

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна робота  
На правах рукопису

**КАЗАКОВ-КРАВЧЕНКО ОЛЕКСАНДР СЕРГІЙОВИЧ**

УДК 576.31; 577.336; 612.086; 667.287

**ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ЦІАНІНОВІ БАРВНИКИ ДЛЯ АНАЛІЗУ  
НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ПЛР**

091 – Біологія

09 – Біологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Казаков-Кравченко Олександр Сергійович

Науковий керівник:

Ярмолюк Сергій Миколайович, член-кореспондент НАН України, доктор  
хімічних наук, професор

Київ 2026

## АНОТАЦІЯ

*Казаков-Кравченко О.С.* Флуоресцентні ціанінові барвники для аналізу нуклеїнових кислот методом ПЛР. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеню доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2026.

Сучасний розвиток молекулярної біології, біотехнології та біомедицини зумовлює зростаючу потребу у вдосконаленні методів детекції нуклеїнових кислот і білків. Одним із найважливіших інструментів таких досліджень є флуоресцентна візуалізація, ефективність якої значною мірою визначається властивостями використовуваних флуоресцентних барвників. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) у реальному часі є одним із основних методів для кількісного аналізу нуклеїнових кислот. Важливим компонентом цього методу є флуоресцентні репортери, що забезпечують реєстрацію накопичення продуктів ампліфікації в режимі реального часу. Водночас комерційні барвники, зокрема SYBR Green I, характеризуються низкою обмежень, серед яких висока вартість та відсутність вітчизняних аналогів, що обумовлює актуальність пошуку нових флуоресцентних репортерів. Перспективними кандидатами для таких застосувань є ціанінові барвники, які характеризуються інтенсивним поглинанням, значним підсиленням флуоресценції при взаємодії з нуклеїновими кислотами та широкими можливостями структурної модифікації. Разом із тим, закономірності впливу хімічної структури нових ціанінових барвників на їх спектрально-люмінесцентні властивості та придатність до використання у ПЛР залишаються недостатньо вивченими. У зв'язку з цим **метою роботи** було дослідження спектрально-люмінесцентних характеристик серії ціанінових барвників у присутності нуклеїнових кислот і білків, встановлення взаємозв'язку між структурою та властивостями барвників, а

також оцінка перспектив їх використання як флуоресцентних репортерів у ПЛР у реальному часі.

Досліджено спектрально-люмінесцентні характеристики близько 80 флуоресцентних барвників, що належать до класів монометинових і триметинових ціанінів, а також діоксоборонових аддуктів мероціанінових барвників у вільному стані та в присутності нуклеїнових кислот і білків. Встановлено, що взаємодія барвників з біополімерами супроводжується суттєвим приростом інтенсивності флуоресценції, що може бути зумовлено обмеженням внутрішньомолекулярної рухливості хромофора. Показано, як приріст інтенсивності флуоресценції визначається структурними особливостями барвників, зокрема природою гетероциклічних фрагментів, довжиною поліметинового ланцюга та наявністю замісників.

На серії симетричних триметинціанінових бензтіазолових барвників показано, як замісники у  $\beta$ -положенні поліметинового ланцюга, бензольних фрагментах бензотіазольних ядер та N-алкільні замісники впливають на інтенсивність флуоресценції барвників у вільному та зв'язаному з біополімерами стані. Найвищий рівень флуоресценції виявили барвники без замісника в  $\beta$ -положенні, однак присутність нуклеїнових кислот чи білків не надавала їхній флуоресценції помітного приросту. На противагу – триметинціаніни з алкільним замісником у  $\beta$ -положенні помітно втрачають інтенсивність флуоресценції у незв'язаному стані, натомість повертають її в присутності біополімерів майже до рівня аналогів незаміщених у  $\beta$ -положенні.

Найбільший приріст інтенсивності флуоресценції спостерігається для барвників, що містять гідроксильні групи у бензотіазольних фрагментах ( $\Delta Q \approx 280$ ). Водночас для барвників з метоксильними групами в аналогічних положеннях приріст інтенсивності флуоресценції є дещо нижчим ( $\Delta Q \approx 71$ ). Це можна пояснити здатністю гідроксильних груп утворювати водневі зв'язки з азотистими основами та фосфатним остовом нуклеїнових кислот, що додатково стабілізує комплекс і підвищує жорсткість системи. Натомість барвники з

довгими N-алкільними замісниками характеризуються значно вищою інтенсивністю флуоресценції при взаємодії з альбумінами ( $\Delta Q \approx 34-78$ ). Ймовірно, це пов'язано з тим, що їхні гідрофобні N-алкільні замісники сприяють гідрофобній взаємодії барвників з білками, що призводить до кращої фіксації молекул барвника. Таким чином, показано, що варіація замісників істотно впливає на інтенсивність флуоресценції ціанінових барвників.

У наступній серії досліджень вивчено діоксаборонові аддукти мероціанінів та кетенолів. Характерною структурною особливістю цих сполук є наявність діоксаборонового фрагмента, який власною жорсткою циклічною структурою підвищує жорсткість всієї спряженої хромофорної  $\pi$ -системи та обмежує безвипромінювальну дезактивацію. Показано, що барвники цієї серії демонструють значний приріст інтенсивності флуоресценції у присутності альбуміну ( $\Delta Q \approx 62$ ), тоді як при взаємодії з ДНК флуоресцентна відповідь виявилась суттєво нижчою ( $\Delta Q \approx 0,8-3,2$ ), а в окремих сполук інтенсивність флуоресценції, навпаки, спадала, що, ймовірно, зумовлено посиленням агрегації барвників у присутності ДНК. Таким чином, отримані результати свідчать про обмежену придатність барвників цієї серії для детекції нуклеїнових кислот.

У завершальній серії досліджень вивчено вісім монометинціанінових барвників. Показано, що барвники з просторовими перешкодами планарній структурі хромофорної системи демонструють низьку власну флуоресценцію та значне підвищення інтенсивності флуоресценції у присутності альбуміну ( $\Delta Q \approx 58$ ), і, особливо, у присутності з ДНК, так барвник **fb128** продемонстрував при додаванні ДНК  $\Delta Q \approx 160$  при найвищій серед досліджених барвників інтенсивності. Монометинціанінові барвників загалом продемонстрували найбільший приріст інтенсивності флуоресценції серед досліджених у присутності з ДНК. Четвертинні амонієві групи на N-алкільних замісниках очікувано сприяють зв'язуванню барвників з ДНК і РНК, а, отже й приросту флуоресценції, а коли дві молекули барвника поєднано лінкером з

четвертинними амонійними групами в димер - зв'язування з ДНК і РНК сприяє зменшенню агрегації і пов'язаного з агрегацією гасіння флуоресценції.

Серед досліджених барвників найбільшу інтенсивність флуоресценції при найвищому її прирості у присутності з ДНК проявив барвник **fb128** ( $I = 2000$  в.о.  $\Delta Q \approx 160$ ). Досліджено параметри, що визначають придатність барвника **fb128** до використання як флуоресцентного зонда в ПЛР у реальному часі. Встановлено, що оптимальний робочий діапазон його концентрацій становить  $0,2\text{--}2 \mu\text{M}$ , у межах якого забезпечувалася достатня інтенсивність флуоресцентного сигналу без помітного інгібування ампліфікації. Показано, що в зазначеному концентраційному діапазоні **fb128** практично не впливав на температуру плавлення ампліконів – максимальне зміщення температури плавлення становило близько  $0,5^\circ\text{C}$ , що свідчило про мінімальний вплив барвника на термодинамічні властивості ДНК-дуплексу. Оцінка ефективності ампліфікації за допомогою стандартних кривих для різних ампліконів показала високу ефективність ПЛР ( $\approx 102\text{--}103\%$ ) та хорошу лінійність залежності  $C_t$  від концентрації ДНК. Нахил стандартних кривих ( $\approx -3,26$ ) був близьким до теоретичного значення  $-3,32$ , що відповідає майже ідеальній ефективності ампліфікації. Аналіз «умовно невідомих» зразків продемонстрував високу точність визначення концентрації ДНК, із статистично незначущими відхиленнями між експериментальними і розрахунковими значеннями  $C_t$ . Важливо, що концентрації «умовно невідомих» зразків, визначені за допомогою стандартних кривих, побудованих із використанням **fb128**, добре узгоджувалися з даними, отриманими на комерційних системах SYBR Green та EvaGreen, що свідчило про сумісність та коректність кількісної детекції з використанням **fb128** на стандартному обладнанні. Результати демонструють, що монометинціаніновий барвник **fb128** поєднує високу чутливість флуоресцентної детекції ДНК з мінімальним впливом на перебіг ампліфікації, що робить його перспективним реагентом для кількісної ПЛР у реальному часі порівняним за

аналітичними характеристиками з комерційними барвниками типу SYBR Green та EvaGreen.

Отримані результати розширюють уявлення про взаємодію поліметинових барвників з біологічними макромолекулами та підтверджують перспективність їх використання як флуоресцентних зондів для детекції нуклеїнових кислот і білків, зокрема як флуоресцентних репортерів у ПЛР у реальному часі. Практичне значення роботи полягає у можливості використання досліджених барвників для створення нових ефективних флуоресцентних систем детекції нуклеїнових кислот, у тому числі для застосування в ПЛР, що сприятиме розвитку біотехнологічної галузі України та зменшенню імпортозалежності.

Ключові слова: флуоресцентні барвники, спектрально-люмінесцентні властивості, флуоресцентна спектроскопія, нуклеїнові кислоти, альбумін, флуоресценція, зв'язування з ДНК, ПЛР у реальному часі, кількісна ПЛР, біотехнологія.

### **Список публікацій здобувача за темою дисертації**

1. Kazakov-Kravchenko O. S., Balanda A., Losytskyu M., Yarmoluk S. “Effect of DNA, RNA and HSA on the spectral-luminescent properties of several monomethine cyanine dyes” *Biopolymers and Cell*, 2025, 41(2), 121-129; <https://doi.org/10.7124/bc.000B16> . *(Особистий внесок – аналіз даних літератури, дослідження властивостей монометинціанінових барвників методом флуоресцентної спектроскопії, обробка та аналіз зображень, аналіз отриманих результатів, написання чернетки рукопису, підготовка до подання)*
2. Kazakov-Kravchenko O. S., Losytskyu M., Polishchuk V. M., Kulinich A. V., Shandura M.P., Yarmoluk S. “Spectral-fluorescent response of dioxaborine dyes with varying chromophore charge in the presence of serum albumins” *Biopolymers and Cell*, 2025; 41(3); 222-230; <https://doi.org/10.7124/bc.000B1A> *(Особистий внесок – дослідження спектрально-люмінесцентних властивостей діоксаборонових*

*барвників методом флуоресцентної спектроскопії, обробка та аналіз зображень, аналіз отриманих результатів, написання чернетки рукопису, підготовка до подання)*

3. Kazakov-Kravchenko O. S., Kravchenko S. A., Yarmoluk S. M. “Evaluation of the monomethine cyanine dye FB128 for real-time PCR applications” *Biopolymers and Cell*, 2025, 41(4), 300-308. <https://doi.org/10.7124/bc.000B2C> – *(Особистий внесок – дослідження спектрально-люмінесцентних властивостей монометинціанінового барвника методом флуоресцентної спектроскопії пробопідготовка барвників для проведення ПЛР, дослідження параметрів ПЛР з використанням барвників, підготовка до подання)*

4. Kazakov-Kravchenko O.S., Losytskyu M.Yu., Derevyanko N.A., Kulinich A.V., Shandura M.P., Yarmoluk S.M. (2026) Substituent effects in thiocarbocyanine dyes on their spectral-fluorescent response in the presence of nucleic acids and serum albumins. *Biopolymers & Cell*, 2(42), 139—149. <https://doi.org/10.7124/bc.000B39> – *(Особистий внесок – аналіз даних літератури, дослідження спектрально-люмінесцентних властивостей монометинціанінових барвників методом флуоресцентної спектроскопії, обробка та аналіз зображень, аналіз отриманих результатів)*

5. Kazakov-Kravchenko O. S., Yarmoluk S. M. Fluorescent properties of 1,3,2-dioxaborine polymethine dyes upon interaction with albumins. *Book of Abstracts of the VIII International (XVIII Ukrainian) Scientific Conference for Students and Young Scientists “Current Chemical Problems”*, March 25–27, 2025, Vinnytsia, Ukraine, P. 30.

6. Kazakov-Kravchenko O. S., Polishchuk V. M., Shandura M. P., Yarmoluk S. M. Spectral-luminescent properties of cyanine dyes for nucleic acid detection. *Abstracts of the IX International (XIX Ukrainian) Scientific Conference for Students, Postgraduates and Young Scientists “Current Chemical Problems” (CCP-2026)*, March 24–26, 2026, Vinnytsia, Ukraine, P. 19.

## SUMMARY

*Kazakov-Kravchenko O.S.* Fluorescent cyanine dyes for nucleic acid analysis by polymerase chain reaction (PCR) – Qualification scientific work on the right of a manuscript.

Dissertation submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy (091 Biology). – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2026.

Advances in molecular biology, biotechnology and molecular diagnostics are driving a growing need to improve methods for detecting nucleic acids and proteins. One of the most important tools in such research is fluorescent imaging, the effectiveness of which is largely determined by the properties of the fluorescent dyes used. Real-time polymerase chain reaction (PCR) is one of the main methods for the quantitative analysis of nucleic acids. An important component of this method is fluorescent reporters, which enable the real-time detection of amplification products. However, commercially available DNA-binding dyes, particularly SYBR Green I, possess several limitations, including high cost and the absence of domestic alternatives, highlighting the need for the development of new fluorescent reporters. Cyanine dyes represent promising candidates for such applications due to their strong absorption, substantial fluorescence enhancement upon binding to nucleic acids, and broad possibilities for structural modification. Nevertheless, the relationships between the chemical structure of novel cyanine dyes, their spectral-fluorescent properties, and their suitability for real-time PCR applications remain insufficiently studied. Thus, **the dissertation aims** to investigate the spectral-fluorescent characteristics of a series of cyanine dyes in the presence of nucleic acids and proteins, to establish structure–property relationships, and to evaluate their potential as fluorescent reporters for real-time PCR.

The spectral-fluorescent characteristics of approximately 80 fluorescent dyes belonging to the classes of monomethine and trimethine cyanines, as well as

dioxaborine adducts of merocyanine dyes, were investigated in the free state and in the presence of nucleic acids and proteins. Interaction of the dyes with biomolecules resulted in significant fluorescence enhancement may be caused by restriction of intramolecular chromophore mobility. It was shown how fluorescence response depends on the heterocyclic fragments structure, polymethine chain length and substitution.

For trimethine cyanines, substituents in the  $\beta$ -position of the polymethine chain and within benzothiazole fragments strongly affect fluorescence intensity. Dyes containing hydroxyl groups in heterocycles demonstrate the highest fluorescence enhancement in presence of nucleic acids ( $\Delta Q \approx 280$ ), dyes bearing methoxy groups at analogous positions exhibit a lower fluorescence enhancement ( $\Delta Q \approx 71$ ), whereas dyes with long N-alkyl substituents exhibit increased fluorescence upon interaction with albumins ( $\Delta Q \approx 34\text{--}78$ ). This observation is likely associated with enhanced hydrophobic interactions between the N-alkyl chains and protein binding sites, resulting in more effective immobilization of the dye molecules. Thus, it was demonstrated that variation of substituents has a pronounced effect on the fluorescence response of cyanine dyes.

Dioxaborone dyes show strong fluorescence enhancement with albumin ( $\Delta Q \approx 62$ ), whereas their fluorescence response upon interaction with DNA was considerably lower ( $\Delta Q \approx 0.8 - 3.2$ ). Moreover, for some compounds, fluorescence intensity decreased in the presence of DNA, which is likely attributable to enhanced dye aggregation induced by DNA binding. These findings indicate the limited suitability of this class of dyes for nucleic acid detection.

In the final stage of the study, eight monomethine cyanine dyes were investigated. Dyes possessing structural features that reduce the planarity of the chromophore system exhibited low intrinsic fluorescence and a pronounced fluorescence enhancement in the presence of albumin ( $\Delta Q \approx 58$ ) and, in particular, nucleic acids. Among them, dye **fb128** demonstrated a fluorescence enhancement of

approximately 160-fold upon binding to DNA while maintaining the highest fluorescence intensity among the compounds studied. Overall, monomethine cyanine dyes showed the greatest fluorescence enhancement in the presence of DNA compared with the other dye classes investigated. Quaternary ammonium groups in the N-alkyl substituents promoted binding to DNA and RNA, thereby increasing fluorescence intensity. Furthermore, in dimeric dyes containing two chromophores linked through quaternary ammonium-containing spacers, binding to nucleic acids reduced dye aggregation and the associated fluorescence quenching.

Among all investigated compounds, **fb128** exhibited the highest fluorescence intensity and one of the largest fluorescence enhancements in the presence of DNA ( $I \approx 2000$  a.u.;  $\Delta Q \approx 160$ ). The parameters determining its suitability as a fluorescent reporter for real-time PCR were therefore investigated in detail. The optimal working concentration range was found to be 0.2–2  $\mu\text{M}$ , within which sufficient fluorescence signal was achieved without appreciable inhibition of amplification. Within this concentration range, **fb128** exerted only a minimal effect on amplicon melting temperature, with the maximum shift not exceeding  $0.5^\circ\text{C}$ , indicating negligible influence on the thermodynamic stability of the DNA duplex.

