖДЕННЫХ ТРИПЛЕТНЫХ СОСТОЯНИЙ МОЛЕКУЛЯРНЫМ КИСЛОРОДОМ И ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ ($^1\Sigma_g$) КИСЛОРОДА

Взаимосвязь константы скорости тушения триплетных состояний молекулярным кислородом и локализации порфирина в ДНК

Диффузионно-контролируемая реакция тушения возбужденных состояний молекулярным кислородом может дать определенную структурную информацию о комплексах красителей с биополимерами. Разные типы сайтов связывания порфиринов нуклеиновыми кислотами обеспечивают различную степень экранирования встроенной молекулы от взаимодействия с растворенным кислородом. Поэтому доступ кислорода к связанным молекулам порфирина, детектируемый по величине константы скорости тушения возбужденных триплетных состояний молекулярным кислородом k_T , может служить для идентификации различных сайтов связывания.

Прежде, чем приступить к анализу полученных результатов, следует отметить, что форма спектров триплет-триплетного поглощения молекул $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в составе комплексов не отличается от формы, полученной ранее в водных растворах [55, 56]. Это соответствует результатам измерения спектров триплет-триплетного поглощения PdTMPyP^{4+} в составе комплексов с ДНК, [поли(dG-dC)]₂ и [поли(dA-dT)]₂, где во всех исследованных случаях получены спектры, практически одинаковые по форме [22].

Эти результаты подтверждаются также измерениями квантового выхода образования триплетного состояния Φ_T $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в составе комплексов. Данная величина зависит от профиля триплет-триплетного поглощения, если для различных типов связывания (в случае комплекса с ДНК, например) спектры триплет-триплетного поглощения различаются. Мы не обнаружили зависимости величины Φ_T от длины волны зондирующего света для всех трех исследованных комплексов. К тому же на длине волны возбуждения (347 нм) коэффициент экстинкции основного состояния практически одинаков для порфирина, интеркалированного в [поли(dG-dC)]₂ и внешне связанного с [поли(dA-dT)]₂, что должно быть также справедливо для соответствующих типов связывания с ДНК. В этом случае молекулы интеркалированных и внешне связанных порфиринов будут возбуждаться пропорционально их относительной концентрации в данной системе. Что же касается коэффициента триплет-триплетного поглощения, то его величина изменяется при формировании комплексов: для комплекса с [поли(dA-dT)]₂ она в два раза ниже, чем для свободного $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в водном буфере, а в случае интеркалированного в [поли(dG-dC)]₂ порфирина – в два раза меньше, чем для внешне связанных комплексов с [поли(dA-dT)]₂.

Фотофизические характеристики триплетных состояний $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в составе комплексов с ДНК и полинуклеотидами в насыщенных воздухом буферных растворах представлены в табл. 2. Как видно из нее, константы скорости тушения триплетных состояний существенно различаются для различных комплексов. Так, в случае интеркалированного комплекса с [поли(dG-dC)]₂ кинетика затухания T -T-поглощения является моноэкспоненциальной, как и в случае свободного $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в буфере, однако время

жизни триплетного состояния – 30 мкс – существенно больше, чем соответствующая величина, измеренная для свободных молекул в водном буфере (2 мкс). Для комплексов $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ с $[\text{поли}(\text{dA-dT})]_2$ и ДНК кинетика затухания T - T -поглощения оказалась двухэкспоненциальной с временами жизни 5,5 и 20,5 мкс и 4,5 и 18,0 мкс соответственно. Кинетика затухания T - T -поглощения для $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в составе комплексов с $[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$ и $[\text{поли}(\text{dA-dT})]_2$ и в буфере представлена на рис. 3.

Таблица 2. Время жизни триплетного состояния $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в насыщенном воздухом растворе τ_T и константа скорости тушения триплетных состояний молекулярным кислородом k_T

Образец	τ_T , мкс	k_T , 10^9 , $(\text{M c})^{-1}$
Водный буфер	2,0	1,86
ДНК	4,5 (32 %), 18,0 (68 %)	0,83, 0,20
$[\text{поли}(\text{dA-dT})]_2$	5,5 (22 %), 20,5 (78 %)	0,68, 0,18
$[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$	30,0	0,12

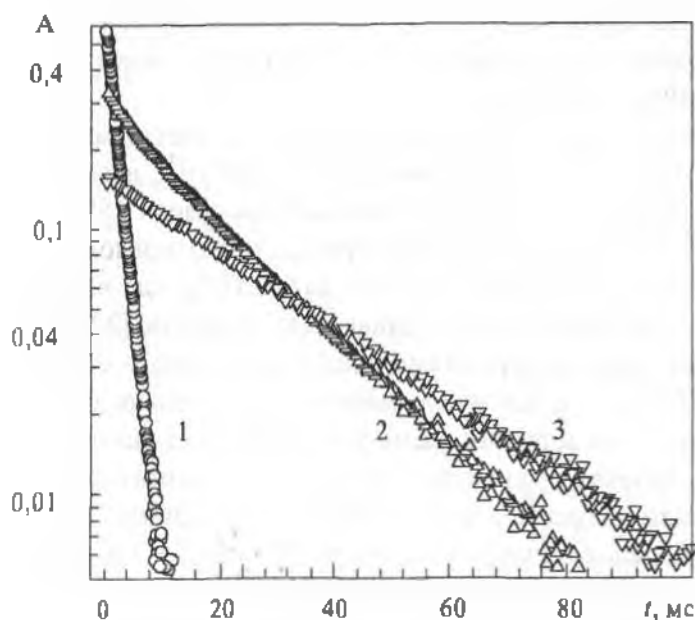


Рис. 3. Кинетика затухания триплет-триплетного поглощения $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$: 1 – в водном растворе, 2 – в комплексе с $[\text{поли}(\text{dA-dT})]_2$, 3 – в комплексе с $[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$

