

к возрастанию степени поляризации флуоресценции. Наблюдаемая на опыте деполаризация свечения в области длинноволновой полосы может быть объяснена, на наш взгляд, только образованием молекулами скрученной конфигурации. В этом случае направления дипольных моментов электронных переходов, ответственных за полосы поглощения и испускания, будут отличаться друг от друга, что приведет к уменьшению степени поляризации флуоресценции.

Таким образом, полученные результаты подтверждают предположение об образовании в этанольном растворе молекулой DMA-PODP скрученной конфигурации с внутримолекулярным переносом заряда (TICT-состояние).

1. Lippert E., Luder W., Boos H. // *Advances in molecular spectroscopy*. Oxford, 1962. P.443.
2. Rotkiewicz K., Grellmann K.H., Grabovsky Z.R. // *Chem. Phys. Lett.* 1973. Vol.19. P.315.
3. Rotkiewicz K., Grabovsky Z.R., Jasny J. // *Chem. Phys. Lett.* 1975. Vol.35. P.55.
4. Клищенко А.П., Сеньюк М.А., Тихомиров С.А., Толсторожев Г.Б. // *Оптика и спектроскопия*. 1997. Т.83. С. 664.
5. Борисевич Н.А., Казберук Д.В., Мельничук С.В. и др. // *Журн. прикл. спектроскопии*. 1995. Т. 62. С. 49.
6. Грузинский В.В., Сеньюк М.А., Козлов И.Н. и др. // *Оптика атмосферы и океана*. 1993. Т.6. С.313.
7. Rotkiewicz K., Grabovsky Z.R., Krowczynski A., Kuhnle W. // *J. Luminescence*. 1976. Vol. 12-13. P.877.
8. Гайсенек В.А., Жолнеревич И.И., Саржевский А.М. // *Оптика и спектроскопия*. 1980. Т.49. С.714.

Поступила в редакцию 08.02.99.

УДК 535.33/.34:621.373.82 6

И.В.САЗАНОВИЧ

ФОТОФИЗИКА КАТИОННОГО Со-ПОРФИРИНА, ВСТРОЕННОГО В ДНК-МОДЕЛИРУЮЩИЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ

The types of the ground state interactions and excited states dynamics of the complexes of the water-soluble cationic cobalt(II) and cobalt(III) 5,10,15,20-tetrakis[4-(N-methylpyridyl)] porphyrins (Co(II)P and Co(III)P) with *Calf Thymus* DNA, poly(dA-dT) and poly(dG-dC) have been investigated by using ground state absorption and circular dichroism and time-resolved picosecond transient absorption (TA) techniques.

Активное изучение комплексов порфиринов с нуклеиновыми кислотами обусловлено двумя основными их приложениями. Первое — это использование порфиринов в качестве фотосенсибилизаторов для селективной фотодеструкции ДНК [1–3]. Второе приложение — использование порфиринов в качестве зондов для исследования ближайшего окружения в их комплексах с ДНК [4, 5].

Оказалось, что возбужденные электронные состояния порфиринов и металлопорфиринов более чувствительны к окружению в составе комплексов с ДНК и к его изменению, нежели основное состояние [6–8]. Именно поэтому использование знаний по фотофизике порфиринов позволяет получать более подробную информацию о взаимодействии порфиринов с ДНК и значительно расширяет применение порфиринов в качестве зонда на ближайшее окружение. Ранее была изучена фотофизика комплексов ДНК с водорастворимым катионным 5,10,15,20-тетракис(4-N-метилпиридил) порфирином (сокращенно $H_2(TMPy-P4)$) [7] и с металлопорфиринами $Cu(TMPy-P4)$ [6] и $Ni(TMPy-P4)$ [8]. Целью данной работы явилось изучение связывания кобальтового производного $Co(TMPy-P4)$ от $H_2(TMPy-P4)$ с ДНК и ДНК-моделирующими полинуклеотидами, выяснение природы и

свойств возбужденных состояний указанных комплексов, поскольку в литературе данные сведения отсутствуют.