Evaluation of amplification performance using standard curves for different amplicons demonstrated high PCR efficiency (approximately 102 – 103%) and good linearity of the relationship between Ct values and DNA concentration. The slopes of the standard curves (approximately  $-3.26$ ) were close to the theoretical value of  $-3.32$  corresponding to nearly ideal amplification efficiency. Analysis of “pseudo-unknown” samples revealed high accuracy of DNA quantification, with no statistically significant differences between observed and expected Ct values. Importantly, DNA concentrations determined using fb128-based standard curves showed good agreement with results obtained using the commercial dyes SYBR Green and EvaGreen, demonstrating the compatibility and reliability of quantitative detection with **fb128** on standard real-time PCR platforms. These results indicate that

the monomethine cyanine dye **fb128** combines high sensitivity of DNA fluorescence detection with minimal interference with the amplification process, making it a promising reagent for quantitative real-time PCR with analytical performance comparable to that of commercial dyes such as SYBR Green and EvaGreen.

Obtained results expand current understanding of polymethine dye interactions with biological macromolecules and confirm the good prospects of cyanine dyes as fluorescent probes for nucleic acid and protein detection, particularly for real-time PCR applications. The practical significance of the work is associated with the establishment of structure–property relationships that may facilitate the rational design of novel fluorescent reporters for nucleic acid detection, including real-time PCR applications. The obtained results may contribute to the advancement of molecular diagnostic and biotechnological approaches, as well as support the development of domestically produced fluorescent reagents, thereby reducing reliance on imported diagnostic products.

Keywords: fluorescent dyes, spectral luminescent properties, fluorescence spectroscopy, nucleic acids, albumin, fluorescence, DNA binding, real-time PCR, quantitative PCR, biotechnology.

### **List of publications on the topic of the dissertation**

1. Kazakov-Kravchenko O. S., Balanda A., Losytskyy M., Yarmoluk S. “Effect of DNA, RNA and HSA on the spectral-luminescent properties of several monomethine cyanine dyes” *Biopolymers and Cell*, 2025, 41(2), 121-129; <https://doi.org/10.7124/bc.000B16>.

2. Kazakov-Kravchenko O. S., Losytskyy M., Polishchuk V. M., Kulinich A. V., Shandura M.P., Yarmoluk S. “Spectral-fluorescent response of dioxaborine dyes with varying chromophore charge in the presence of serum albumins” *Biopolymers and Cell*, 2025; 41(3); 222-230; <https://doi.org/10.7124/bc.000B1A>

3. Kazakov-Kravchenko O. S., Kravchenko S. A., Yarmoluk S. M. “Evaluation of the monomethine cyanine dye FB128 for real-time PCR applications” *Biopolymers and Cell*, 2025, 41(4), 300-308; <https://doi.org/10.7124/bc.000B2C>
4. Kazakov-Kravchenko O.S., Losytskyy M.Yu., Derevyanko N.A., Kulinich A.V., Shandura M.P., Yarmoluk S.M. (2026) Substituent effects in thiocarbocyanine dyes on their spectral-fluorescent response in the presence of nucleic acids and serum albumins. *Biopolymers & Cell*, 2(42), 139—149. <https://doi.org/10.7124/bc.000B39>
5. Kazakov-Kravchenko O. S., Yarmoluk S. M. Fluorescent properties of 1,3,2-dioxaborine polymethine dyes upon interaction with albumins. *Book of Abstracts of the VIII International (XVIII Ukrainian) Scientific Conference for Students and Young Scientists “Current Chemical Problems”*, March 25–27, 2025, Vinnytsia, Ukraine, P. 30.
6. Kazakov-Kravchenko O. S., Polishchuk V. M., Shandura M. P., Yarmoluk S. M. Spectral-luminescent properties of cyanine dyes for nucleic acid detection. *Abstracts of the IX International (XIX Ukrainian) Scientific Conference for Students, Postgraduates and Young Scientists “Current Chemical Problems” (CCP-2026)*, March 24–26, 2026, Vinnytsia, Ukraine, P. 19.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	16
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	23
1.1. Фотофізичні та фотохімічні властивості монометинціанінових барвників	24
1.2. Взаємодія монометинціанінових барвників з нуклеїновими кислотами	28
1.2.1. Мономерні монометинціанінові барвники	28
1.2.2. Димерні монометинціанінові барвники	39
1.2.3. Агрегація монометинціанінових барвників на нуклеїнових кислотах	43
1.3. Взаємодія монометинціанінових барвників з білками	45
1.4. Використання флуоресцентних барвників для ПЛР у реальному часі	50
1.4.1. Типи флуоресцентних репортерних молекул для ПЛР у реальному часі	50
1.4.2. Використання флуоресцентних барвників для аналізу кривих плавлення продуктів ПЛР	51
1.4.3. Вплив флуоресцентних барвників на температуру плавлення ДНК та на інгібування ПЛР у реальному часі	52
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	55
2.1. Матеріали і реактиви	55
2.2. Приготування робочих розчинів барвників, нуклеїнових кислот і білків	56
2.3. Спектрально-люмінесцентні вимірювання	57
2.4. Полімеразна ланцюгова реакція.	57
2.5. Аналіз ПЛР-фрагментів ДНК в агарозному гелі.	58

2.6. ПЛР в реальному часі.	58
2.7. Ампліфікація ДНК <i>in vitro</i> .	59
2.8. Електрофорез продуктів ПЛР в агарозному гелі.	61
2.9. Проведення ПЛР у реальному часі та аналіз кривої плавлення.	61
2.10. Статистична обробка отриманих даних	62
<b>РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ</b>	<b>63</b>
3.1. Дослідження флуоресцентних властивостей несиметричних монометинових барвників з нуклеїновими кислотами та альбумінами	63
3.1.1. Спектральні властивості вільних барвників	68
3.1.2. Спектральні властивості барвників у присутності ДНК та РНК	72
3.1.3. Спектральні властивості барвників у присутності ЛСА	76
3.1.4. Вплив замісників на спектральні та зв'язувальні властивості монометинових ціанінових барвників	79
3.1.5. Структурні передумови взаємодії монометинових ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами	81
3.1.6. Особливості взаємодії барвників $\text{cr}385$ та $\text{cr}388$ з людським сироватковим альбуміном	83
3.1.7. Висновки до підрозділу	84
3.2. Дослідження флуоресцентних властивостей діоксоборонових барвників з нуклеїновими кислотами та альбумінами	87
3.2.1. Спектральні властивості вільних барвників	88
3.2.2. Спектральні властивості барвників у присутності альбумінів	92
3.2.3. Спектральні властивості барвників у присутності ДНК та овальбуміну	95
3.2.4. Вплив довжини та будови поліметинового ланцюга на спектральні властивості барвників	98
3.2.5. Вплив полярності розчинника та асиметрії електронної	

густина молекули на спектральні властивості барвників	99
3.2.6. Вплив структури барвників на їх взаємодію з альбумінами	102
3.2.7. Висновки до підрозділу	103
3.3. Дослідження флуоресцентних властивостей симетричних триметинціанінових барвників з нуклеїновими кислотами та альбумінами	106
3.3.1. Спектрально-люмінесцентні властивості вільних барвників	107
3.3.2. Спектрально-люмінесцентні властивості барвників у присутності нуклеїнових кислот	112
3.3.3. Спектрально-люмінесцентні властивості барвників у присутності сироваткових альбумінів	116
3.3.4. Вплив $\beta$ -заміщення триметинового ланцюга на спектральні та флуоресцентні властивості барвників	119
3.3.5. Вплив замісників у бензотіазольних фрагментах на взаємодію барвників з нуклеїновими кислотами	121
3.3.6. Вплив N-алкільних замісників на взаємодію барвників з білками	124
3.3.7. Висновки до розділу	126
3.4. Дослідження монометинціанінового барвника fb128 для застосування в плр у реальному часі	128
3.4.1. Відбір перспективних барвників за спектрально-люмінесцентними властивостями	129
3.4.2. Вплив концентрації барвника на інгібування та ампліфікаційні параметри ПЛР у реальному часі	131
3.4.3. Аналіз кривої плавлення продуктів ПЛР	145
3.4.4. Ефективність ампліфікації та придатність fb128 для кількісної ПЛР	151
3.4.5. Висновки до розділу	156
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	159

ВИСНОВКИ	163
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	165
ДОДАТОК А	178
ДОДАТОК Б	180

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

РНК – рибонуклеїнова кислота

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

кПЛР, або ПЛР-РЧ – кількісна полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі

длДНК – дволанцюгова ДНК

олДНК – одноланцюгова ДНК

ЛСА, (HSA)– людський сироватковий альбумін

БСА, (BSA) – бичачий сироватковий альбумін

КСА, (ESA) – кінський сироватковий альбумін

OVA – (овальбумін, білок яєчного білка)

ESA – (альбумін сироватки яйця)

ДМСО – диметилсульфоксид

MeOH – метанол

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфати

Taq-ДНК-полімераза – термостабільна ДНК-полімераза *Thermus aquaticus*

Ct – пороговий цикл (cycle threshold)

Tm – температура плавлення

HRM – високороздільний аналіз кривих плавлення (High-Resolution Melting)

FRET – резонансний перенос енергії збудження (Förster Resonance Energy Transfer)

UV-Vis – ультрафіолетова та видима спектроскопія

CD – круговий дихроїзм (Circular Dichroism)

LD – лінійний дихроїзм (Linear Dichroism)

ФДТ – фотодинамічна терапія

АФК – активні форми кисню

## ВСТУП

**Актуальність роботи.** Сучасний розвиток молекулярної біології та біотехнологій зумовлює зростаючу потребу у вдосконаленні методів детекції та кількісного аналізу нуклеїнових кислот. Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі є одним із ключових інструментів молекулярної діагностики, що широко застосовується в медицині, біологічних дослідженнях та біотехнології. Важливим компонентом цього методу є флуоресцентні зонди, які забезпечують реєстрацію процесу ампліфікації в режимі реального часу.

Серед існуючих підходів значного поширення набули флуоресцентні барвники, що зв'язуються з ДНК, завдяки їх простоті використання та відносно низькій вартості порівняно з олігонуклеотидними зондами. Однак широко застосовувані барвники, такі як SYBR Green I, мають ряд обмежень, зокрема здатність інгібувати ПЛР при підвищених концентраціях, впливати на температуру плавлення ДНК та знижувати точність аналізу кривих плавлення. Це обумовлює необхідність пошуку нових флуоресцентних барвників із покращеними характеристиками.

Перспективними у цьому контексті є ціанінові барвники, які характеризуються інтенсивним поглинанням, значним приростом флуоресценції при зв'язуванні з нуклеїновими кислотами та можливістю варіювання хімічної структури. Водночас вплив структурних особливостей ціанінових барвників на параметри ампліфікації вивчений недостатньо, що обмежує можливості їх більш ефективного застосування. Поряд з тим, подальше дослідження цих закономірностей створює підґрунтя для цілеспрямованого конструювання більш ефективних флуоресцентних барвників для використання в ПЛР у реальному часі.

Особливо важливим є дослідження впливу барвників на ефективність ПЛР, значення порогового циклу ( $C_t$ ), температуру плавлення ампліконів та форму кривих плавлення, оскільки ці параметри визначають достовірність і

точність кількісного аналізу. Крім того, необхідним є підбір оптимальних концентрацій барвників, які забезпечують достатній рівень флуоресцентного сигналу без інгібування ампліфікації.

Таким чином, дослідження флуоресцентних ціанінових барвників, оцінка їх придатності до використання в ПЛР у реальному часі є актуальним науковим завданням, вирішення якого сприятиме підвищенню ефективності, чутливості та точності методів детекції нуклеїнових кислот.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та виконувалась в рамках бюджетної теми № 2.2.4.16 (№ держ. реєстрації 0122U201823) та в рамках гранту Європейського Союзу «Горизонт 2020» Науково-інноваційної програми імені Марії Склодовської-Кюрі “NoBiasFluors”, №872331 (2020 – 2024 pp.).

**Мета та завдання дослідження.** Метою роботи було вивчення спектрально-люмінесцентних характеристик серії ціанінових барвників у присутності нуклеїнових кислот та білків, аналіз впливу хімічної структури барвників на ці характеристики та оцінка перспектив застосування таких барвників як флуоресцентних репортерів у ПЛР у реальному часі.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити спектрально-люмінесцентні характеристики ціанінових барвників у вільному стані та у присутності нуклеїнових кислот і білків та виявити взаємозв'язок хімічної структури барвників з цими характеристиками.

2. Оцінити придатність досліджуваних барвників як флуоресцентних репортерів у ПЛР у реальному часі, зокрема їхній вплив на інгібування процесу ампліфікації та параметри флуоресцентної детекції.

3. Визначити оптимальні умови застосування барвників у ПЛР у реальному часі, включаючи робочий діапазон концентрацій та їхній вплив на специфічність ампліфікації.

4. Оцінити ефективність і точність кількісної ПЛР у присутності барвників та встановити ступінь узгодженості отриманих результатів із комерційними системами детекції нуклеїнових кислот.

Об'єктом дослідження є ціанінові барвники.

Предметом дослідження є спектрально-люмінесцентні властивості монометинових, триметинових та діоксоборонових ціанінових барвників у присутності нуклеїнових кислот і білків, а також вплив хімічної структури цих барвників на перебіг ПЛР.

**Методи дослідження.** У роботі використано методи спектроскопії поглинання та флуоресценції в оптичному діапазоні для дослідження спектрально-люмінесцентних властивостей барвників. Придатність барвників для детекції нуклеїнових кислот оцінювали методом ПЛР у реальному часі з аналізом ампліфікаційних кривих і кривих плавлення. Для контролю специфічності продуктів ампліфікації застосовано гель-електрофорез.

**Наукова новизна отриманих результатів.** У роботі отримано нові результати, що стосуються застосування флуоресцентних барвників для детекції нуклеїнових кислот та їх використання у полімеразній ланцюговій реакції в реальному часі. Проведено комплексне дослідження спектрально-люмінесцентних властивостей серії ціанінових та діоксоборонових барвників у різних середовищах, що дозволило оцінити їх поведінку у присутності нуклеїнових кислот і білків та визначити їх потенціал як флуоресцентних зондів.

Вперше для досліджуваної серії барвників здійснено системну оцінку їх придатності для використання у ПЛР у реальному часі. Встановлено вплив барвників на основні параметри ампліфікації, зокрема на значення порогового циклу ( $C_t$ ), ефективність ампліфікації та характер кривих плавлення продуктів ПЛР. Показано, що досліджувані барвники можуть по-різному впливати на перебіг реакції, що необхідно враховувати при їх використанні у кількісному аналізі.

Визначено вплив концентрації барвників на перебіг ПЛР у реальному часі та показано необхідність оптимізації умов реакції для забезпечення коректної детекції ампліконів. Отримано нові дані щодо впливу барвників на температуру плавлення продуктів ПЛР, що має значення для інтерпретації результатів аналізу кривих плавлення.

Вперше продемонстровано можливість використання монометинціанінового барвника **fb128** як флуоресцентного зонда у ПЛР у реальному часі та визначено умови, за яких він забезпечує ефективну детекцію продуктів ампліфікації. Показано узгодженість отриманих результатів із даними, отриманими з використанням комерційних флуоресцентних систем.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані результати розширюють наявні уявлення про застосування флуоресцентних барвників у методах молекулярної діагностики та обґрунтовують можливість розробки нових підходів до детекції нуклеїнових кислот у ПЛР у реальному часі. Показано доцільність використання досліджених барвників як альтернативних флуоресцентних зондів, а також їх придатність для відбору та оптимізації умов застосування у ПЛР. Отримані результати можуть бути використані при створенні нових тест-систем для молекулярної діагностики.

**Особистий внесок здобувача.** Основний обсяг дослідно-експериментальної роботи, обробка та аналіз отриманих результатів, їх візуалізація, аналіз літератури та планування дослідження виконувалися особисто автором або за його безпосередньої участі. Автор самостійно виконував спектрально-люмінесцентні дослідження ціанінових барвників у вільному стані та присутності біомолекул, досліджував агрегаційну поведінку барвників та утворення комплексу барвник-біомолекула, визначав значення квантового виходу та лінійного діапазону виявлення, проводив обробку зображень та аналіз колокалізації, візуалізацію даних. Обговорення спектральних даних автор проводив спільно з к.ф.-м.н. М. Ю. Лосицьким (Київський національний університет імені Тараса Шевченка). Дослідження

параметрів ПЛР з використанням серії ціанінових барвників проводили спільно з к.б.н. С. А. Кравченком (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України). Автор вдячний д.х.н., ст..д. Шандурі М.Б. (Інститут органічної хімії НАН України) за синтез барвників та обговорення їх потенційних спектрально-люмінесцентних властивостей. Планування дослідження, підтвердження результатів та формулювання висновків здійснювались спільно з науковим керівником проф., д.х.н. С. М. Ярмолюком. Отримані результати обговорювалися та публікувалися в спільних статтях. Автор висловлює щире подяку науковому керівнику та співавторам за надану допомогу в проведенні досліджень.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи доповідались на VIII International (XVIII Ukrainian) Scientific Conference for Students and Young Scientists “Current Chemical Problems” (Вінниця, Україна, 2025) та IX Міжнародній (XIX Українській) науковій конференції студентів, аспірантів і молодих учених «Хімічні проблеми сьогодення» (Вінниця, Україна, 2026).