молекулы, вероятно, связаны в большой бороздке так, что одна плоскость порфиринового макроцикла свободна для доступа молекул кислорода из раствора.

Вторая популяция (78 %) имеет гораздо более низкий доступ молекулярного кислорода, что увеличивает время жизни триплетного состояния до 20,5 мкс. Данные молекулы также, по-видимому, образуют внешние связанные комплексы, которые, как и в предыдущем случае, стабилизируются главным образом кулоновскими взаимодействиями. Молекулы порфирина встраиваются "ребром" в малую бороздку, которая достаточно глубокая и узкая, что приводит к существенному понижению доступа молекулярного кислорода.

Сайты с высоким доступом кислорода будем называть далее сайты "типа В", а сайты с низким доступом – сайты "типа С". Отметим, что внутримолекулярные фото-

Большое время жизни триплетного состояния порфирина в комплексе с $[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$ обусловлено существенным уменьшением доступа молекулярного кислорода к интеркалированным молекулам $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$. Полученный результат показывает, что среди возможных типов комплексобразования интеркаляция обеспечивает максимальное экранирование порфирина от взаимодействия с кислородом. Места связывания порфирина с наименьшей константой скорости тушения возбужденных триплетных состояний кислородом мы обозначили как сайты "типа А".

Двухэкспоненциальная кинетика затухания триплетного состояния $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в комплексе с $[\text{поли}(\text{dA-dT})]_2$ указывает, что все связанные молекулы распределены по двум типам сайтов, которые существенно различаются по доступу кислорода к порфирину. Время жизни триплетного состояния порфирина в одном из них, связывающем 22 % молекул, составляет 5,5 мкс, т. е. лишь в 2,75 раза выше, чем у свободного порфирина в растворе. Эти молекулы

физические характеристики молекул $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в сайтах типов В и С одинаковы. Так, например, кинетика затухания флуоресценции является монокспоненциальной и не позволяет говорить о существовании двух типов комплексов. Однако эти молекулы можно легко идентифицировать по различной эффективности их взаимодействия с кислородом. Реакция тушения возбужденных триплетных состояний молекулярным кислородом дает, таким образом, новую, комплементарную к внутримолекулярным фотофизическим характеристикам, информацию о строении комплексов.

Кинетика затухания триплет-триплетного поглощения $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в комплексе с ДНК хорошо аппроксимируется двухэкспоненциальной функцией. Однако число различных типов комплексов в ДНК должно быть равно трем: интеркалированные комплексы в СС-участках и два типа внешне связанных на АТ-участках. Отличное от комплекса с $[\text{поли}(\text{dA-dT})]_2$ соотношение короткоживущего и долгоживущего компонентом в кинетике затухания $T-T$ -поглощения и величина квантового выхода образования триплетного состояния $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$, имеющая промежуточное значение между величинами, измеренными для комплексов с полинуклеотидами, указывает на то, что для объяснения полученных результатов необходимо положить, что в ДНК существуют три типа сайтов: А, В и С. Возможно, что сайты типа А в ДНК и $[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$ различаются по доступу молекулярного кислорода, однако данные рентгеноструктурного анализа указывают на отсутствие заметных различий между строением ДНК и $[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$, что делает вероятность таких изменений весьма низкой. Наиболее вероятным объяснением является следующее.

Интеркалированные и внешне связанные типы комплексов имеют одинаковую равновесную константу комплексообразования, поэтому соответствующие комплексы образуются пропорционально количеству данных сайтов в ДНК (42 % пар GC и 58 % AT). Дополнительно, ввиду вдвое меньшего коэффициента $T-T$ -поглощения и квантового выхода образования триплетного состояния для $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в комплексе с $[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2$ по сравнению с соответствующими значениями, полученными для комплекса с $[\text{поли}(\text{dA-dT})]_2$, вклад интеркалированных молекул в суммарный сигнал $T-T$ -поглощения в максимуме кинетической кривой после фотовозбуждения не будет превышать 10 %. Поэтому короткоживущий компонент (4,5 мкс) в кинетике затухания $T-T$ -поглощения соответствует поглощению порфиринами в сайтах типа В, а компонент с временем жизни 18,0 мкс отражает, главным образом, поглощение $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в сайтах типа С с минорным вкладом поглощения интеркалированными молекулами в сайтах типа А. На основании величин квантового выхода образования триплетного состояния для полинуклеотидов и ДНК мы оценили долю интеркалированных молекул в 36 % [28]. Аппроксимация кинетики затухания триплет-триплетного поглощения с помощью трехэкспоненциальной функции дала следующий результат: 4,2 мкс (19 %), 13,7 мкс (64 %), 27,8 мкс (15 %). Эти результаты хорошо согласуются с приведенными предположениями и еще раз подтверждают присутствие трех типов сайтов для связывания порфиринов в ДНК.