Материал и методика

$\text{Co}(\text{TMPy-P4})$ синтезирован по методике, описанной в [9, 10]. Использовались ДНК, $\text{poly}(\text{dG-dC})$ и $\text{poly}(\text{dA-dT})$ фирмы Sigma Chemical Co без какой-либо дополнительной очистки. Все эксперименты проводились при комнатной температуре в фосфатном буфере с $\text{pH}=6,8$ и ионной силой $\mu=0,03$. Образцы были приготовлены смешиванием раствора порфирина с раствором соответствующего полинуклеотида. Концентрация молекул порфирина составляла около 5×10^{-5} М/л и контролировалась спектрофотометрически, при этом использовались опубликованные значения коэффициентов экстинкции [5]. Молярное отношение оснований полинуклеотидов и ДНК к порфируну составляло порядка 30.

Нами измерялись сигналы наведенного просветления или поглощения на кинетическом абсорбционном спектрометре с пикосекундным временным разрешением, описанном в [6]. Для возбуждения растворов образцов применялась вторая гармоника неодимового лазера (длина волны 540 нм, длительность импульса ~ 12 пс), зондирование производилось с помощью оптического параметрического генератора с температурной перестройкой длины волны в пределах полосы поглощения $\text{Co}(\text{TMPy-P4})$, с максимумом вблизи 435 нм. Все измерения производились во вращаемых кварцевых кюветах толщиной 1 мм в необескислороженных растворах.

Результаты и их обсуждение

Встраивание $\text{Co}(\text{TMPy-P4})$ в ДНК и ДНК-моделирующие полинуклеотиды. Для исследования типов встраивания $\text{Co}(\text{TMPy-P4})$ в ДНК и ДНК-моделирующие полинуклеотиды измерялись спектры поглощения и кругового дихроизма $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ и $\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$ в ДНК, $\text{poly}(\text{dG-dC})$ и в буферном растворе (для сравнения). Полученные спектры для $\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$ представлены на рис.1.

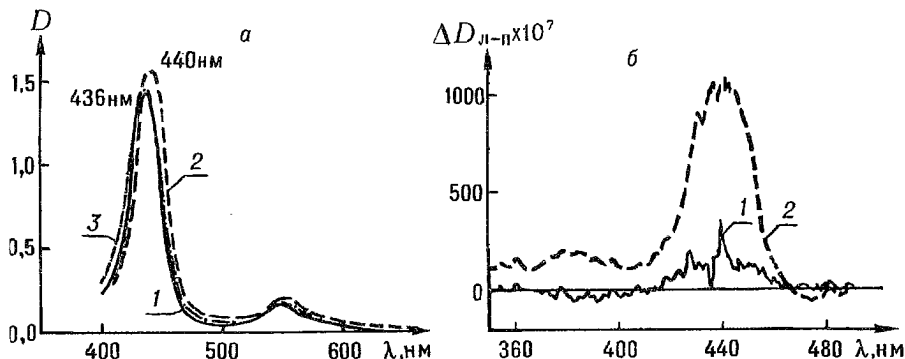


Рис. 1. Спектры поглощения (а) и кругового дихроизма (б) для Co^{3+} -порфирина в $\text{poly}(\text{dG-dC})$ (1), в ДНК (2) и в водном буфере (3)

$\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$. Для $\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$ в $\text{poly}(\text{dG-dC})$ не было обнаружено сдвига максимума полосы поглощения Соре (вблизи 435 нм) относительно его положения в водном буфере. Максимум полосы поглощения Соре для $\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$ в ДНК (см.рис.1) смещен на 4 нм в красную область и имеет меньшую амплитуду по сравнению со спектром в буферном растворе, т.е. имеет место гипохромизм полосы Соре [4-5]. Кроме того, наблюдался положительный сигнал кругового дихроизма для $\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$ в ДНК и отсутствие отрицательного сигнала кругового дихроизма для $\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$ в $\text{poly}(\text{dG-dC})$ (рис.1). Подобные спектральные изменения известны [4,5], на их основании мы делаем вывод о внешнем связывании $\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$ в А-Т-парах и отсутствии интеркаляции в G-C-пары.