**Публікації.** Результати дисертаційної роботи опубліковано у 4 наукових статтях та представлено у вигляді тез доповідей на 2 наукових конференціях. Основні результати досліджень висвітлено у фахових наукових виданнях *Biopolymers and Cell*, присвячених дослідженню спектрально-люмінесцентних властивостей ціанінових та діоксоборонових барвників, їх взаємодії з нуклеїновими кислотами і білками, а також оцінці перспектив використання флуоресцентних барвників у ПЛР у реальному часі. Результати роботи були апробовані на міжнародних та всеукраїнських наукових конференціях у формі усних та стендових доповідей.

**Структура та зміст дисертації.** Дисертаційна робота зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел та додатків. Роботу викладено на 184

сторінках стандартного друкованого тексту, містить 59 рисунків та 10 таблиць. Список використаної літератури охоплює 119 найменувань.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Поліметинціанінові барвники широко застосовуються як біомолекулярні зонди та барвники в біохімічних та біомедичних дослідженнях. Це ґрунтується на їхній здатності зв'язуватися з біомолекулами зі значним приростом флуоресценції. Спектрально-люмінесцентне виявлення та кількісне визначення біомакромолекул застосовується в сучасних методах, таких як ПЛР у реальному часі, гель-електрофорез, проточна цитометрія тощо. Поліметинові барвники мають вузькі смуги поглинання в широкому спектральному діапазоні, високі коефіцієнти екстинкції, помірну власну флуоресценцію та демонструють значні зміни спектрально-люмінесцентних властивостей в залежності від молекулярного оточення при взаємодії з біомакромолекулами, також утворюють впорядковані Н- та J-агрегати [1]. Приріст рівня флуоресценції під час нековалентного зв'язування з різними біомакромолекулами є важливою передумовою для використання ціанінових барвників як флуоресцентних зондів для візуалізації зазвичай безбарвних біомакромолекул [2].

Поліметинціанінові барвники мають хромофор, який являє собою поліметиновий ланцюг з непарною кількістю атомів вуглецю зі спряженими  $C=C$ - зв'язками, що зазвичай з'єднує кінцеві азотвмісні гетероцикли. Довжина цього ланцюга значною мірою визначає спектральний діапазон поглинання та випромінювання барвника. Ціаніни зазвичай мають хромофорний фрагмент із загальним позитивним зарядом [3]. Монометинціанінові барвники являють собою клас ціанінових барвників з найкоротшим поліметиновим ланцюгом, який складається лише з однієї ланки  $-CH=$ , що з'єднує кінцеві гетероциклічні групи. Вони можуть бути як симетричними, так і несиметричними (рис. 1.1).

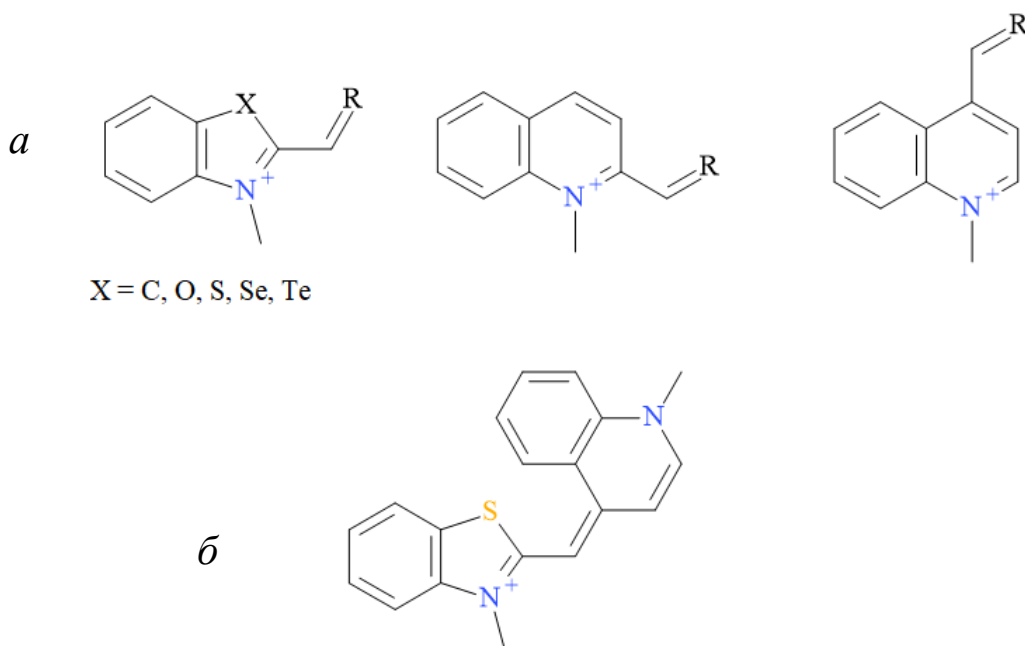


Рис. 1.1. Загальна структура монометинціанінових барвників – *a*;  
структура барвника ТО (тіазоловий оранжевий) – *б*.

### 1.1. Фотофізичні та фотохімічні властивості монометинціанінових барвників

Монометинціанінові барвники характеризуються інтенсивним поглинанням у видимій області спектра, низькими квантовими виходами власної флуоресценції у розчинах, а також надшвидкою динамікою збудженого стану. Значний вплив на їхні фотофізичні та фотохімічні властивості мають будова молекули, природа кінцевих гетероциклів і замісників, а також властивості середовища, зокрема полярність і в'язкість розчинника.

Спектральні максимуми поглинання монометинціанінових барвників зазвичай лежать у діапазоні 420-600 нм і більше, при цьому коефіцієнти молярної екстинкції можуть досягати значень порядку  $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [4]. У нев'язких розчинниках квантові виходи флуоресценції цих барвників є дуже низькими. Так, для 1,1'-діетил-2,2'-ціаніну **2** (рис 1.2) в етанолі квантовий вихід флуоресценції становить близько 0,1 % [5]. Це пов'язано з надшвидкою не випромінювальною деактивацією збудженого синглетного стану  $S_1$  завдяки вільним обертальним і коливальним рухам зв'язків метинової групи, що поєднує гетероцикли.

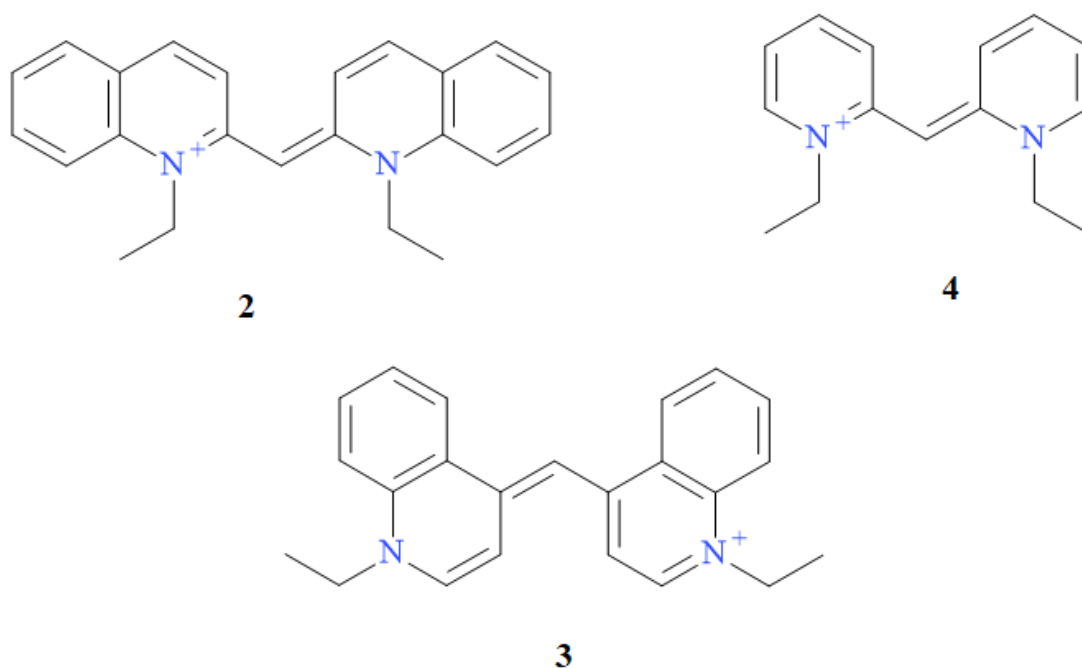


Рис. 1.2. Структурні формули барвників 2, 3, 4

Динаміку збудженого стану симетричних монометинціанінових барвників вивчали методами пікосекундної та фемтосекундної спектроскопії [6-11]. Після оптичного збудження метиновий місток стає геометрично гнучким, що приводить до торсійного обертання навколо зв'язку  $\text{C}=\text{C}$ . Безбар'єрний

характер потенційної поверхні збудженого стану забезпечує швидку внутрішню конверсію  $S_1 \rightarrow S_0$  та транс, *цис*-ізомеризацію молекули (рис 1.3).

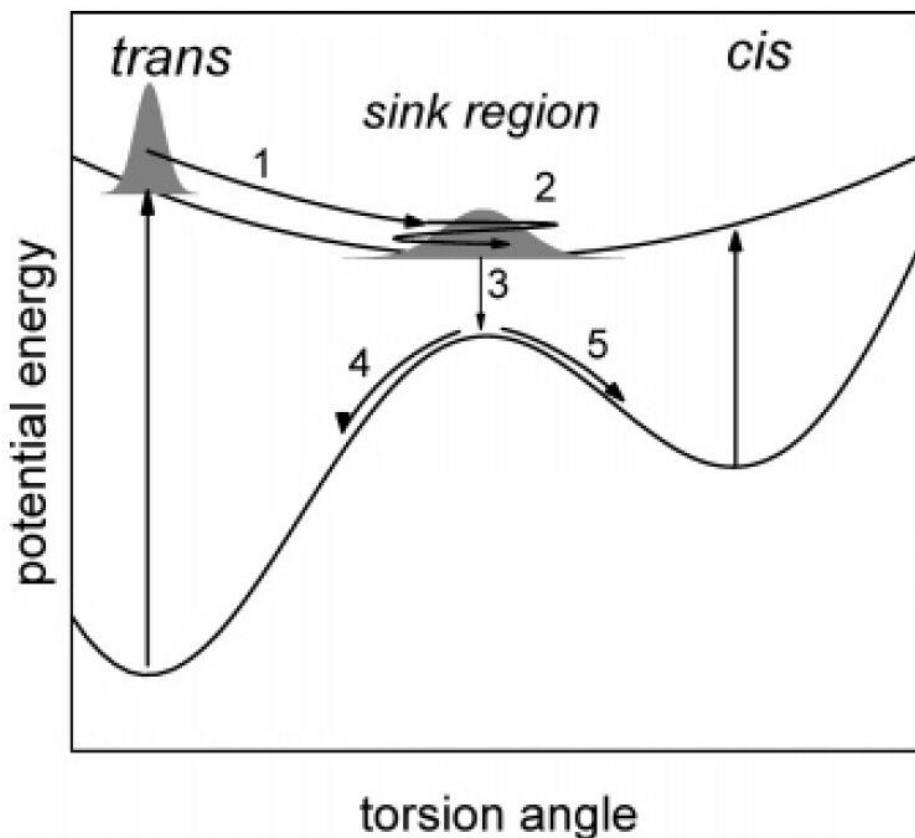


Рис. 1.3. Одновимірна модель безбар'єрної ізомеризації в збудженому електронному стані. **Процес 1:** Після фото збудження утворений хвильовий пакет на поверхні  $S_1$  безбар'єрно поширюється вздовж координати кручення до мінімуму потенціалу. **Процес 2:** У мінімумі збудженого стану формується квазістаціонарний розподіл, у якому молекули здійснюють броунівський рух уздовж торсійної координати без зміни середнього кута. **Процес 3:** У *sink*-області з мінімальним енергетичним зазором між  $S_1$  і  $S_0$  відбувається безвипромінювальний перехід у основний стан. **Процес 4:** Частина молекул після внутрішньої конверсії релаксує до термодинамічно стабільної *trans*-конфігурації на поверхні  $S_0$ . **Процес 5:** Альтернативний канал релаксації на поверхні  $S_0$  приводить до утворення *cis*-фотоізомеру

Фемтосекундна спектроскопія дозволила простежити обертання метинового містка та виявити проміжні геометричні стани, через які молекула проходить перед поверненням в основний стан [6,7,9]. Ці процеси відбуваються в часовому проміжку від сотень фемтосекунд до кількох пікосекунд, що пояснює дуже короткі часи життя збудженого стану і низьку власну флуоресценцію монометинціанінових барвників.

У збудженому стані деякі барвники можуть існувати у кількох конформаційних станах, між якими швидко встановлюється рівновага. Це може проявлятися у вигляді дуальної флуоресценції, спектральні характеристики якої залежать від властивостей розчинника [8]. Теоретичні дослідження фотоізомеризації підтвердили безбар'єрний характер цього процесу та показали ключову роль торсійних координат метинового містка в безвипромінювальній релаксації [10,12].

Надшвидку динаміку збудженого стану також спостерігали для несиметричних монометинціанінових барвників, зокрема похідних оксазолового жовтого (YO) та тіазолового оранжевого (TO). У водних розчинах ці барвники мають дуже короткі часи життя збудженого стану (порядку 1-4 пс), що зумовлює низькі квантові виходи флуоресценції [13-15]. У димерних формах слабка емісія додатково пояснюється екситонною взаємодією між хромофорами.

Квантовий вихід міжсистемного переходу монометинціанінових барвників у триплетний стан у нев'язких розчинниках зазвичай є малим. Для барвників із важкими атомами, зокрема Те-заміщених похідних, він зростає внаслідок ефекту важкого атома та залежить від в'язкості середовища [11].

Монометинціанінові барвники також здатні до агрегації у розчинах. Зокрема, псевдоізоціанін **2** утворює J-агрегати у воді, які характеризуються вузькою смугою поглинання з максимумом близько 573 нм [16]. Для окремих представників цього класу спостерігаються сольвато- та галохромні ефекти, що

проявляються у зміні спектрів поглинання і пов'язані з внутрішньомолекулярним переносом заряду [17].

## **1.2. Взаємодія монометинціанінових барвників з нуклеїновими кислотами**

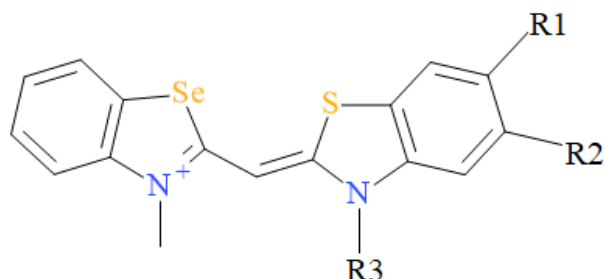
**1.2.1. Мономерні монометинціанінові барвники.** Монометинціанінові барвники взаємодіють з ДНК головним чином двома способами: через інтеркаляцію між парами основ та зв'язування в малій борозенці. Крім того, ці барвники можуть утворювати агрегати на молекулах нуклеїнових кислот. Інтеркаляційні комплекси зазвичай формуються барвниками з відносно простими та планарними структурами. Це, наприклад, показано для барвника **2**, який досліджували з дволанцюговою ДНК за допомогою флуоресцентної спектроскопії, спектроскопії лінійного дихроїзму (LD) та спектроскопії кругового дихроїзму (CD). Виявлено два типи комплексів: інтеркаляційні з високою константою рівноваги та агрегати у борозенках ДНК, зумовлені електростатичними взаємодіями. Константа зв'язування інтеркаляційного комплексу становила близько  $9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , тоді як комплекс на поверхні демонстрував значно меншу спорідненість [18].

Інтеркаляція барвника з ДНК змінює її структуру, викликаючи зміщення чи навіть деформацію подвійної спіралі [19]. Така зміна структури може сприяти підвищенню стабільності і впливати на процес «топлення» ДНК під час процедури ПЛР з флуоресцентною детекцією в реальному часі та змінювати електрофоретичну рухливість, що є важливим для використання таких барвників у молекулярних дослідженнях. Окрім того, фотофізичні характеристики барвників можуть зазнавати суттєвих змін через інтеркаляцію,

наприклад, флуоресценція барвників збільшується у багато разів при зв'язуванні з ДНК, що можна використовувати для кількісного визначення ДНК [20].

Несиметричні монометинціанінові барвники часто використовують як флуоресцентні зонди для візуалізації нуклеїнових кислот. Наприклад, барвники TO і YO практично не флуоресціюють у воді, але при зв'язуванні з ДНК їхня флуоресценція сильно зростає. Барвник TO у воді має квантовий вихід лише 0,02%, тоді як у присутності дволанцюгової ДНК він збільшується до 11%, а з одноланцюговою ДНК до 39% [21]. Подібна поведінка спостерігається й для YO та інших несиметричних барвників, де взаємодія з дволанцюговою ДНК збільшує флуоресценцію в десятки, сотні або навіть тисячі разів [19]. Це дозволяє використовувати їх як високочутливі біосенсиори для виявлення навіть незначних кількостей нуклеїнових кислот.

Деякі барвники (рис. 1.4), що містять бензоселеназольний фрагмент (**5–11**), демонструють значне збільшення флуоресценції при зв'язуванні з длДНК та длРНК. Мінімальні габарити метильної групи в положенні R3 підвищують придатність барвників в низці **5–11** як флуоресцентних зондів, а атоми Se у складі молекули збільшують інтенсивність флуоресценції вільних барвників [22,23]. Водночас, для барвників, що утворюють агрегаційні комплекси, такий підвищений вихід флуоресценції може бути корисним у випадках, коли необхідно вивчати конформаційні зміни нуклеїнових кислот або детектувати агрегацію молекул.