Фотосенсибилизированное образование синглетного молекулярного кислорода $^1\Delta_g$

Величины квантового выхода фотосенсибилизированного образования синглетного молекулярного кислорода Φ_Δ и доля триплетных состояний, при тушении которых образовался синглетный кислород f_Δ ($\Phi_\Delta = \Phi_T \cdot f_\Delta$) для свободных молекул $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ и в составе комплексов с ДНК и полинуклеотидами представлены в табл. 3. Длительность люминесценции синглетного кислорода τ_Δ во всех случаях равняется 50 ± 5 мкс,

что соответствует константе скорости затухания $k_{\Delta} - 1/\tau_{\Delta} = 2 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$. Постоянство величины k_{Δ} свидетельствует об отсутствии тушения люминесценции синглетного кислорода самим сенсibilизатором или его ближайшим окружением. Полученный результат находится в хорошем соответствии с константой скорости тушения люминесценции синглетного кислорода молекулами ДНК $- 5,3 \cdot 10^5 (\text{М} \cdot \text{с})^{-1}$ [57].

Таблица 3. Квантовый выход фотосенсибилизированного $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ образования синглетного молекулярного кислорода Φ_{Δ} и доля триплетных молекул, при тушении которых образуется синглетный кислород f_{Δ}

Образец	Φ_{Δ}	f_{Δ}
водный буфер	0,9	1,0
ДНК	0,57	0,74
[поли(dA-dT)] ₂	0,71	0,75
[поли(dG-dC)] ₂	0,47	1,0

Во всех случаях время жизни триплетного состояния было достаточно большим, чтобы обеспечить полное тушение возбужденных триплетных состояний молекулярным кислородом. Известна оценка величины квантового выхода фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода в предположении полного переноса энергии от триплетной молекулы порфирина на кислород $\Phi_{\Delta} = (1 - \tau_{\text{T}}/\tau_{\text{T}}^0) \cdot \Phi_{\text{T}}$, где τ_{T} и τ_{T}^0 – времена жизни триплетного состояния в насыщенных воздухом и дезоксигенированных растворах соответственно [58]. Расчеты по-

казывают, что для всех исследованных комплексов величины Φ_{Δ} должны практически совпадать с величинами квантового выхода образования триплетного состояния Φ_{T} . Таким образом, различие в величинах Φ_{T} и Φ_{Δ} (табл. 1 и 3) указывает на то, что по крайней мере для одного из сайтов в ДНК и [поли(dA-dT)]₂ молекулы $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ имеют величину f_{Δ} меньше 1. Напротив, молекулы $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в комплексе с [поли(dG-dC)]₂ имеют величину $f_{\Delta} = 1$, как и в случае свободных молекул в растворе. Очевидно, что различные сайты обеспечивают не только различный доступ молекулярного кислорода к связанным молекулам порфирина, но и определяют эффективность фотосенсибилизированного образования синглетного молекулярного кислорода. На основании измеренных величин для всех исследованных комплексов нами рассчитаны значения Φ_{T} , Φ_{Δ} и f_{Δ} для каждого типа сайтов [28]. Полученные результаты суммированы в табл. 4. Как видно, величина f_{Δ} существенно различается для сайтов типа В и С и в обоих случаях она меньше 1. Молекулы порфирина, связанные в них, имеют одинаковые внутримолекулярные фотофизические характеристики, но их способность к фотосенсибилизированному образованию синглетного кислорода сильно различается.

Таблица 4. Квантовые выходы образования триплетного состояния Φ_{T} , фотосенсибилизированного образования синглетного молекулярного кислорода Φ_{Δ} , доля триплетных молекул, при тушении которых образуется синглетный кислород f_{Δ} , и константа скорости тушения триплетных состояний молекулярным кислородом k_{T} для молекул $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в составе комплексов в различных сайтах

Сайт	Локализация	Φ_{T}	Φ_{Δ}	f_{Δ}	$k_{\text{T}} 10^9 (\text{М} \cdot \text{с})^{-1}$
А	GC	0,44	0,47	1,0	0,12 ^a (0,13) ^b
В	AT	0,95	0,47	0,50	0,68 ^a (0,86) ^b
С	AT	0,95	0,78	0,82	0,18 ^a (0,26) ^b

^a в комплексах с полинуклеотидами

^b в комплексах с ДНК

В чем заключается причина таких различий? Наиболее вероятной причиной уменьшения величины f_{Δ} для сайтов В и С является конкуренция между переносом энергии и заряда от сенсibilизатора $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в триплетном состоянии к молекулам кислорода [59]. Участие перенос-зарядовых взаимодействий в комплексе соударения

$^{1,3}(\text{P}\cdots\text{O}_2)$, который формируется при тушении, продемонстрировано для ряда тетрапиррольных молекул [60]. Вклад перенос-зарядовых взаимодействий в данной ситуации будет зависеть от потенциала ионизации порфирина и полярности микроокружения, поскольку оба параметра влияют на положение межмолекулярного состояния с переносом заряда [59].