$\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$. Величина поглощения в максимуме для $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в ДНК оказалась больше, чем для $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в буферном растворе. Для $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в $\text{poly}(dG-dC)$ максимум полосы поглощения Co^{2+} смещен примерно на 6 нм в красную область и имеет меньшую амплитуду по сравнению со спектром поглощения $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в буферном растворе и в ДНК. Для $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в ДНК и в $\text{poly}(dG-dC)$ наблюдались отрицательные сигналы кругового дихроизма, для $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в ДНК дополнительно имеет место положительный сигнал (спектры поглощения и кругового дихроизма не приведены). Опираясь на опубликованные сведения [4, 5], из полученных нами результатов мы делаем вывод о наличии интеркаляции $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в G-C-положения и внешнего встраивания в A-T-положения.

Фотофизика $\text{Co}(\text{TMPy-P4})$ с ДНК и ДНК-моделирующими полинуклеотидами. Нами измерены кинетики заселения и дезактивации возбужденных электронных состояний $\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$ в буфере и в ДНК, $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в $\text{poly}(dG-dC)$ и $\text{poly}(dA-dT)$.

$\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$. Для $\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$ в буферном растворе и в ДНК наблюдался один короткоживущий сигнал (о его длительности будет сказано далее). Были получены дифференциальные спектры абсорбционных изменений и на их основании восстановлены абсолютные спектры поглощения образцов в нестационарном состоянии, измеренные при определенной временной задержке. Пример дифференциального и абсолютного спектров поглощения для $\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$ в ДНК приведен на рис.2. Абсолютные спектры поглощения возбужденных молекул $\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$ в ДНК и в буферном растворе подобны спектрам поглощения в основном состоянии, но смещены по длине волны (см.рис.2). Более того, нет признаков наличия значительного поглощения в области между полосой поглощения Co^{3+} (435 нм) и более длинноволновой Q-полосой (550 нм). Указанные особенности известны в литературе [6, 11–13], и на их основании мы приписываем короткоживущий сигнал, наблюдавшийся для $\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$ в буферном растворе и в ДНК, порфирину в (d,d)-состоянии (т.е. состоянии с возбуждением электрона между d -орбиталями иона металла). Этот сигнал возникает со скоростью возбуждающего импульса и имеет длительность около 6 пс для $\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$ в буферном растворе и 10 пс — в ДНК.

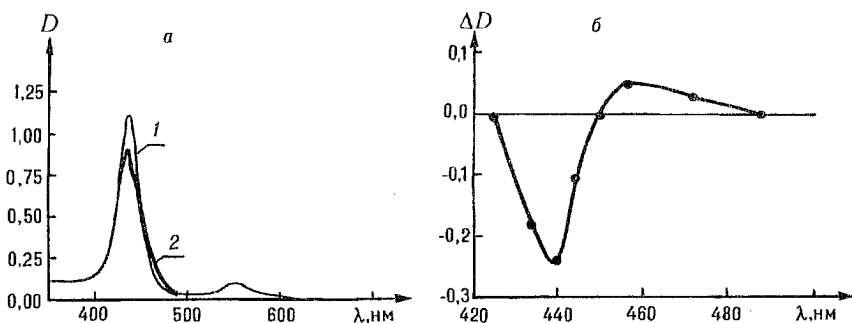


Рис.2. Спектры поглощения Co^{3+}P в ДНК:

a — в основном состоянии (1) и восстановленный спектр поглощения в короткоживущем состоянии (2), b — дифференциальный спектр без временной задержки

$\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$. При исследовании $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в $\text{poly}(dG-dC)$ и в $\text{poly}(dA-dT)$ кроме короткоживущего сигнала наблюдался сигнал, соответствующий долгоживущему возбужденному состоянию $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в $\text{poly}(dG-dC)$ и в $\text{poly}(dA-dT)$ (длительность лежит в нс-диапазоне — см. далее). Судя по форме полученных абсолютных спектров поглощения образцов в возбужденном короткоживущем состоянии (пример такого спектра для $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в $\text{poly}(dA-dT)$ — на рис.3), в данном случае мы имеем дело с (π, π^*)-состоянием. Особенностью спектра в таком состоянии является пологая и широкая полоса так называемого “триплетного” поглощения [6,

12, 13], которая простирается в длинноволновую область от полосы поглощения Соре вплоть до Q-полосы поглощения. Похожее поглощение мы обнаружили в своих результатах (см.рис.3). О природе долгоживущего сигнала для $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в poly(dA-dT) и poly(dG-dC) с определенностью сейчас судить сложно, так как для этого пока еще недостаточно данных. Но наша рабочая гипотеза состоит в том, что данное долгоживущее состояние является (d, d)-состоянием.