**5** R1=Cl R2=H R3=CH<sub>3</sub>

**6** R1=R2=H R3=CH<sub>3</sub>

**7** R1=R2=H R3=(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SH

**8** R1=R2=H R3=(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH

**9** R1=R2=H R3=(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>

**10** R1=H R2=OCH<sub>3</sub> R3=(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>

**11** R1=OCH<sub>3</sub> R2=H R3=(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>

Рис. 1.4. Структурні формули несиметричних монометинціанінових барвників **5-11**, що містять бензоселеназольний гетеро цикл

Спектроскопія кругового дихроїзму допомагає оцінити структуру комплексів та спосіб зв'язування барвника: інтеркаляція, зв'язування в борозенках або агрегація демонструють різні паттерни в спектрах CD. Наприклад, CD-спектри барвників **5** та **6** показують зв'язування мономерів у малій борозенці AT-послідовностей, тоді як GC-послідовності індукують сигнали, що вказують на агрегацію [23]. Ці спостереження підтверджують, що не всі барвники однаково ефективно зв'язуються з різними типами послідовностей ДНК, і це може бути використано для селективного маркування певних ділянок молекул ДНК.

Модифікація термінальних ядер барвників істотно впливає на взаємодію з нуклеїновими кислотами. Кон'югати з гуанідинкарбонілпірольними фрагментами (**12** та **13**) (Рис. 1.5) практично не флуоресціюють у воді, але проявляють сильну флуоресценцію з длДНК та длРНК [24]. Це явище може бути зумовлене змінами в конформації молекули барвника при зв'язуванні з

нуклеїновими кислотами, що змінює фотофізичні характеристики. Аналоги бензоіндолвмісних барвників (**14-20**) (рис. 1.5) також показали потенціал як флуоресцентні зонди, які формують комплекси у малій борозенці ДНК [4].

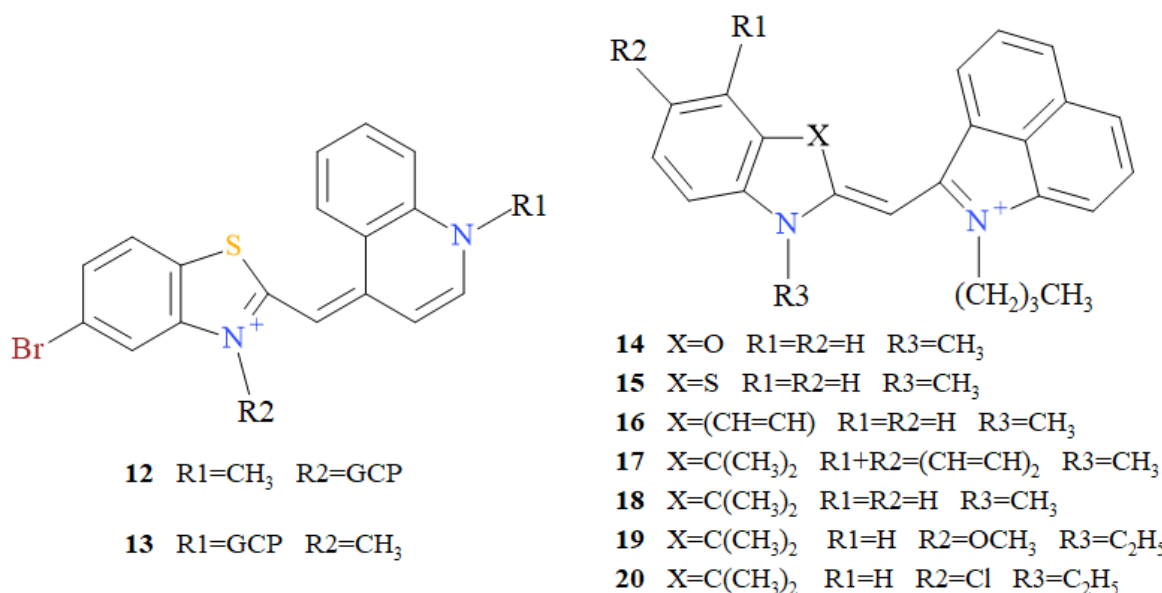


Рис. 1.5. Структурні формули несиметричних монометинціанінових барвників, що містять гуанідинкарбонілпірольні (GCP) фрагменти **12** та **13** та бензоіндолвмісних барвників (**14-20**).

Фторовані похідні ТО (**21-24**) (рис. 1.6) демонструють покращену фотостабільність і спектральні властивості, що є важливим фактором для застосування барвників у довготривалих експериментах, де барвники можуть зазнавати деградації під впливом світла [20]. Збільшення позитивного заряду молекули через додаткові катіонні групи або димерні похідні цианінів підвищує спорідненість до ДНК та інших нуклеїнових кислот.

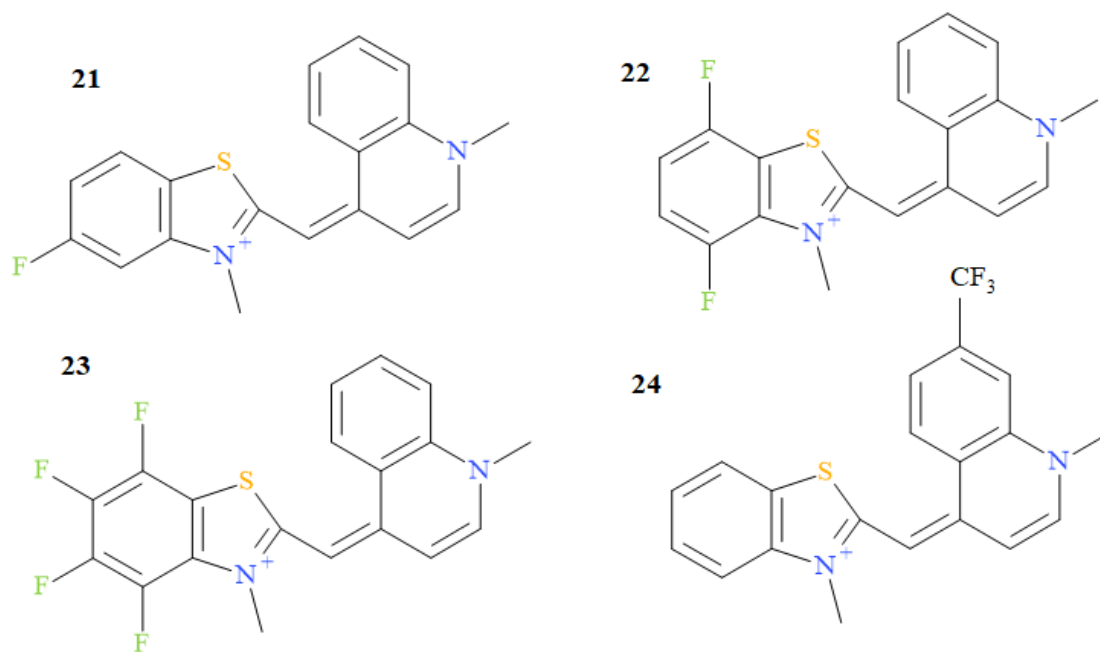


Рис. 1.6. Структурні формули фторованих монометинціанінових барвників (21-24)

Несиметричні барвники (рис. 1.7) з різним зарядом (25-31) зв'язуються з дволанцюговою ДНК як шляхом інтеркаляції, так і на поверхні молекули, інколи розрізняючи одно- та дволанцюгові полінуклеотиди [25]. Ці барвники можуть бути корисними для розробки зондів, що дозволяють вивчати структурні особливості як одноланцюгової, так і дволанцюгової ДНК.

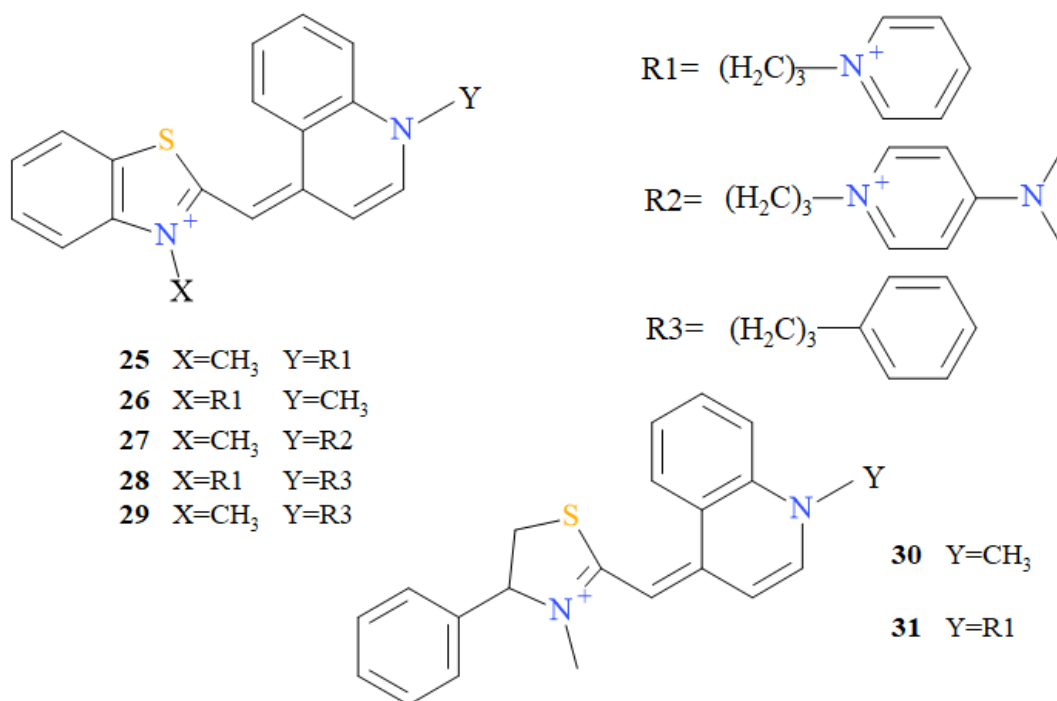


Рис. 1.7. Структурні формули несиметричних монометилціанінових барвників (**25-31**) з додатковими позитивними зарядами

Дикатіонні та інші модифіковані барвники (**32-35**) (Рис. 1.8) застосовуються для виявлення нуклеїнових кислот [26-29]. Барвник **36** з акридинієвим фрагментом у воді практично не флуоресцює, а взаємодія з ДНК зменшує його флуоресценцію [30].

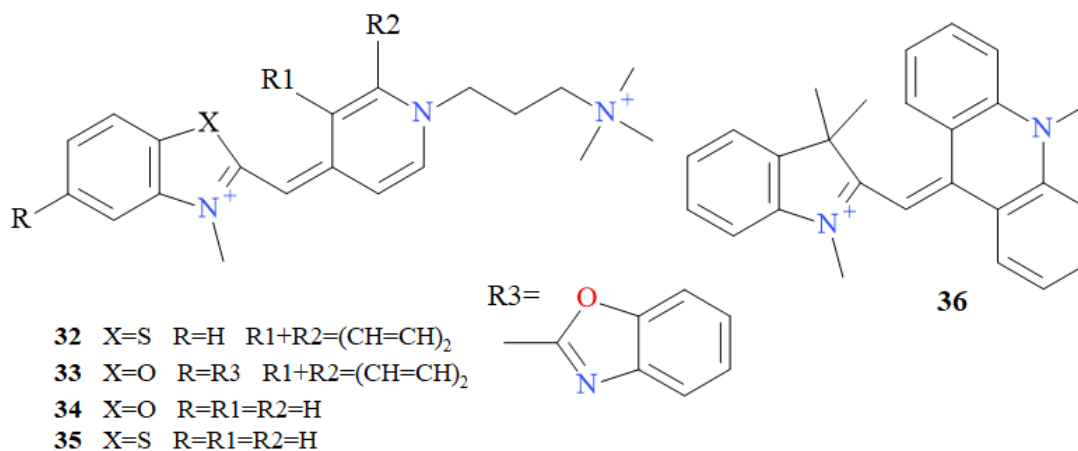


Рис. 1.8. Структурні формули різних несиметричних дикатіонних барвників (**32-35**) та барвника **36** з акридиновим термінальним гетероциклом

Барвники (**37-42**) (рис. 1.9) показують, що природа замісника біля атома азоту у піридинієвому фрагменті сильно впливає на флуоресценцію комплексів [31]. Зв'язування відбувається через швидке формування зовнішнього комплексу, який з часом частково або повністю перетворюється на інтеркаляційний [32,33].

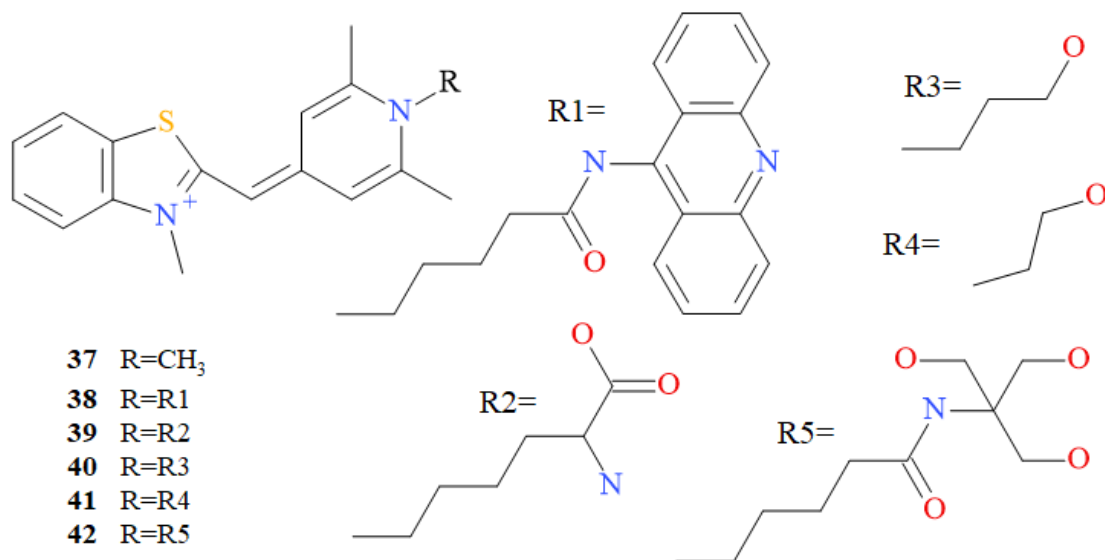


Рис 1.9. Структурні формули несиметричних монометинціанінових барвників (**37-42**) з різними замісниками біля атома азоту в піридинієвому фрагменті

Низка барвників на основі бензотіазолу та піридину (**37, 43-50**) (рис. 1.10) демонструє напівінтеркаляційне зв'язування: термінальні бензотіазолові або бензоксазолові ядра інтеркалюють, в той час як піридинові перебувають в борозенках ДНК [34]. Цей механізм дозволяє формувати більш стабільні комплекси, зокрема для вивчення специфічних структур ДНК.

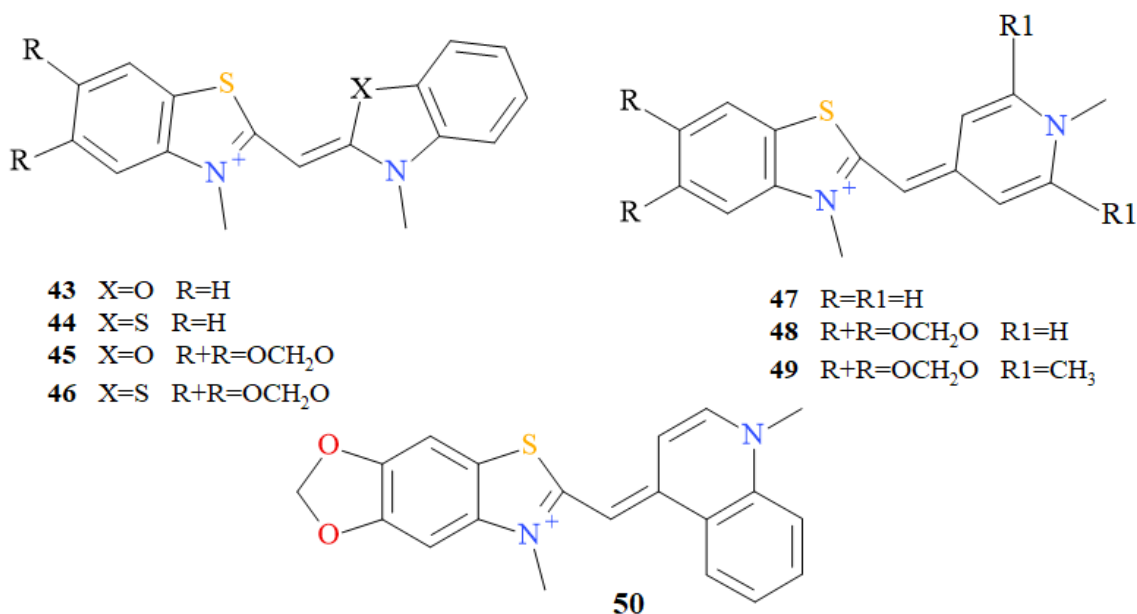


Рис. 1.10. Структурні формули несиметричних монометинціанінових барвників (**43-50**)

Монометинціанінові барвники (**51-60**) (рис. 1.11) показали низьку емісію у воді, але сильну флуоресценцію при зв'язуванні з дволанцюговою ДНК. Замісники у термінальних гетероядрах впливають на селективність: більші молекули з ОН-групами краще зв'язуються з дволанцюговою ДНК, компактні – можуть інтеркалювати в дволанцюгову ДНК та дволанцюгову РНК [35].