Таким образом, молекулы порфирина, связанные в сайтах типа С, имеют наибольший квантовый выход фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода (0,78), а молекулы $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$, связанные в сайтах А и В, характеризуются величиной Φ_Δ , равной 0,47. Реакционная способность взаимодействия нуклеиновых оснований с синглетным кислородом убывает в ряду $\text{G} \gg \text{C} > \text{A} > \text{U} > \text{T}$ в соотношении 1000 : 20 : 6 : 4 : 2 [61]. Поэтому вероятность взаимодействия будет наибольшей при взаимодействии синглетного кислорода с гуанином. Эти данные приводят к выводу о селективности опосредованного синглетным кислородом разрушения цепи ДНК даже без селективного связывания и практически исключают возможность разрыва ДНК по механизму фотореакций типа II в любой последовательности оснований, не содержащей гуанин. Поскольку $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ взаимодействует в фотореакции типа I только с гуанином [27], можно утверждать, что гуанин является наиболее вероятной мишенью при фоторазрушении ДНК с использованием $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в качестве фотосенсибилизатора.

Связывание молекул $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в 5'GC3'- и 5'CG3'-сайтах двойной спирали ДНК

Существует ли селективность во взаимодействии порфиринов с сайтами 5'GC3' и 5'CG3'? Как было указано выше, биекспоненциальный характер кинетики затухания флуоресценции $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ в комплексе с [поли(dG-dC)]₂ может быть обусловлен как различной эффективностью межмолекулярных взаимодействий с гуанином для молекул порфирина, интеркалировавших в 5'GC3'- и 5'CG3'-сайтах, так и гетерогенностью комплексов, образованных в тех же сайтах. Вопрос о различии в структуре образовавшихся комплексов $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ с последовательностями оснований 5'CG3' и 5'GC3' в двойной спирали ДНК обсуждался неоднократно [10, 12, 16 - 19, 25, 27, 28].

Впервые на существование таких различий на основе результатов ЯМР-экспериментов указали Марзилли с соавт. [10]. Было предположено, что $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ интеркалирует только в последовательностях 5'CG3', но не в 5'GC3'. Позднее было отмечено, что изменения в спектрах ЯМР, наблюдаемые у ДНК, не соответствуют гипотезе о селективном связывании с последовательностями 5'CG3' [12]. В дальнейшем для изучения явления селективности связывания были применены спектроскопия РКР, абсорбционная спектроскопия в УФ и видимой областях и ¹H-ЯМР-спектроскопия [16]. Было показано, что $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ и его металлокомплексы с Cu(II) и Ni(II) могут интеркалировать как в 5'CG3'-, так и в 5'GC3'-последовательности двойной спирали ДНК, хотя и с различным сродством.

Выбор модельной системы для исследования

В качестве модельных систем целесообразно использовать олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие в середине цепи последовательности 5'CG3' и 5'GC3', а по краям (для обеспечения подвижности) комплементарные АТ-последовательности минимальной длины. Олигомерная цепь не должна быть слишком длинной, иначе большое количество молекул порфирина не свяжется в интересующих нас сайтах. Следуя аргументам, приведенным в работе [16], были выбраны гексануклеотиды: [d(TACGTA)]₂ и [d(TAGCTA)]₂. В дальнейшем для краткости будем называть их соответственно CG- и GC-гексамерами.

Максимумы и относительные интенсивности полос в спектрах поглощения H_2TMPyP^{4+} в комплексах с CG- и GC-гексамерами суммированы в табл. 5, в которой для сравнения приведены также соответствующие величины для свободного порфирина и его комплекса с [поли(dG-dC)]₂. При образовании комплексов с CG- и GC-гексамерами наблюдается большой красный сдвиг полосы Core и видимых полос, а также гипохромный эффект для полосы Core [31]. Очевидно, что комплексообразование H_2TMPyP^{4+} с гексадезоксирибонуклеотидами [d(TACGTA)]₂ и [(TAGCTA)]₂ посредством интеркаляции имеет место в обеих последовательностях 5'CG3' и 5'GC3'.

Таблица 5. Спектр поглощения H_2TMPyP^{4+} в буферном водном растворе и в составе комплексов с [поли(dG-dC)]₂, [d(TACGTA)]₂ и [d(TAGCTA)]₂

Образец	Core ^a , нм	% Н ^b	Q _y (0,1), нм	Q _y (0,0), нм	Q _x (0,1), нм	Q _x (0,0), нм
водный буфер	423 (26)	-	516 (1,0)	552 (0,37)	582 (0,44)	638 (0,10)
[поли(dG-dC)] ₂	445,5	41	530 (1,0)	566 (0,54)	600 (0,42)	655 (0,15)
[d(TACGTA)] ₂	440 (33)	44	529 (1,0)	565 (0,52)	598 (0,42)	655 (0,14)
[d(TAGCTA)] ₂	437 (33)	41	527 (1,0)	561 (0,48)	596 (0,42)	652 (0,14)