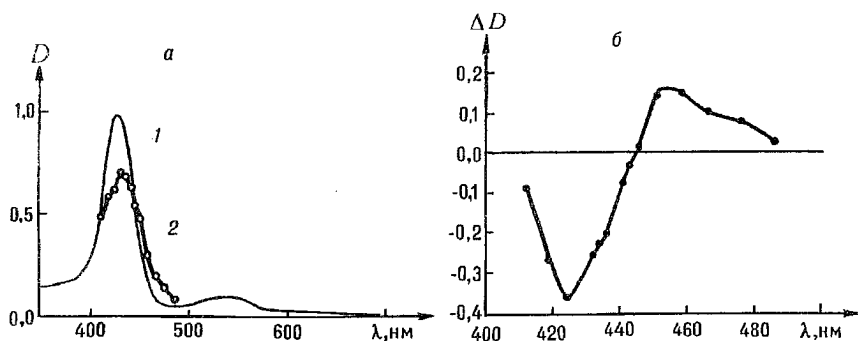


Рис.3. Спектры поглощения для Co^{2+}P в poly(dA-dT) :

a — в основном состоянии (1) и восстановленный спектр поглощения в долгоживущем состоянии (2), б — дифференциальный спектр, временная задержка 7 пс

Было оценено время жизни короткоживущего состояния: для $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в poly(dA-dT) оно составляет порядка 10 пс, для $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в poly(dG-dC) — порядка 6 пс. Также сделана оценка времени жизни долгоживущей составляющей, которая присутствует в сигналах для $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в poly(dA-dT) и в poly(dG-dC) . Это время приблизительно равно 10 нс для $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в poly(dA-dT) и 3 нс для $\text{Co}^{2+}(\text{TMPy-P4})$ в poly(dG-dC) .

Таким образом, установлена зависимость времени жизни возбужденных состояний Co^{2+} - и $\text{Co}^{3+}(\text{TMPy-P4})$ от окружения, которая дает основания для использования данных порфиринов в качестве зондов, так как позволяет судить о локализации порфирина в ДНК.

Финансовая поддержка работы осуществлялась Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований, грант №М96-028.

1. Matthews J.L., Newman J.T., Sogandares-Bernal F. et al. // Transfusion. 1988. Vol.28. P.81.
2. Rywkin, S., Lenny, L., Goldstein J. et al. // Photochem. Photobiol. 1992. Vol.56. P.463.
3. Kasturi C., Platz M.S. // Ibid. 1992. Vol.56. P.427.
4. Fiel R.J. // Biomol. Struct. Dynamics. 1989. Vol.6. P.1259.
5. Pasternack R.F., Gibbs E.J., Villafranca J.J. // Biochem. 1983. Vol.22. P.2406.
6. Kruglik S.G., Galievsky V.A., Chirvony V.S. et al. // J. Phys. Chem. 1995. Vol.99. P.5732.
7. Chirvony V.S., Galievsky V.A., Kruk N.N. et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1997. Vol.40. P.154.
8. Galievsky V.A., Chirvony V.S., Kruglik S.G. et al. // J. Phys. Chem. 1996. Vol.100. P.12649.
9. Pasternack R.F., Sprio E.G., Teach M. // J. Inorg. Nucl. Chem. 1974. Vol.36. P.599.
10. Pasternack R.F., Lee H., Malek P., Spencer C. Ibid. 1977. Vol.39. P.1865.
11. Tait C.D., Holten D., Gouterman M. // Chem. Phys. Lett. 1983. Vol.100. P.268.
12. Kruglik S.G., Ermolenkov V.V., Shvedko A.G. et al. // Ibid. 1997. Vol.270. P.293.
13. Джагаров Б.М., Чирвоний В.С., Гуринович Г.П. // Пикосекундная спектроскопия и фотохимия биомолекул /Под ред. В.С. Летохова. М., 1987.

Поступила в редакцию 22.02.99.