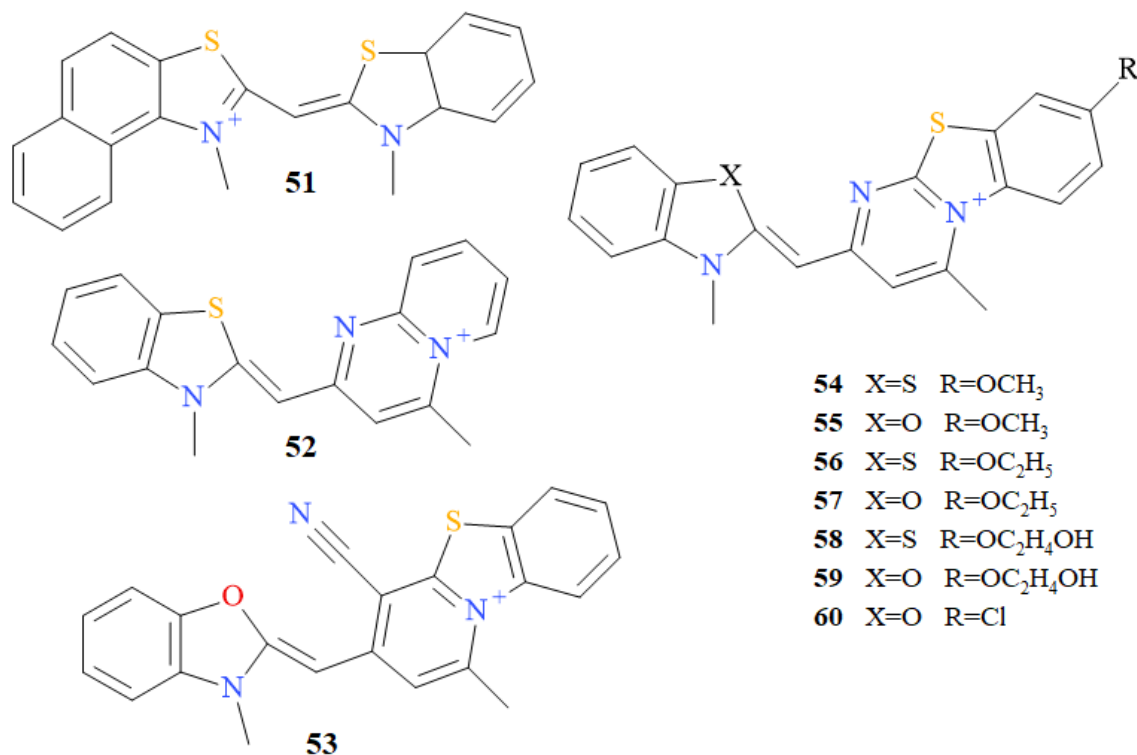


Рис. 1.11. Структурні формули несиметричних монометинціанінових барвників (**51-60**)

Багато комерційно доступних зондів на основі монометинціанінових барвників (SYBR Green I, PicoGreen, SYBR Green II та SYBR Gold; **61-64**) (рис. 1.12) здатні інтеркалювати або формувати високофлуоресцентні комплекси з дволанцюговою ДНК. Вони проявляють селективність до дволанцюгової ДНК і можуть використовуватись для кількісного визначення ДНК у дуже низьких концентраціях (~0,5-1 нг/мл) [36-40]. Ці барвники знайшли широке застосування у молекулярній біології, зокрема в методах ПЛР та аналізі генетичних маркерів.

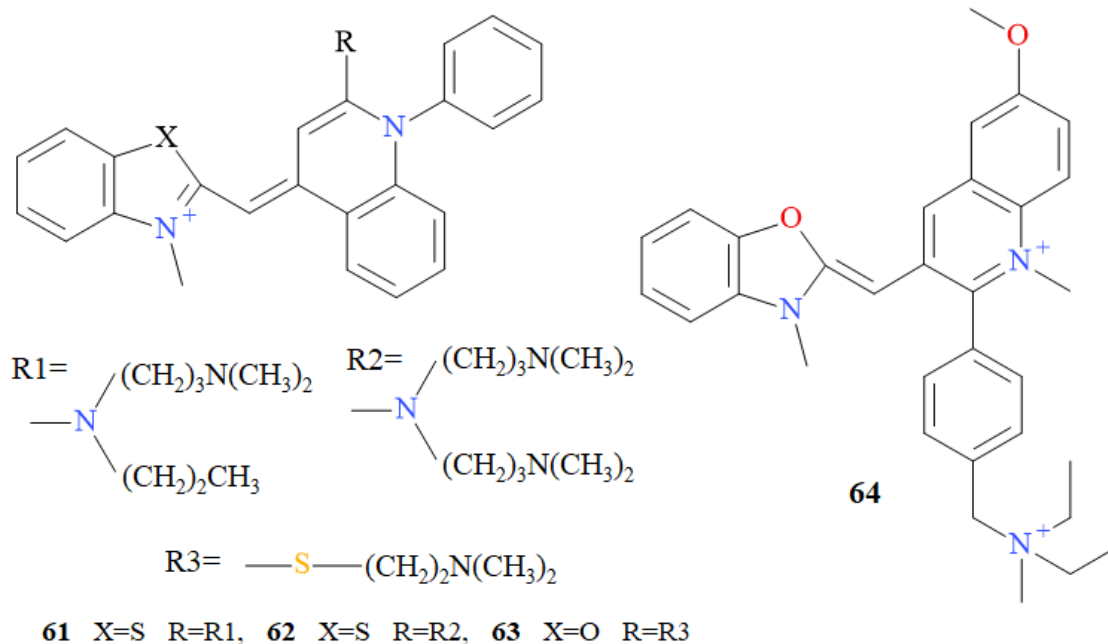


Рис. 1.12. Структурні формули комерційно доступних монометинціанінових барвників (**61-64**)

Барвники на основі N-арилпіридоціаніну (**65-72**) (рис. 1.13) поглинають у довгохвильовій області та демонструють високу селективність до ДНК над РНК. Наприклад, флуоресценція барвника **68** зростає у 1600 разів при зв'язуванні з ДНК, але лише в 110 разів з РНК, а барвник **71** показав збільшення у 3900 разів [41]. Це дозволяє застосовувати ці барвники для специфічної детекції ДНК у присутності РНК, що є важливим для досліджень, спрямованих на вивчення лише певних типів нуклеїнових кислот.

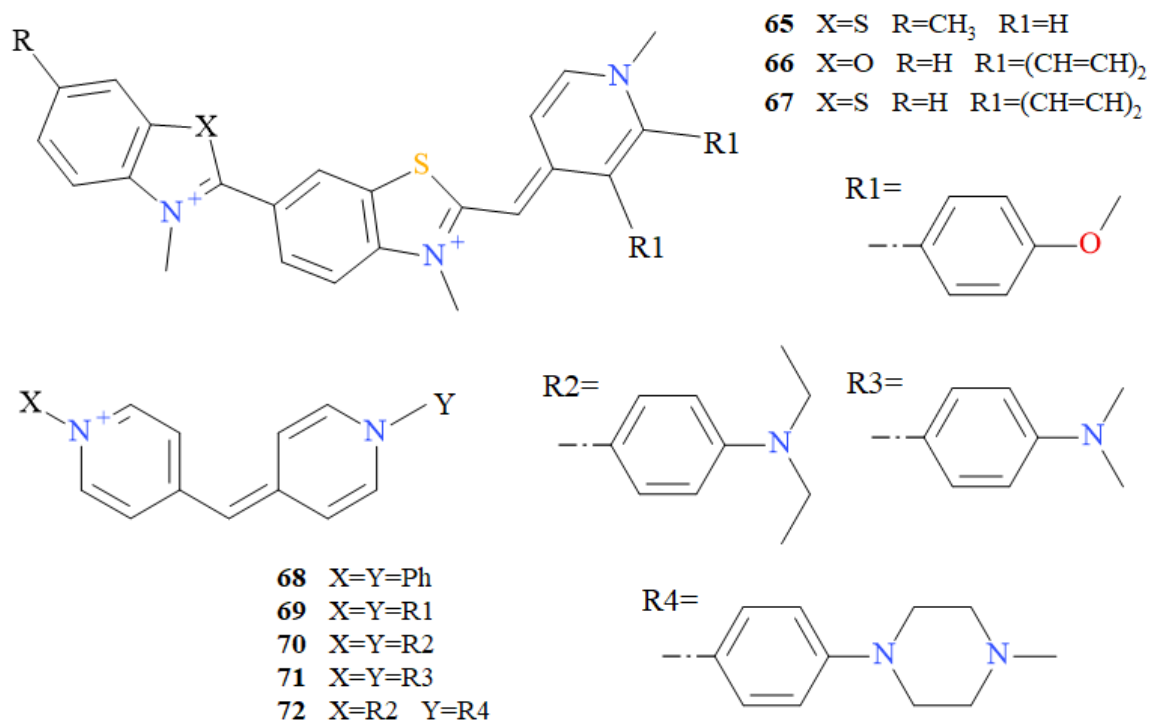


Рис. 1.13. Структурні формули несиметричних монометинціанінових барвників на основі N-арилпіридоціаніну (**65-72**).

**1.2.2. Димерні монометинціанінові барвники.** Окрім мономерних барвників, як флуоресцентні зонди широко застосовують також димерні монометинціанінові барвники на основі ТО, YO, бензотіазолового оранжевого та споріднених сполук. У таких системах дві ціанінові хромофорні частини з'єднані між собою катіонними містками. Типовими представниками є барвники ТОТО та YOYO (**73** і **74**, відповідно до рис. 1.14) [27-29, 42-49]. У вільному стані в розчині барвники **73** та **74** практично не проявляють флуоресценції. Натомість при зв'язуванні з дволанцюговою ДНК вони формують електрофоретично стабільні комплекси, що супроводжується

зростанням інтенсивності флуоресценції більш ніж у 1000 разів [50]. Стійкість комплексів барвника **73** з одноланцюговою ДНК вивчали в роботі [43] методом переносу ТОГО з комплексу на надлишок неміченої ДНК із використанням гель-електрофорезу. Додатково комплекси **73** з ДНК досліджували методами спектроскопії кругового дихроїзму та флуоресцентної спектроскопії. Було встановлено, що полікатионні барвники можуть мати однаково високу спорідненість як до одноланцюгової, так і до дволанцюгової ДНК.

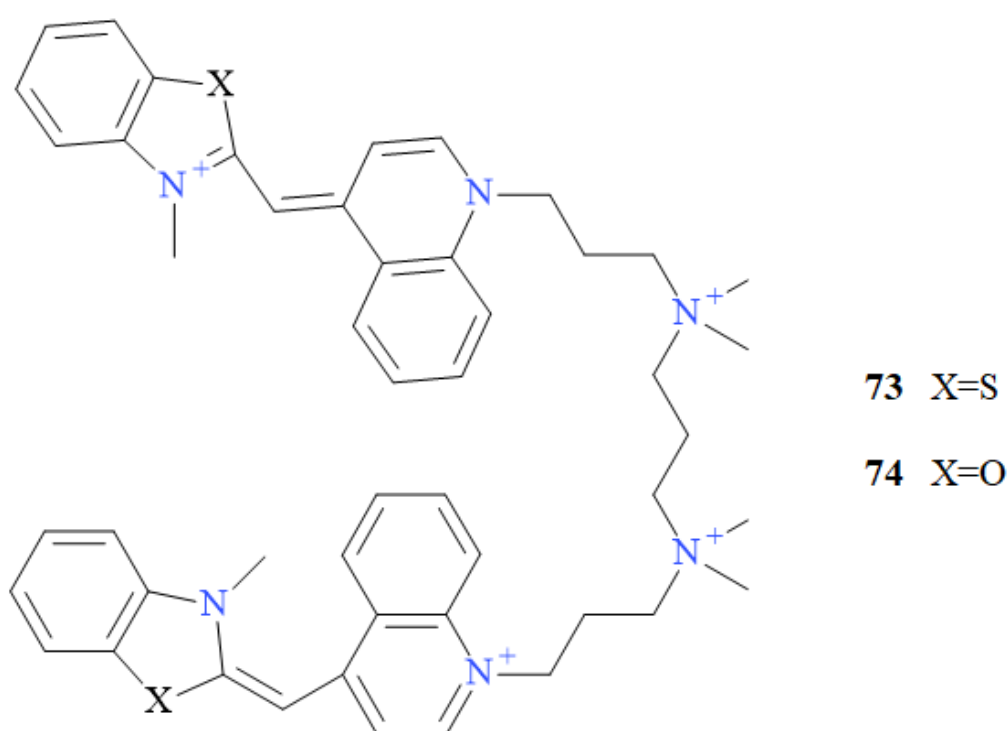


Рис. 1.14. Структурні формули димерних монометинціанінових барвників **73** (ТОГО) та **74** (YOYO)

Порівняльне дослідження взаємодії барвників різної будови (зокрема **74**, **61**, **62** та **63**; див. рис. 1.12) з олДНК і длДНК наведене в [42]. Для одноланцюгової ДНК характерним є розширення смуг поглинання та

флуоресценції порівняно з комплексами з длДНК. У практичних застосуваннях монометинціанінові барвники **73** та **74** використовують у гель-електрофорезі для детекції рестрикційних фрагментів нуклеїнових кислот у діапазоні від 600 до 24 000 пар основ. Межа виявлення длДНК на агарозному гелі становить близько 4 пг (при збудженні конфокальним лазером), що приблизно у 500 разів чутливіше, ніж у випадку бромистого етидію [50].

У роботі [47] показано, що гомодимерні монометинціанінові барвники демонструють значне зростання флуоресценції при зв'язуванні як з олДНК, так і з длДНК. Аналогічно, в [49] було зафіксовано підвищення інтенсивності флуоресценції барвників **73** і **74** майже на три порядки при взаємодії з нуклеїновими кислотами. При цьому залежність сигналу від концентрації ДНК є лінійною в межах 0,5-100 нг/мл для комплексу барвника **73** з ДНК [45].

Механізми зв'язування барвників **73** та **74** з ДНК і олігонуклеотидами детально досліджували методами одно- та двовимірної  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопії [45-47]. Показано, що ці барвники можуть утворювати кілька типів комплексів з дволанцюговою ДНК, а у випадку олігонуклеотидів основним механізмом є біінтеркаляція.

Вплив інтеркаляції на фізичні властивості ДНК вивчали в роботі [51] для барвників **75** (рис. 1.15) і **74** із використанням оптичної флуоресцентної мікроскопії. Було встановлено, що вбудовування барвників між парами основ призводить до подовження молекули ДНК. Кінетичні аспекти взаємодії барвника **74** з ДНК аналізували методом мікроскопії повного внутрішнього відбиття (TIRF) [52].

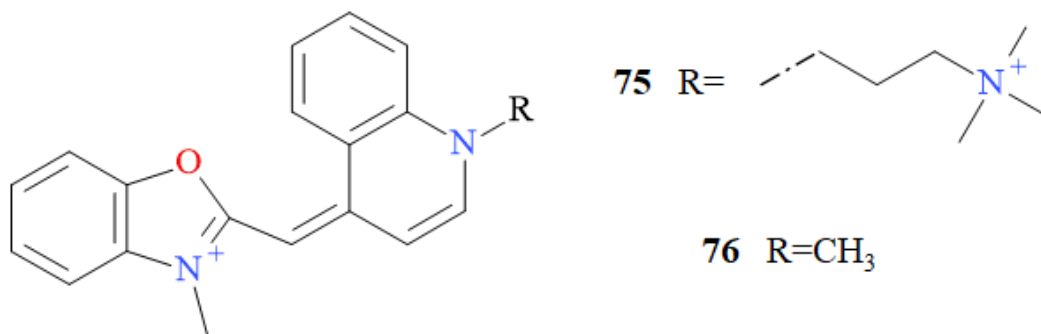


Рис. 1.15. Структурні формули мономерних монометинціанінових барвників YO **75** та **76**

Подальші дослідження барвників **74**, **75** та їхніх похідних із застосуванням стаціонарної та надшвидкої флуоресценції з часовою роздільною здатністю наведені в [53]. Автори показали, що утворення слабофлуоресцентних Н-агрегатів є несприятливим для отримання інтенсивного контрастного сигналу. Модифікація структури барвників, зокрема введення додаткових катіонних груп, дозволяє зменшити агрегацію та підвищити чутливість флуоресцентних зондів.

Взаємодію мономерних і димерних ціанінових барвників (**33**, **74**, **75** та **76**; див. рис. 1.8) з бактеріофагом T5 досліджували в роботі [26]. Було показано, що всі досліджені барвники здатні проникати всередину капсида вірусу та зв'язуватися з його нуклеїновою кислотою. Швидкість цього процесу залежить від розміру молекули: для мономерного барвника **76** при 37 °С проникнення і зв'язування відбувається протягом кількох хвилин, тоді як для димерного **74** цей процес може тривати понад 50 годин.

**1.2.3. Агрегація монометинціанінових барвників на нуклеїнових кислотах.** Агрегація монометинціанінових барвників на нуклеїнових кислотах часто супроводжує їх взаємодію з біополімерами та є важливим фактором, що визначає спектральні й фотонні властивості цих систем [18, 30, 54]. Нуклеїнові кислоти при цьому виступають не лише як поліаніонні матриці, що стабілізують заряджені молекули барвників, але й як структурні шаблони, здатні індукувати формування впорядкованих супрамолекулярних агрегатів і керувати їхньою просторовою організацією [55].