^a В скобках указана полуширина полосы

^b Гипохромизм (% Н) определяется как $(\epsilon_1 - \epsilon_2)/(\epsilon_1 - 100)$, где ϵ_1 и ϵ_2 — коэффициенты экстинкции в максимумах полосы Core свободного и связанного порфирина соответственно. Для видимой области в скобках даны интенсивности, определенные относительно полосы Q_y(0,1)

Фотофизические свойства и взаимодействие с молекулярным кислородом

Фотофизические свойства H_2TMPyP^{4+} , связанного с гексадезоксирибонуклеотидами [d(TAGCTA)]₂ и [d(TAGCTA)], представлены в табл. 6. Хотя между характеристиками комплексов H_2TMPyP^{4+} с гексамерами и с [поли(dG-dC)]₂ (табл. 1 – 3) существует очевидное сходство, есть и определенные различия. Наиболее очевидным из них является двухэкспоненциальный характер затухания триплет-триплетного поглощения в насыщенных воздухом растворах для обоих комплексов с гексамерами.

Время жизни триплетного состояния порфирина τ_T в насыщенных воздухом растворах имеет определенную величину для каждого типа комплекса. Компоненты с большой величиной τ_T (29 и 26 мкс соответственно для комплексов с CG- и GC-гексамерами), безусловно, соответствуют интеркалированному типу связывания. Эти величины очень близки к значению, полученному для комплекса с [поли(dG-dC)]₂ (30 мкс). С другой стороны, величина τ_T для короткоживущих компонентов (7,0 и 6,0 мкс для CG- и GC-комплексов соответственно) близка к измеренной для H_2TMPyP^{4+} в комплексе с [поли(dA-dT)]₂ (5,5 мкс). Хотя связывание с длинной спиралью и короткими олигомерами следует сравнивать с осторожностью (вследствие различной подвижности структура комплексов одного и того же типа может несколько различаться, что приведет к различному доступу молекул кислорода к связанным молекулам порфиринов), без сомнения можно предположить, что наряду с интеркаляцией в последовательности CG и GC часть молекул порфирина образует с гексамерами внешне связанные комплексы.

Таблица 6. Фотофизические свойства H_2TMPyP^{4+} в составе комплексов с гексадезоксирибонуклеотидами

Образец	$\Phi_{\text{фл}}$	$\tau_{\text{фл}}$, нс	Φ_T	τ_T , мкс	$k_T \cdot 10^9$ (M·c) ⁻¹
[d(TACGTA)] ₂	0,029	3,2 (50 %), 8,0 (50 %)	0,47	7,0 (20 %), 29,0 (80 %)	0,5, 0,12
[d(TAGCTA)] ₂	0,021	2,7 (50 %), 10,4 (50 %)	0,54	6,0 (28 %), 26,5 (72 %)	0,6, 0,14

Сравнение с результатами, полученными для комплекса с [поли(dA-dT)]₂ (табл. 2), подтверждает вывод о существовании внешнего связывания. Коэффициент экстинкции триплет-триплетного поглощения интеркалированного порфирина составляет примерно половину от соответствующей величины для внешне связанного. Таким образом, относительные веса компонентов в кинетике затухания триплет-триплетного поглощения (табл. 6) не равны долям порфиринов, присоединенных к каждому месту связывания. Следовательно, доля интеркалированных молекул порфирина будет равна 89 и 84 %, соответственно, в комплексах с CG- и GC-гексамерами; внешне связанные комплексы образуют, соответственно, 11 и 16 % молекул H₂TMPP⁴⁺.

Величины квантового выхода образования триплетного состояния Φ_T , равные 0,47 и 0,54, соответственно, для комплексов с CG- и GC-гексамерами, согласуются с данной оценкой. Если предположить, что интеркалированный порфирин и порфирин, связанный с внешней стороны, имеют величины Φ_T такие же, как в случае полинуклеотидов ($\Phi_T = 0,44$ и 0,95 соответственно), результирующая величина Φ_T для комплекса с CG-гексамером составит $0,11 \cdot 0,95 + 0,89 \cdot 0,44 = 0,50$, для комплекса с GC-гексамером – $0,16 \cdot 0,95 + 0,84 \cdot 0,44 = 0,52$. Очевидно, что расчетные величины Φ_T находятся в хорошем соответствии с измеренными. Это еще раз указывает, что основная часть молекул порфирина интеркалирует, а минорная присоединяется снаружи к CG- и GC-гексамерам, причем фотофизические характеристики молекул H₂TMPP⁴⁺ практически такие же, как и в случае комплексов с чередующимися GC- и AT-полинуклеотидами.

Локальная полярность в однотипных сайтах связывания в гексануклеотидах и полинуклеотидах также имеет близкие значения [31]. Действительно, величина стоксова сдвига, измеренная для CG-комплекса, практически совпадает с величиной, полученной для комплекса с [поли(dG-dC)]₂. Для GC-комплекса значение стоксового сдвига несколько меньше. Это обусловлено тем, что GC-комплекс имеет большую долю внешних мест связывания, полярность которых меньше: чем больше занято таких мест, тем меньше стоксов сдвиг.