Класичним прикладом є симетричний монометинціаніновий барвник **2**, який у присутності ДНК формує J-агрегати, спектральні та хіральні властивості яких детально досліджували методами лінійного та кругового дихроїзму [18,56]. У роботі [57] показано, що барвник **2** здатний утворювати на олігонуклеотидних матрицях (олДНК та длДНК) нові типи супрамолекулярних агрегатів, фотонні характеристики яких істотно відрізняються від класичних H- та J-агрегатів. Дослідження цих структур за допомогою CD-спектроскопії та атомно-силової мікроскопії показало, що такі агрегати характеризуються високим ступенем впорядкованості та здатністю до ефективної делокалізації збуджених станів, що реалізується через механізм екситонної міграції [57, 58]. Важливою особливістю цих систем є можливість керування їх властивостями шляхом зміни типу ДНК-субстрату, а також здатність до ефективного перенесення енергії електронного збудження на молекули-акцептори, зокрема AlexaFluor™ 647, що було продемонстровано у FRET-експериментах [55, 57].

ДНК-індукована агрегація також характерна для несиметричних монометинціанінових барвників [54, 59]. Зокрема, барвники **1** та **46** у присутності ДНК утворюють агрегати з аномально великим стоксовим зсувом, що свідчить про істотну зміну характеру електронних переходів у збудженому стані та сильний міжхромोфорний екситонний зв'язок [59, 60]. У водному розчині без ДНК ці молекули переважно формують H-агрегати; при додаванні

длДНК у 3-5 кратному надлишку виникають змішані агрегатні системи, що містять як вільні молекули барвників, так і молекули, асоційовані з нуклеїною кислотою. Така поведінка узгоджується з концепцією напівінтеркаляції, згідно з якою лише частина хромофорів безпосередньо взаємодіє з парами основ ДНК, тоді як інші беруть участь у міжмолекулярній агрегації [59, 61]. Подібний підхід до організації агрегатів реалізовано і для бензотіазолового барвника **77** (рис. 1.16), який формує впорядковані агрегати на матрицях длДНК, здатні забезпечувати ефективне перенесення енергії від донорних до акцепторних молекул з мінімальними втратами, що відкриває перспективи використання таких систем у фотоніці та біосенсорних застосуваннях [62].

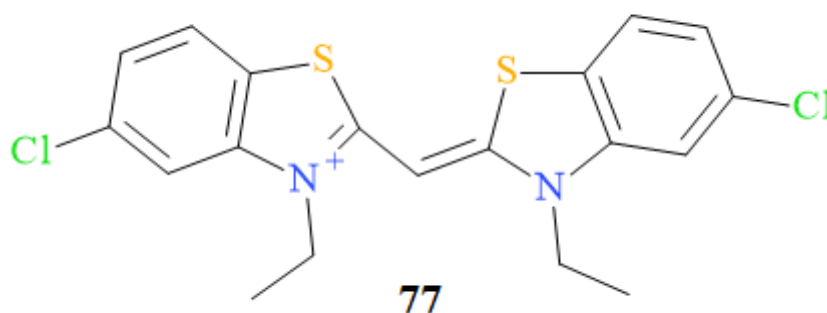


Рис. 1.16. Структурна формула барвника **77**

Агрегація монометинціанінових барвників на нуклеїнових кислотах (Рис. 1.17) є багатофакторним процесом, який визначається співвідношенням барвник/ДНК, іонною силою середовища, структурою хромофора та типом нуклеїнової кислоти [18, 59, 63]. Електростатична взаємодія між катіонними барвниками та поліаніонним остовом ДНК створює передумови для локальної концентрації молекул барвника, що, у поєднанні з  $\pi$ - $\pi$  стекінгом та гідрофобними ефектами, сприяє формуванню впорядкованих H- та J-агрегатів. При цьому ДНК виступає не лише пасивною матрицею, але й активним структуроутворюючим елементом, який визначає просторову орієнтацію

хромофорів та спектральні характеристики агрегатів, включаючи положення смуг поглинання, інтенсивність флуоресценції та величину стоксового зсуву [55, 58]. Такий контрольований характер агрегації лежить в основі використання монометинціанінових барвників як чутливих флуоресцентних зондів для детекції та дослідження структури нуклеїнових кислот.

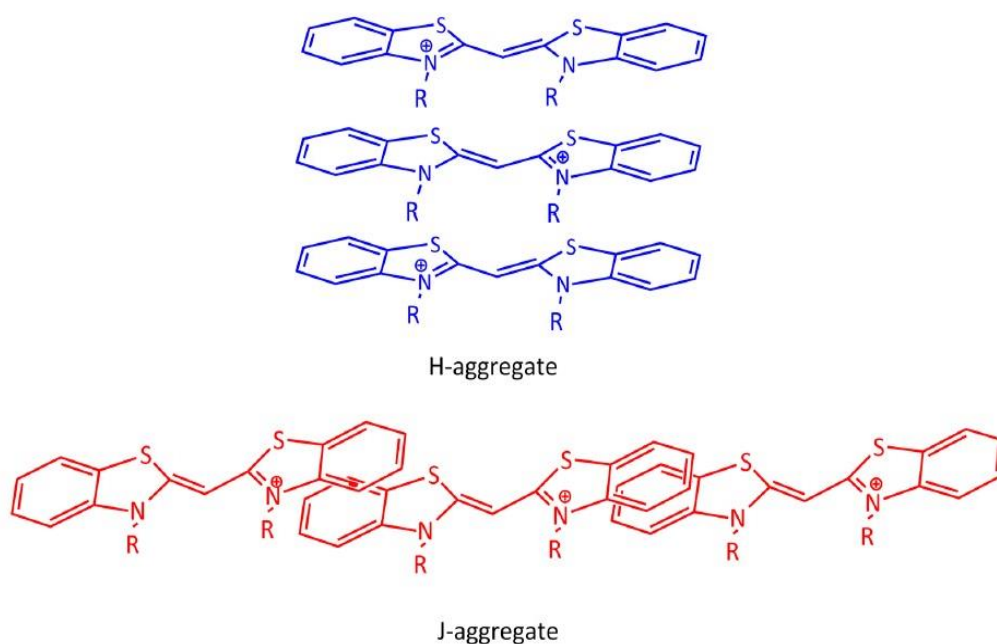


Рис. 1.17. Схематичне зображення Н- та J-агрегатів монометинціанінових барвників

### 1.3. Взаємодія монометинціанінових барвників з білками

Було досліджено низку монометинціанінових барвників із потенційним застосуванням у якості флуоресцентних зондів для білків [64]. Розробка барвників базувалася на концепції «груп, що модифікують спорідненість», при цьому барвник **37** (рис. 1.9) використовували як структурний прототип. Було встановлено, що барвники **78-80** (рис. 1.18) здатні специфічно виявляти

бичачий сироватковий альбумін, причому **78** та **79** демонструють приблизно стократне підсилення флуоресценції у присутності білка.

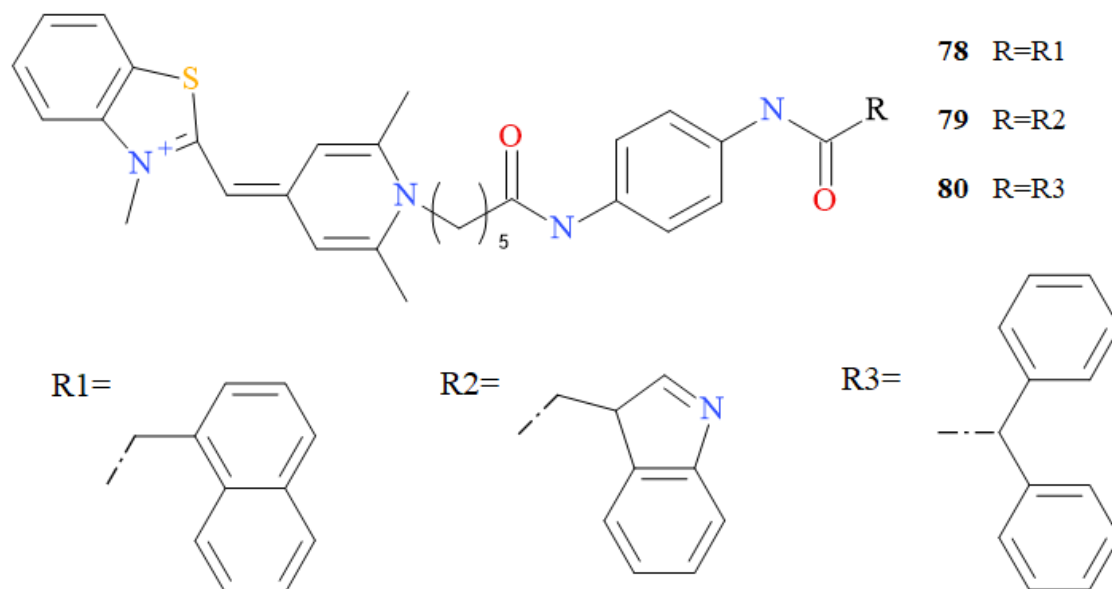


Рис. 1.18. Структурні формули монометинціанінових барвників (**78-80**)

Дослідження взаємодії симетричного аніонного монометинціанінового барвника **81** (рис. 1.19) з двома синтетичними поліпептидами показало, що у водному середовищі барвник може утворювати як Н-, так і J-агрегати залежно від концентрації [65]. Поліпептиди формують  $\alpha$ -спіральні супрамолекулярні ансамблі та фібрилярні шари, а взаємодія з барвником **81** спричиняє утворення нових трубчастих агрегатів. CD-спектроскопія не виявила переносу хіральності між барвником і пептидами, що свідчить про відсутність впливу агрегатів барвника на вторинну структуру пептидів. Утворення J-агрегатів барвником **81** у присутності білків, таких як желатин, лізоцим, рибонуклеаза та трипсин, було досліджено за допомогою CD-спектроскопії [66]. Було показано, що хіральність білків визначає оптичну активність J-агрегатів монометинціанінових барвників.

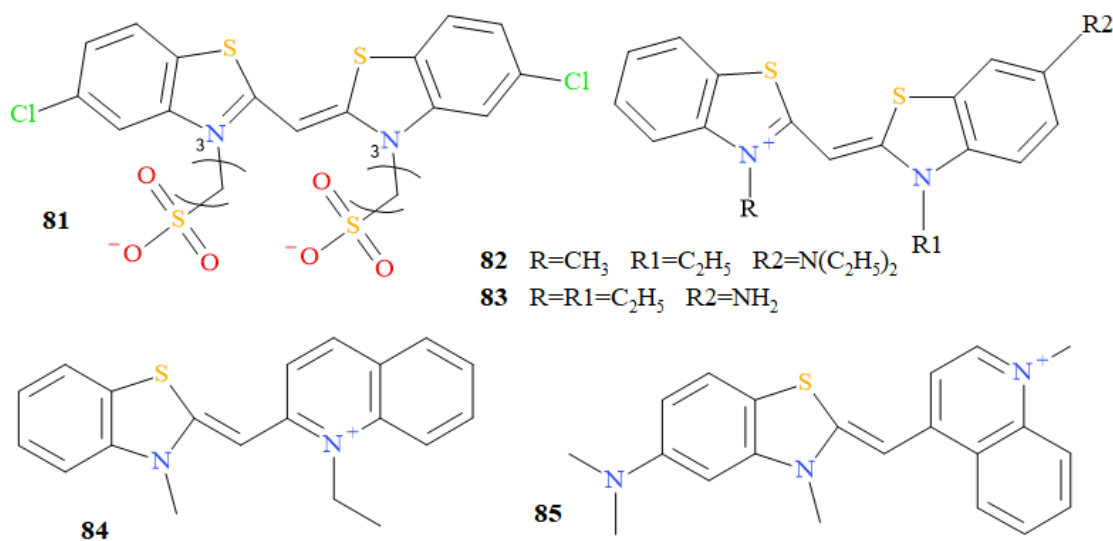
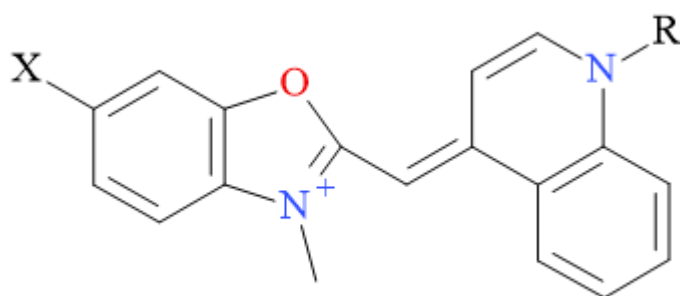


Рис. 1.19. Структурні формули монометинціанінових барвників (**81-85**)

Сучасні дослідження зосереджені на пошуку флуоресцентних зондів, специфічних до амілоїдних білкових структур, що є важливим для терапії різних неврологічних захворювань. Для виявлення фібрилярного  $\beta$ -лактоглобуліну були вивчені два катіонні барвники на основі бензотіазольних гетероциклів **44** та **82**, а також ряд триметинових, пентаметинових, гептаметинових ціанінових та скварилієвих барвників [67]. Флуоресцентний сигнал цих барвників у присутності фібрилярного  $\beta$ -лактоглобуліну був приблизно втричі вищим, ніж у присутності нативного білка.

Також досліджувалися ціанінові барвники, що взаємодіють з амілоїдною формою  $\beta$ -синуклеїну (**1**, **37**, **44**, **47** та **82-85**) [68-70]. Найбільш ефективним виявився барвник **82**, який демонстрував флуоресценцію у фібрилярного  $\beta$ -синуклеїну майже в 10 разів більшу, ніж у нативного білка.

Серія монометинціанінових барвників **86-90** (рис. 1.20) досліджувалася щодо взаємодії з нативним та амілоїдним інсуліном і лізоцимом [71]. Було відзначено підвищення емісії при зв'язуванні як з нативними, так і з фібрилярними білками, причому ефект був більш виражений для фібрилярних форм. Селективність барвників до амілоїду була нижчою, ніж у інших амілоїдних маркерів, з максимальними коефіцієнтами 8,4 для барвника **87** та 5,5 для барвника **89**. Барвники демонстрували більший приріст флуоресценції у присутності фібрил інсуліну порівняно з лізоцимом, що свідчить про чутливість до морфології фібрил.



**86** R=CH<sub>3</sub> X=Cl

**87** R=CH<sub>3</sub> X=F

**88** R=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> X=Cl

**89** R=C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> X=Cl

**90** R=C<sub>5</sub>H<sub>11</sub> X=H

Рис. 1.20. Структурні формули монометинціанінових барвників (**86-90**)

Молекулярний докінг дозволив визначити сайти зв'язування барвників з інсуліном. Залишки В-ланцюга (Val17, Leu17, Ala14, Phe1, Gln4, Leu6) та А-ланцюга (Leu13, Tyr14, Glu17) утворюють найбільш стабільні комплекси. Гідрофобні взаємодії та β-стекинґ контакти (зокрема з Phe1) відіграють ключову роль, а борозенка Gln15-Glu17 є найефективнішим місцем зв'язування [71].

Взаємодія барвників **86-90** з бактеріофагом MS2 показала високу спорідненість ( $\sim 1 \text{ M}^{-1}$ ) та підтвердила можливість взаємодії барвника з білками вірусного нуклеокапсиду. Молекулярний докінг продемонстрував потенційне розміщення молекули барвника в щілині, утвореній трьома білками оболонки [72].

Утворення J-агрегатів барвника **2** на поверхні гепарину супроводжувалося приблизно 400-кратним підвищенням флуоресценції [73]. CD-спектри відображали сильний екситонний зв'язок між молекулами барвника. Барвник **2** демонстрував високу селективність до гепарину порівняно з хондроїтинсульфатом та гіалуроновою кислотою, із межею виявлення 2 нМ.

У контексті біокон'югованих систем було показано, що спеціально підібрані білкові фрагменти, зокрема одноланцюгові антитіла (scFv) або флуорогенні білкові модулі, здатні утворювати стабільні комплекси з монометинціаніновими барвниками, що призводить до значного підсилення флуоресценції та наномолярної спорідненості взаємодії. Такі комплекси практично не флуоресціюють у вільному стані, але при зв'язуванні з барвником проявляють високу квантову вихідність та багатократне підсилення флуоресценції [74, 75].

Ці результати підкреслюють універсальність механізмів взаємодії монометинціанінових барвників з білковими структурами, де структурне обмеження рухливості барвника всередині білкової пори є ключовим фактором для його фотофізичних змін та використання як чутливого флуоресцентного зонду. Подібні ефекти спостерігаються у ряді досліджень, що демонструють підвищену фотостабільність, селективність та можливість створення різних комплексів із одним білковим партнером [76].

## **1.4. Використання флуоресцентних барвників для ПЛР у реальному часі**

**1.4.1. Типи флуоресцентних репортерних молекул для ПЛР у реальному часі.** Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) в реальному часі є комплексним та потужним методом для виявлення та кількісного визначення нуклеїнових кислот, і стала однією з провідних технологій у молекулярній діагностиці, біологічних дослідженнях, сільському господарстві та медицині [77-80]. Ключовий принцип ПЛР в реальному часі базується на наявності флуоресцентної молекули, яка дозволяє здійснювати моніторинг ампліфікації фрагментів ДНК в реальному часі. Таким флуоресцентним репортером може бути флуоресцентно мічений олігонуклеотидний зонд або інтеркалюючий барвник, що зв'язується з ДНК [81]. Методи на основі зондів, такі як TaqMan та Light-up, широко використовуються в клінічних і біологічних дослідженнях завдяки своїй високій чутливості та специфічності, однак мають обмеження для високополіморфних ділянок геному, а їх синтез часто є дорогим і трудомістким [82, 83]. В якості альтернативи для ПЛР в реальному часі широко застосовуються прості флуоресцентні барвники з високою афінністю до ДНК, включаючи інтеркалюючі та зв'язуючі молекули, такі як BEBO, SYBR Green I, SYTO9 та EvaGreen [84-88]. SYBR Green I залишається найбільш широко використовуваним ціаніновим барвником в ПЛР-дослідженнях, однак його обмеження, включаючи стабільність барвника, інгібування ПЛР при вищих концентраціях, переважне зв'язування з конкретними послідовностями ДНК та знижену точність під час аналізу кривої плавлення, спонукають до пошуку вдосконалених інтеркалюючих барвників для ПЛР в реальному часі.

**1.4.2. Використання флуоресцентних барвників для аналізу кривих плавлення продуктів ПЛР.** Аналіз кривих плавлення відіграє ключову роль у генотипуванні, оскільки він дозволяє ідентифікувати та розрізнити послідовності нуклеїнових кислот після завершення ПЛР без необхідності відкривати пробірки. Цей метод ґрунтується на тому, що різні амплікони мають специфічні температури плавлення ( $T_m$ ), які залежать від їхньої довжини та нуклеотидного складу. Аналіз кривих плавлення використовується як напівкваліфікований метод підтвердження ідентичності амплікону. Це дозволяє відрізнити цільовий продукт від неспецифічних артефактів, таких як праймер-димери. Це дозволяє виявляти такі генетичні варіанти як однонуклеотидні поліморфізми (SNP), делеції та інсерції. При цьому, генотипи розрізняються за формою та положенням кривих на графіку. Наприклад, гомозиготні варіанти з майже ідентичними  $T_m$  можна розрізнити за допомогою аналізу форми кривої плавлення. Аналіз кривих плавлення дає можливість виявляти кілька різних продуктів в одній реакції (мультиплексна ПЛР) за умови, що вони мають різні температури плавлення. При ампліфікації гетерозигот утворюються гетеродуплекси, які плаваються за нижчих температур, ніж гомодуплекси. Це створює характерний профіль кривої, що дозволяє легко ідентифікувати гетерозиготний стан.

Ефективність генотипування за допомогою аналізу кривих плавлення суттєво залежить від використовуваного барвника. Хоча SYBR Green I є популярним, він має обмеження для генотипування через явище перерозподілу барвника під час плавлення, що призводить до розширення піків та нестабільності результатів. Натомість такі барвники, як EvaGreen (EG), LCGreen або певні барвники серії SYTO, дозволяють використовувати вищі концентрації, що мінімізує перерозподіл і забезпечує чіткіші піки для точного розрізнення генотипів. LCGreen рівномірно насичує амплікон і не мігрує між ділянками ДНК у процесі денатурації, що забезпечує відтворюваність профілів

плавлення і дозволяє проводити високороздільний аналіз без використання флуоресцентно мічених зондів [89,90]. У таких умовах зсув  $T_m$  є стабільним і передбачуваним, а зміни форми кривої можуть бути використані для виявлення одонуклеотидних заміні.

**1.4.3. Вплив флуоресцентних барвників на температуру плавлення ДНК та на інгібування ПЛР у реальному часі.** Численні дослідження продемонстрували, що самі барвники можуть інгібувати ПЛР, тим самим впливати на ефективність ампліфікації. На відміну від SYBR Green I, LCGreen та EvaGreen розроблені з урахуванням мінімізації інгібуючого впливу та перерозподілу барвника під час плавлення [36, 86, 91].

Температура плавлення ( $T_m$ ) є одним із ключових параметрів, що характеризує термодинамічну стабільність дволанцюгової ДНК. У класичному розумінні  $T_m$  визначається як температура, за якої 50 % молекул ДНК переходять у одноланцюговий стан. На її значення впливають довжина амплікона, GC-вміст та склад середовища. Однак у системах ПЛР у реальному часі  $T_m$  відображає не лише властивості самої ДНК, а характеристики комплексу барвник-ДНК, оскільки більшість інтеркалюючих барвників впливають на дуплекс і змінюють його термодинамічну стабільність [86, 89]. Це призводить до зсуву температури плавлення у бік вищих значень. Його величина залежить як від хімічної природи барвника, так і від його концентрації у реакційній суміші. Зокрема, показано, що SYBR Green I спричиняє суттєвий зсув  $T_m$ , який може перевищувати 10 °C за високих концентрацій барвника. Така пряма взаємодія барвників з ДНК-матрицею є основним механізмом інгібування ампліфікації. Барвники, які характеризуються високою афінністю до дволанцюгової ДНК, при підвищених концентраціях стабілізують ДНК-дуплекс, що призводить до зростання температури плавлення ампліконів та

порушення циклів денатурації та елонгації, що безпосередньо перешкоджає ампліфікації [36, 86]. Таке інгібування залежить від концентрації і проявляється у вигляді зсуву значень  $C_t$  або повного припинення ампліфікації. Натомість показано, що EvaGreen має «помірну» спорідненість до ДНК, що забезпечує чутливість детекції без надмірного впливу на процес плавлення ДНК, що дозволяє використовувати її в ПЛР у значно вищих концентраціях (наприклад, 1.33 мкМ проти 0.34 мкМ для SYBR Green).

Іншим важливим аспектом є вплив барвників на активність ДНК-полімерази. Високі концентрації барвників можуть опосередковано знижувати швидкість синтезу ДНК, особливо за умов короткого часу елонгації або при ампліфікації довгих фрагментів ( $> 500$  п.н.) [91]. Цей ефект пов'язують як зі зміною конформаційної динаміки матричної ДНК, так і з утрудненням просування полімерази вздовж стабілізованого дуплексу [87].

Інгібування ПЛР барвником може відбуватися шляхом сприяння неспецифічній ампліфікації. Так, SYBR Green схильний посилювати неспецифічне відпалювання праймерів (mis-priming), стабілізуючи короткі дуплекси з недосконалим збігом послідовностей. Оскільки EvaGreen має низьку спорідненість до коротких фрагментів, він значно рідше викликає утворення неспецифічних продуктів [87]

Разом з ампліфікаційним інгібуванням, для флуоресцентних ДНК-зв'язувальних барвників характерне явище інгібування детекції, яке проявляється у зниженні інтенсивності флуоресцентного сигналу без реального зменшення кількості синтезованих ампліконів [92,93]. Такий ефект пов'язують із процесами флуоресцентного гасіння, зокрема зі зміною квантового виходу барвника при взаємодії з компонентами реакційної суміші або матрицею зразка. Було показано, що навіть за умов відсутності суттєвого впливу на кінетику ПЛР, подібні ефекти можуть призводити до спотворення ампліфікаційних кривих і,

як наслідок, до некоректної інтерпретації кількісних результатів ПЛР у реальному часі [92].

Таким чином, у системах ПЛР у реальному часі температура плавлення є не лише характеристикою послідовності амплікона, а інтегральним параметром, що відображає взаємодію ДНК із флуоресцентним барвником. Неврахування впливу барвника на термостабільність дуплексу може призводити до хибної інтерпретації кривих плавлення, особливо при аналізі одонуклеотидних поліморфізмів, мутацій або при мультиплексній ампліфікації. Тому, вибір барвника та оптимізація його концентрації є критично важливими для забезпечення достовірності результатів ПЛР та аналізу кривих плавлення.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

#### 2.1. Матеріали та реактиви

Моно- та поліметинові ціанінові барвники, а також оксоборонові барвники були надані к.х.н. Ю. Л. Сломінським (ІОХ НАН України), д.х.н. М.П. Шандурою (ІОХ НАН України) та к.х.н. С. С. Лукашовим (ІМБГ НАН України). Структуру досліджених сполук підтверджено методами ЯМР  $^1\text{H}$  та елементним аналізом.

Як розчинники використовували диметилсульфоксид (ДМСО), метанол (MeOH), дистильовану воду та 0,05 М Тріс-НСl буфер (рН 8,0); длДНК, РНК, ЛСА, БСА, КСА та овальбумін були придбані у Sigma-Aldrich Co.

Для дослідження зміни інтенсивності флуорисценції барвників в присутності нуклеїнових кислот при проведенні ПЛР в реальному часі використовували зразки геномної ДНК людини надані з банку ДНК лабораторії генетики спадкових патологій ІМБГ.

В роботі також було використано: термостабільну Таq-ДНК-полімеразу та відповідний ПЛР-буфер, 2,5 М  $\text{MgCl}_2$ , набір дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP) виробництва компанії Solis BioDyne (Естонія), олігонуклеотидні праймери фірми METABION (Німеччина). В роботі були використані TRITON X-100TM, етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), *трис*-гідроксиметиламінометан (Тріс), агароза, бромід етидія, бромфеноловий синій, гліцерол виробництва фірми "SIGMA". В роботі також використовували

комерційні ампліфікаційні суміші PCR iQ™ SYBR Green Supermix виробництва фірми «BioRad» (США) та HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix виробництва компанії Solis BioDyne (Естонія), які містили інтеркалюючі барвники SybrGreen та EvaGreen відповідно для проведення ПЛР в реальному часі. Решта реактивів вітчизняного виробництва марок ОСЧ та ЧДА.

## 2.2. Приготування робочих розчинів

Стокові розчини барвників готували шляхом розчиненням відповідних наважок у ДМСО з концентрацією 2 мМ. Робочі розчини вільних барвників готували шляхом розведення стокового розчину барвника в 50 мМ Тріс-НСІ буфері рН 8,0 або метанолі.

Стокові розчини длДНК і РНК (Sigma-Aldrich Co) готували розчиненням нуклеїнових кислот у 50 мМ Тріс-НСІ буфері рН 8,0. Концентрації длДНК та РНК у робочих розчинах дорівнювали  $6 \times 10^{-5}$  М та  $1,2 \times 10^{-4}$  М відповідно. Робочі розчини барвників у присутності нуклеїнових кислот готували шляхом додавання аліквоти основного розчину барвника до основного розчину нуклеїнових кислот.

Стокові розчини білків ЛСА, БСА, КСА та овальбуміну готували розчиненням у 50 мМ Тріс-НСІ буфері (рН 8,0) у концентрації 0,2 мг/мл. Молярна концентрації білка у вихідному розчині дорівнювала 3 мМ. Робочі розчини барвників з альбумінами готували шляхом додавання аліквоти основного розчину барвника до основного розчину білків.

Для дослідження ПЛР у реальному часі застосовувалися наступні розчини: буфер ТЕ – 10 мМ Тріс-НСІ; 1 мМ ЕДТА. 10xTBE – 0,89 М Тріс-НСІ; 0,89 М борна к-та; 20 мМ ЕДТА. Розчин для нанесення проб ДНК на гель: 0,1% бромфеноловий синій; 30% гліцерол.

### 2.3. Спектрально-люмінесцентні вимірювання

Спектроскопію поглинання та флуоресцентції у видимій області використано для вивчення спектрально-люмінесцентних властивостей синтезованих барвників у вільному стані та їхніх комплексів із нуклеїновими кислотами та білками. Спектроскопічні вимірювання проводили у стандартній кварцовій кюветі (10×10 мм). Всі вимірювання виконувались за кімнатної температури  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ , одразу ж після приготування розчинів барвників та їхніх комплексів із макромолекулами.

Спектри збудження та випромінювання флуоресценції реєстрували за допомогою флуоресцентного спектрофотометра Cary Eclipse (Varian, Австралія). Для збудження флуоресценції використовували випромінювання ксенонової лампи (150 Вт). Довжину хвилі збудження флуоресценції вважали рівною довжині хвилі максимальної смуги збудження флуоресценції барвника у відповідному розчині. Похибка визначення довжини хвилі флуоресценції та збудження флуоресценції становила 1 нм. Спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі Genesys 20 (ThermoScientific) зі спектральним діапазоном виявлення 325-1100 нм і точністю довжини хвилі  $\pm 2,0$  нм.

### 2.4. Полімеразна ланцюгова реакція

ПЛР – багаторазове копіювання (ампліфікація) певного фрагменту ДНК із допомогою ДНК-полімерази та специфічних олігонуклеотидних ДНК-затравок (праймерів), які є гомологічними кінцям потрібної ділянки ДНК. Цикл ПЛР складається із трьох стадій: денатурації дволанцюгової молекули ДНК; відпалювання – приєднання праймерів до ДНК-матриці; елонгації – добудови другого ланцюгу ДНК у межах праймерних послідовностей. В результаті

багаторазового повторювання циклів ампліфікується потрібний фрагмент ДНК у кількості, яку можна спостерігати та аналізувати після електрофорезу.

## **2.5. Аналіз ПЛР-фрагментів ДНК в агарозному гелі**

Фрагменти ДНК, які були синтезовані в ході ПЛР (копії досліджуваних ділянок ДНК), знаходяться в ампліфікаційній суміші у кількості, яка є достатньою для якісної оцінки. Оскільки фрагменти ДНК є від'ємно зарядженими молекулами, ампліфікаційні продукти для їх подальшого аналізу фракціонували методом електрофорезу в агарозному гелі. ПЛР-фрагменти візуалізували з використанням флуоресцентного барвника броміду етидія та реєстрували фотографічно в УФ-світлі.

## **2.6. ПЛР в реальному часі.**

Даний метод використовується для одночасної ампліфікації та вимірювання кількості заданої молекули ДНК. Оскільки кінетика накопичення продуктів ампліфікації пов'язана із вихідною кількістю матриці, це дає можливість точно оцінити її кількість (на відміну від фрагментного аналізу звичайної ПЛР, при якому оцінюють якісні показники). В результаті вимірювань змін флуоресценції, які в автоматичному режимі відбуваються в реальному часі під час ампліфікації, визначається кількість копій досліджуваної ділянки безпосередньо або опосередковано, відносно внесеної стандартної кількості ДНК чи додаткових калібрувальних генів. За допомогою ПЛР в реальному часі можна також визначати специфічні однонуклеотидні заміни (SNPs). ПЛР в реальному часі не потребує стадії електрофорезу, дозволяє провести повний аналіз проби впродовж 60-120 хвилин та теоретично дозволяє детектувати навіть одну молекулу ДНК або РНК в пробі. Для постановки ПЛР в реальному

часі потрібен спеціальний ампліфікатор із можливістю збуджувати та реєструвати флуоресценцію, яка відображує накопичення ампліконів, на кожному циклі ампліфікації.

Кінетична крива ПЛР у координатах "Рівень репортерної флуоресценції – цикл ампліфікації" має сигмоїдну форму, при чому виділяють три стадії:

1. Стадія ініціації (коли ПЛР-продукти ще не детектуються флуоресцентною міткою – фонова флуоресценція).

2. Експоненціальна стадія (в якій спостерігається експоненціальна залежність кількості флуоресценції від циклу ПЛР).

3. Плато (стадія уповільнення та закінчення накопичення продукту ПЛР).

Цикл при якому спостерігається момент помітного підвищення сигналу та його відриву від фонового – так званий пороговий цикл ( $C_t$ ) – залежить від вихідної кількості ДНК-матриці. Чим більша кількість ДНК у зразку, тим раніше спостерігають початок росту сигналу флуоресценції та тим меншим є  $C_t$ . При визначенні відносної кількості ДНК-матриці або кількості копій досліджуваного гена застосовують формули, які враховують різницю показнику  $C_t$  досліджуваної проби по відношенню до цього значення для референтної проби ( $\Delta C_t$ ).

## **2.7. Ампліфікація ДНК *in vitro***

Для визначення порогу інгібування ампліфікації флуоресцентним барвником, полімеразну ланцюгову реакцію проводили в автоматичному режимі на термоциклері "2720 Thermal Cycler" фірми "Applied Biosystems".

Реакційна суміш об'ємом 15 мкл містила:

- Ампліфікаційний буфер (800 мМ Тріс-НСl (рН 8.6 при 25°C), 200 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0,1% (v/v) Tween™ 20) – 1× ;
- MgCl<sub>2</sub> – 2,5 мМ;
- dNTP – 200 мкМ кожного типу;
- ДНК 6–100 нг;
- термостабільна ДНК-полімераза – 0,5 одиниць активності;
- олігонуклеотидні праймери – по 5 мкМ кожного. –

Було досліджено дві матриці, амплікони яких відрізнялися за довжиною та GC-складом. У якості першої матриці для ПЛР використовували ДНК-фрагмент гена *PMP22* довжиною 131 п.н. та 33,6% GC-вмістом. Послідовність ПЛР-праймерів для цієї мішені була наступною: PMP22\_F: 5'-GCATCTTGTCTCAGTCCTG-3' та PMP22\_R: 5'-GTGTCTTCCAGAGСТААССАСАТТС-3'. У якості другої матриці для ПЛР використовували ДНК-фрагмент з 7 екзону гена *SMN1* довжиною 210 п.н. та 29,4% GC-вмістом. Послідовність ПЛР-праймерів була наступною: SMN1\_F: 5'-ССТТТАТТТТССТТАСAGGGТТТС-3' та SMN1\_R: 5'-GATGTТТТАСАТТААССТТТСААСТТТТ-3'.