В спектрах флуоресценции (рис. 4) наблюдается такая же картина при переходе от [поли(dG-dC)]₂ к [d(TACGTA)]₂, [d(TAGCTA)]₂ и, наконец, к [поли(dA-dT)]₂. Спектр флуоресценции порфирина в составе комплекса с GC-гексамером практически совпадает со спектром флуоресценции комплекса с [поли(dG-dC)]₂, за исключением слабого уширения полос и небольшого изменения отношения интенсивности пиков $Q(0,0)$ - и $Q(0,1)$ -полос. Спектр флуоресценции H₂TMPP⁴⁺ в комплексах с гексамерами GC еще больше сдвинут в коротковолновую область, а отношение интенсивностей $I_{Q(0,0)}/I_{Q(0,1)}$ испытывает тенденцию к дальнейшему увеличению. Такие изменения обусловлены возрастанием доли внешне присоединенных порфиринов в ряду:

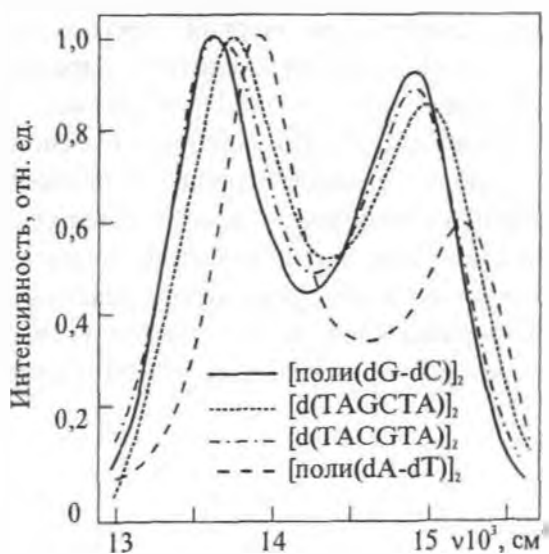


Рис. 4. Нормированные спектры флуоресценции H₂TMPP⁴⁺ в составе комплексов с поли- и гексaдезоксирибонуклеотидами ($\lambda_{\text{возб}} = 520$ нм)

$$[\text{поли}(\text{dG-dC})]_2 < [\text{d}(\text{TACGTA})]_2 < [\text{d}(\text{TAGCTA})]_2 < [\text{поли}(\text{dA-dT})]_2.$$

Квантовый выход флуоресценции порфиринов в составе обоих комплексов с гексамерами близок к $\Phi_{\text{фл}}$ в комплексе с [поли(dG-dC)]₂. Принимая во внимание малую

величину квантового выхода образования триплетного состояния Φ_T ($\sim 0,5$), можно утверждать, что для обоих комплексов с гексамерами имеет место перенос электрона с гуанина на порфирин. Квантовый выход Φ_{HK} этого канала безызлучательной дезактивации S_1 -состояния порфирина равен $\sim 0,5$ и $0,44$ для последовательностей $5'CG3'$ и $5'GC3'$ соответственно.

На существование процессов переноса заряда указывают также данные о времени жизни флуоресценции $\tau_{фл}$. Для комплекса с [поли(dG-dC)]₂ ПЗ-процессы между гуанином и интеркалированным H_2TMPyP^{4+} приводят к тушению S_1 -состояния порфирина и сокращению времени жизни флуоресценции до $2,5$ нс. В случае CG- и GC-гексамеров получено двухэкспоненциальное затухание с временами жизни короткоживущих компонентов соответственно $3,2$ и $2,7$ нс. Времена жизни долгоживущих компонентов ($8,0$ (50%) и $10,4$ нс (50%) для CG- и GC-гексамеров соответственно) указывают на то, что как интеркалированные, так и внешне присоединенные молекулы вносят в них свой вклад.

Наличие $11 - 16\%$ внешне присоединенных молекул в гексамерах не может объяснить 50% интенсивности флуоресценции, приходящейся на долгоживущий компонент ($\lambda_{набл} = 670$ нм). Очевидно, величины $\tau_{фл}$ $8,0$ и $10,4$ нс для CG- и GC-гексамеров представляют собой усреднение величин $\tau_{фл}$ $12,0$ и $7,0$ нс, измеренных для чередующихся сополимеров [поли(dA-dT)]₂ и [поли(dG-dC)]₂, что наблюдалось также и для комплекса с ДНК (табл. 1). Время жизни флуоресценции возрастает с увеличением доли внешне присоединенных порфиринов в гексамерах, однако оно не должно изменяться, если этот компонент принадлежит свечению порфирина в составе внешне связанных комплексов: это только изменило бы вес данного компонента. Таким образом, можно заключить, что определенная доля порфиринов, интеркалированных как в $5'CG3'$ -, так и в $5'GC3'$ -последовательностях гексамеров, не участвует в ПЗ-процессах с гуанином.

В заключение отметим, что представленные результаты указывают на то, что каналы дезактивации энергии электронного возбуждения H_2TMPyP^{4+} в составе комплексов с нуклеиновыми кислотами определяются свойствами сайтов связывания: локальной полярностью и окислительно-восстановительными потенциалами оснований нуклеиновых кислот. Возможность взаимодействий с переносом заряда между H_2TMPyP^{4+} и гуанином, с одной стороны, и наибольшая скорость взаимодействия гуанина с синглетным кислородом, с другой, говорят о том, что гуанин является наиболее вероятной мишенью при сенсibilизированном молекулами порфирина фоторазрушении ДНК. Диффузионно-контролируемая реакция тушения триплетных состояний порфирина молекулярным кислородом может с успехом быть использована для идентификации различных сайтов связывания в биополимерах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fiel R. J., Howard J. C., Mark E. H. Datta-Gupta N. // *Nucleic Acids Res.* 1979. V. 6. P. 3093 - 3120.
2. Fiel R. J., Munson B. R. // *Nucleic Acids Res.* 1980. V. 8. P. 2835 - 2842.
3. Carvlin M. J., Fiel R. J. // *Nucleic Acids Res.* 1983. V. 11. P. 6141 - 6154.
4. Carvlin M. J., Fiel R. J. // *Nucleic Acids Res.* 1983. V. 11. P. 6121 - 6140.
5. Pasternack R. F., Gibbs E. J., Villafranca J. J. // *Biochemistry.* 1983. V. 22. P. 2406 - 2414.
6. Pasternack R. F., Gibbs E. J., Villafranca J. J. // *Biochemistry.* 1983. V. 22. P. 5409 - 5417.
7. Kelly J. M., Murphy M. J., McConnel D. J., Ohuigin C. // *Nucleic Acids Res.* 1985. V. 13. P. 167 - 184.
8. Pasternack R. F., Gibbs E. J., Gaudemer A. et. al. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1985. V. 107. P. 8179 - 8186.
9. Pasternack R. F., Garrity P., Ehrlich B., Davis C. B., Gibbs E. J., Orloff G., Giartosio A., Turano C. // *Nucleic Acids Res.* 1986. V. 14. P. 5919 - 5931.
10. Marzilli L. G., Banville D. L., Zon G., Wilson W. D. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1986. V. 108. P. 4188-4192.
11. Blom N., Odo J., Nakamoto K., Strommen D. P. // *J. Phys. Chem.* 1986. V. 90. P. 2847 - 2852.
12. Strickland J. A., Banville D. L., Wilson W. D., Marzilli L. G. // *Inorg. Chem.* 1987. V. 26. P. 3398 - 3406.
13. Geacintov N. E., Ibanez V., Rougee M., Bensansson R. V. // *Biochemistry.* 1987. V. 26. P. 3087 - 3092.
14. Ford K. G., Pearl L. H., Neidle S. // *Nucleic Acids Res.* 1987. V. 15. P. 6553.
15. Schneider J. H., Odo J., Nakamoto K. // *Nucl. Acids. Res.* 1988. V. 16. P. 10323 - 10338.
16. Butje K., Schneider J. H., Kim J.-J., Wang Y., Ikuta S., Nakamoto K. // *J. Inorg. Chem.* 1989. V. 37. P. 119 - 133.
17. Marzilli L. G. // *Nouv. J. Chim.* 1990. V. 14. P. 409 - 420.
18. Hudson B. P., Sou J., Berger D. J., McMillan D. R. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1992. V. 114. P. 8997 - 9002.
19. Strahan G. D., Lu D., Tsuboi M., Nakamoto K. // *J. Phys. Chem.* 1992. V. 96. P. 6450 - 6457.
20. Mojzes P., Chinsky L., Turpin P.-Y. // *J. Phys. Chem.* 1993. V. 97. P. 4841 - 4847.
21. Liu Y., Koningstein J. A. // *J. Phys. Chem.* 1993. V. 97. P. 6155 - 6160.
22. Brun A. M., Harriman A. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1994. V. 116. P. 10383 - 10393.
23. Kruglik S. G., Galievsky V. A., Chirvony V. S. et. al. // *J. Phys. Chem.* 1995. V. 99. P. 5732 - 5741.
24. Galievsky V. A., Chirvony V. S., Kruglik S. G. et. al. // *J. Phys. Chem.* 1996. V. 100. P. 12649 - 12659.
25. Uno T., Hamasaki K., Tanigawa M., Shimaayashi S. // *Inorg. Chem.* 1997. V. 36. P. 1676 - 1683.
26. Jasuja R., Jameson D. M., Nishijo C. K., Larsen R. W. // *J. Phys. Chem. B.* 1997. V. 101. P. 1444 - 1450.
27. Chirvony V.S., Galievsky V. A., Kruk N. N., Dzhagarov B. M., Turpin P.-Y. // *J. Photochem. Photobiol. B – Biol.* 1997. V. 40. P. 154 - 162.
28. Kruk N. N., Dzhagarov B. M., Galievsky V. A., Chirvony V. S., Turpin P.-Y. // *J. Photochem. Photobiol. B – Biol.* 1998. V. 42. P. 181- 190.

29. *Borissevitch I. S., Gandini S. C. M. // J. Photochem. Photobiol. B – Biol. 1988. V. 43. P. 112 - 120.*
30. *Gandini S. C. M., Borissevitch I. E., Perussi J. R., Imasato H., Tabak M. // J. Luminescence. 1998. V. 78. P. 53 - 61.*
31. *Kruk N. N., Shishporenok S. I., Korotky A. A., Galievsky V. A., Chirvony V. S., Turpin P.-Y. // J. Photochem. Photobiol. B – Biol. 1998. V. 45. P. 67 - 74.*
32. *Kruk N. N., Shishporenok S. I., Galievsky V. A., Chirvony V. S., Turpin P.-Y. // in press.*
33. *Fiel R. J., Datta-Gupta N., Mark E. H., Howard J. C. // Cancer Res. 1981. V. 41. P. 3543 - 3545.*
34. *Le Doan T., Perrouault L., Rougee M., Bensasson R., Helene C. / Singlet oxygen formation and cleavage of DNA photosensitized by porphyrins, in Photodynamic Therapy of Tumours and Other Diseases. Libreria Progetto. Padova, 1985. P. 56 - 58.*
35. *Praseuth D., Gaudemer A., Verlhac J.-B., Craljic I., Sissoeff I., Guie E. // Photochem. Photobiol. 1986. V. 44. P. 717 - 724.*
36. *Croke D. T., Perrouault L., Sari M. A. et al. // J. Photochem. Photobiol. B – Biol. 1993. V. 18. P. 41 - 50.*
37. *Merchat M., Spikes J. D., Bertoloni G., Jori G. // J. Photochem. Photobiol. B – Biol. 1996. V. 35. P. 149 - 157.*
38. *Verlhac J.-B., Gaudemer A., Craljic I. // Nouv. J. Chim. 1984. V. 8. P. 401 - 406.*
39. *Rodgers M. A. J. / Singlet oxygen quantum yields, in Light-Activated Pesticides, ACS Symp. Series. Washington, 1987. P. 76 - 97.*
40. *Wilkinson F., Helman W. P., Ross A. B. // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1993. V. 22. P. 113 - 262.*
41. *Салохиддинов К. И., Джагаров Б. М., Бытева И. М. // Оптика и спектроскопия. 1979. Т. 47. С. 881 - 886.*
42. *Salokhiddinov K. I., Dzhagarov B.M., Byteva I.M., Gurinovich G.P. // Chem. Phys. Letters. 1980. V. 76. P. 85 - 87.*
43. *Vergeldt F. J., Koehorst R. B. M., Van Hoek A., Schaafsma T. // J. Phys. Chem. 1995. V. 99. P. 4397-4405.*
44. *Knibbe H., Rehm D., Weller A. // Ber. Bunsenges Phys. Chem. 1968. V. 72. P. 257 - 263.*
45. *Seidel C. A. M., Schulz A., Sauer M. H. M. // J. Phys. Chem. 1996. V. 100. P. 5541 - 5553.*
46. *Williams R. F. X., Hambright P. // Bioinorg. Chem. 1978. V. 9. P. 537 - 544.*
47. *Reichardt C. // Chem. Rev. 1994. V. 94. P. 2319 - 2358.*
48. *Lippert E. // Z. Naturforsch. 1955. B. 10a. S. 541 - 545.*
49. *Mataga N., Kaifu Y., Koizumi M. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1955. V. 28. P. 690 - 691.*
50. *Райхардт К. Растворители и эффекты среды в органической химии. М.: Мир, 1991. 763 с.*
51. *Гаель В. И., Кузьмицкий В. А., Соловьев К. Н. // Журн. прикл. спектроскопии 1996. Т. 63. С. 932-942.*
52. *Takashima S., Casaleggio A., Giuliano F., Morando M., Arrigo P., Ridella S. // Biophys. J. 1986. V. 49. P. 1003 - 1007.*
53. *Zhang L., Ted Davis H., Kroll D. M., Whit H. S. // J. Phys. Chem. 1995. V. 99. P. 2878 - 2881.*
54. *Hyun J.-L., Babu C. S., Ichiye T. // J. Phys. Chem. 1995. V. 99. P. 5187 - 5192.*
55. *Kalyanasundaram K., Neumann-Spallart M. // J. Phys. Chem. 1982. V. 86. P. 5163 - 5169.*
56. *Kalyanasundaram K. // Inorg. Chem. 1984. V. 23. P. 2453 - 2459.*
57. *Lee P. C. C., Rodgers M. A. J. // Photochem. Photobiol. 1987. V. 45. P. 79 - 86.*

58. *Bonneau R., Pottier R., Bagno O., Joussot-Dubien J.* // Photochem. Photobiol. 1975. V. 21. P. 159 - 163.
59. *Wilkinson F., McGarvey D. J., Olea A. F.* // J. Phys. Chem. 1994. V. 98. P. 3762 - 3769.
60. Джагаров Б. М., Гуринович Г. П., Новиченков В. Е., Салохиддинов К. И., Шульга А. М., Ганжа В. А. // Химическая физика. 1987. Т. 6. С. 1069 - 1078.
61. *Prat F., Hou Chi-Chien, Foote C. S.* // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 119. P. 5051 - 5052.