У відповідності до оптимальної температури відпалювання праймерів та нуклеотидного складу послідовностей, що ампліфікувалися використовували різні температурно-часові режими проведення ПЛР. Для ДНК-фрагменту гена *PMP22* температурно часові умови ампліфікації були наступними: початкова денатурація – 5 хв при 95 °С, 30 циклів – денатурація ДНК – 20 с при 95 °С, відпалювання праймерів – 30 с при 57 °С, елонгація – 40 с при 72 °С, фінальна елонгація – 5 хв при 72 °С. Для ДНК-фрагменту гена *SMN1* умови ампліфікації були наступними: початкова денатурація – 5 хв при 95 °С, 30 циклів –

денатурація ДНК – 20 с при 95 °С, відпалювання праймерів – 30 с при 61 °С, елонгація – 40 с при 72 °С, фінальна елонгація – 5 хв при 72 °С.

Після ампліфікації зразки охолоджували при кімнатній температурі та зберігали при +40 °С.

## **2.8 Електрофорез продуктів ПЛР в агарозному гелі**

Для електрофорезу використовували 1-кратний TBE-буферний розчин. Продукти ПЛР фракціонували в 1,5 % агарозному гелі та забарвлювали 0,8% розчином інтеркалюючого барвника етидіум броміду. ПЛР-продукти при нанесенні на гель змішували з розчином для нанесення проб ДНК на гель у співвідношенні 5:1 (ПЛР-продукт : розчин для нанесення). Електрофорез проводили на приладі фірми EPS-300 при кімнатній температурі та напруженості електричного поля 15 В/см гелю. Візуалізацію проводили на УФ-трансілюмінаторі. Результати електрофоретичного розділення фрагментів ДНК реєстрували за допомогою фотографування гелю, забарвленого бромідом етидію, розміщеного на УФ-трансілюмінаторі, через жовтий фільтр в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 260 нм).

## **2.9 Проведення ПЛР у реальному часі та аналіз кривої плавлення**

Реакцію кількісної ПЛР проводили з використанням системи ПЛР у реальному часі CFX96 (Bio-Rad, США) за умовами описаних в 3.2.2. Флуоресцентний сигнал досліджуваних барвників вимірювали на каналі 1, що відповідає барвникам FAM та SybrGreen I, із такими параметрами: збудження в діапазоні 450–490 нм та випромінювання в діапазоні 510–530 нм. Якість та концентрацію геномної ДНК при послідовних серіях розведень визначали на приладі ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, США) у діапазоні  $\lambda$ 220 –  $\lambda$ 300. Відношення оптичної щільності, визначеної відповідно при  $\lambda$ 260 та при  $\lambda$ 280,

показувало чистоту препарату ДНК по відношенню до білків і було в межах між 1,9 та 2,0.

Флуоресцентне виявлення здійснювали наприкінці кожного етапу відпалу/подовження, а кількісне значення продуктів ПЛР оцінювали за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad). Значення порогового циклу (Ct) визначали як мінімальне значення у фазі експоненціального зростання флуоресценції, при якому ефективність ПЛР була найближчою до 100 %. Аналіз кривої плавлення проводили з кроком 0,5 °C та 10-секундною затримкою на кожному етапі від 55 °C до 95 °C. Ефективність ПЛР (E) визначали за серією розведень ДНК-матриці та розраховували за рівнянням  $E = (10^{-1/m} - 1) \times 100\%$ , де m – нахил лінійної стандартної кривої.

## **2.10 Статистична обробка отриманих даних**

Залежність значень Ct від концентрації флуоресцентних барвників оцінювали методом лінійної регресії, при цьому розраховані коефіцієнти рівняння оцінювали за статистичним критерієм Краскела-Уоліса. Точність визначення концентрації ДНК зразків як “умовно невідомих” та порівняння експериментальних Ct-значень із теоретичними, розрахованими за рівнянням стандартної кривої визначали з використанням Z-показників та p-значень. Для всіх статистичних тестів в якості критерію статистичної достовірності розглядали 95%-й рівень значущості. Значення ( $p > 0.05$ ) свідчили про відсутність статистично значущих відмінностей між експериментальними та очікуваними Ct-значенням. Дані розрахунки проводили за допомогою пакету програмного забезпечення Statistica v.6.0.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### **3.1. Дослідження флуоресцентних властивостей несиметричних монометинціанінових барвників з нуклеїновими кислотами та альбумінами**

Візуалізація нуклеїнових кислот і білків є важливим елементом низки біологічних методів досліджень, таких як гель-електрофорез, ПЛР, флуоресцентна мікроскопія тощо. Розробка нових зондів, які були б ефективними для певних застосувань, є перспективною, оскільки неодмінно постають нові задачі з новими вимогами до властивостей зондів та їх комплексів з біологічними молекулами. Окрім стандартних вимог, таких як високий коефіцієнт екстинкції, максимально висока інтенсивність флуоресценції за наявності біологічної молекули та максимально низька інтенсивність випромінювання за її відсутності, а також висока фотостабільність, додатковими можуть бути здатність утворювати комплекс з ДНК за достатньо високих температур для ПЛР у реальному часі та здатність або нездатність проникати в клітину для виявлення позаклітинної ДНК .

Враховуючи вищезазначені вимоги, було проведено скринінг понад 20 монометинцианінових барвників серед яких було вибрано 8 найбільш перспективних (рис. 3.1, 3.2, 3.3) для дослідження флуоресцентних властивостей в присутності ДНК, РНК та ЛСА, які базуються на різних хромофорах та містять різні групи,

що модифікують спорідненість. Слід зазначити, що 5 з цих барвників містять хромофори відомих барвників тіазолового оранжевого (**up396** та **fb131**) та оксазолового жовтого (**fb123**, **fb124** та **fb128**). Ці ж хромофори є основою низки відомих комерційно доступних зондів для виявлення нуклеїнових кислот, таких як SYBR Green I та II, SYBR Gold тощо [36, 94]. Тому не дивно, що ці 5 барвників продемонстрували значний приріст інтенсивності у присутності нуклеїнових кислот. Крім того ці барвники не продемонстрували значної селективності для ДНК або РНК; найвища селективність спостерігалася для **up396**, для якого інтенсивність у присутності РНК у 2,3 рази вища, ніж у присутності ДНК. У структурах досліджених барвників згадані хромофори поєднуються з групами, що модифікують спорідненість, які можуть впливати на зв'язування барвників з біологічними молекулами, забезпечуючи додаткову стабільність утвореним комплексам. Зокрема, при взаємодії з нуклеїновими кислотами, фосфатні групи яких негативно заряджені, важливою є наявність додаткових груп, що містять позитивний заряд у молекулі барвника. Такі групи з додатковими позитивними зарядами містяться у **fb128** та **fb131**, тоді як барвники **fb123** та **fb124** є біс-ціанінами, де 2 хромофори пов'язані позитивно зарядженими ланцюгами. Ефективність кон'югації двох зондів-барвників як спосіб отримання більш ефективного зонда, а також роль позитивних зарядів у структурі сполучного ланцюга неодноразово описувалися в літературі [50, 95]. Таким чином, найефективніший з досліджених барвників, **fb128**, який має як найвищу інтенсивність флуоресценції в присутності нуклеїнових кислот, так і найбільший приріст емісії, а також інші барвники, що показали хороші результати, можуть бути додатково досліджені в різних застосуваннях, де використовуються флуоресцентні зонди, чутливі до нуклеїнових кислот.

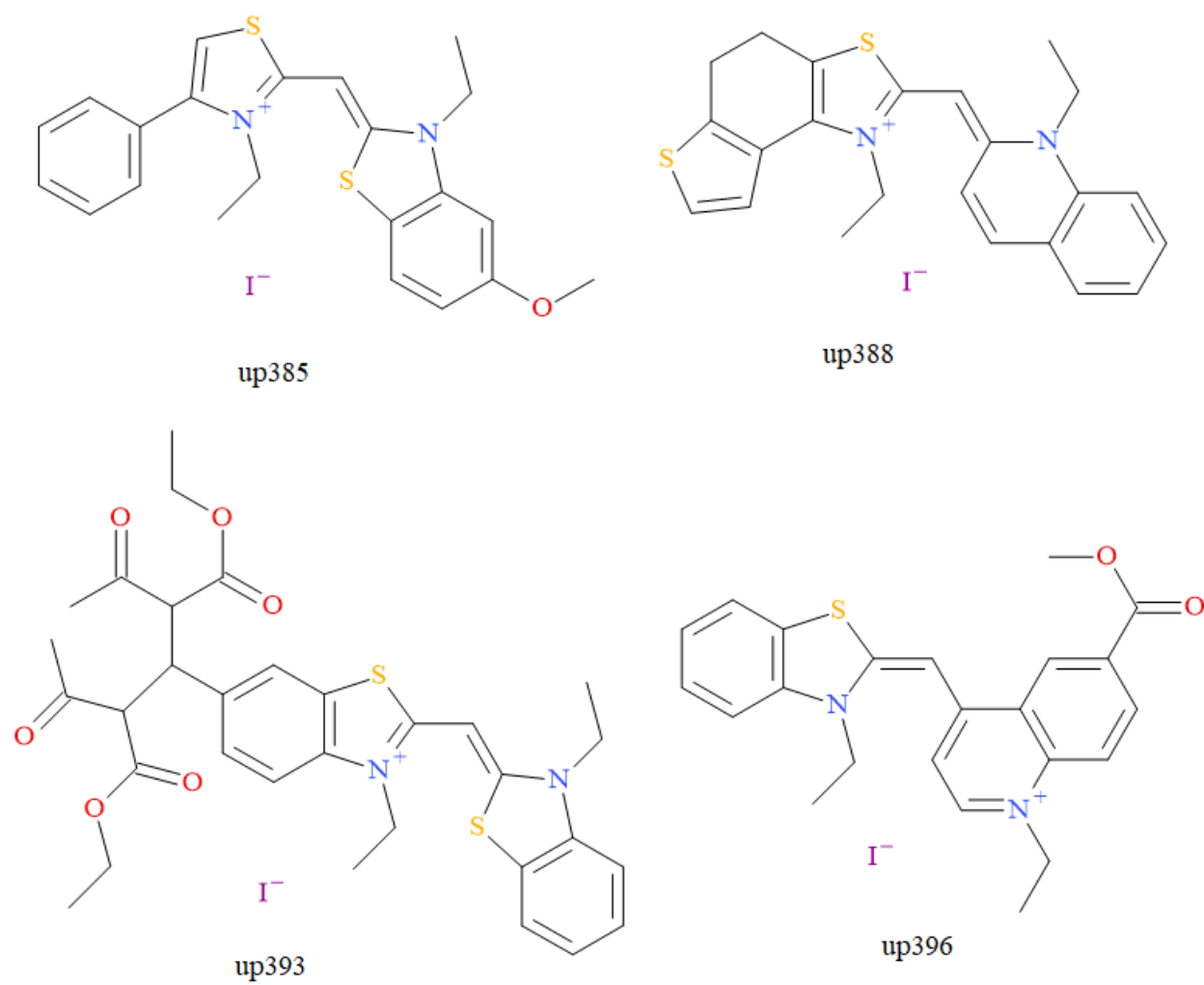
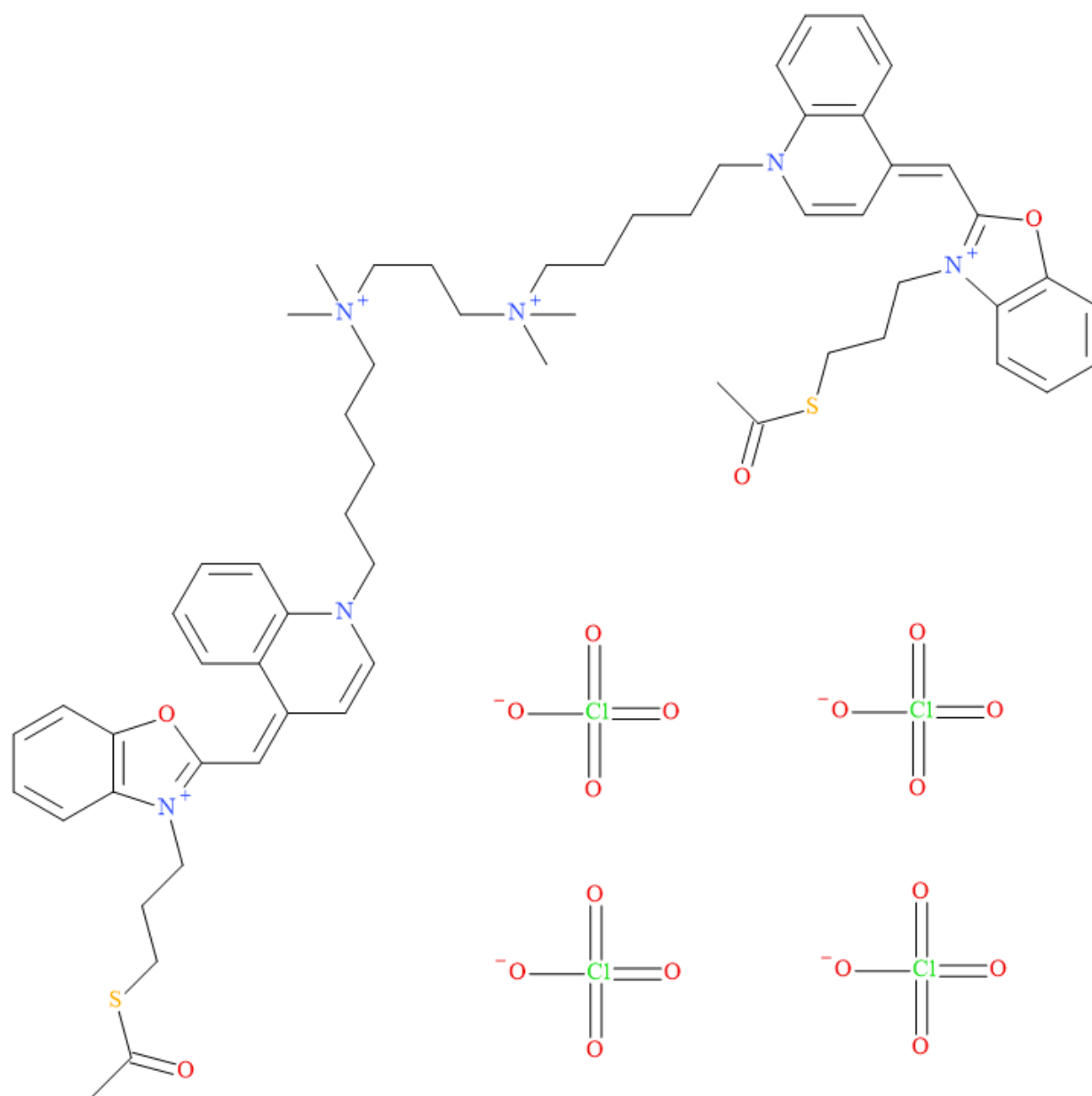


Рис. 3.1. Структура монометинових барвників **up385**, **up388**, **up393**, **up396**



fb123

Рис. 3.2. Структура монометинового барвника **fb123**

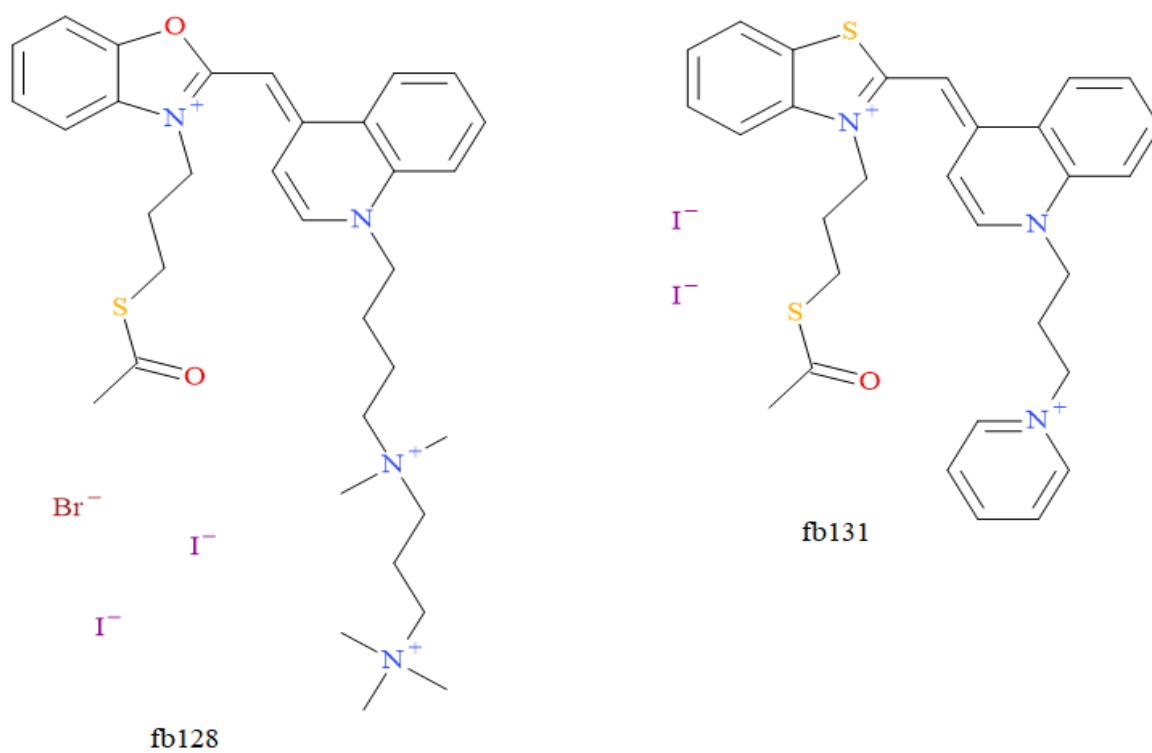
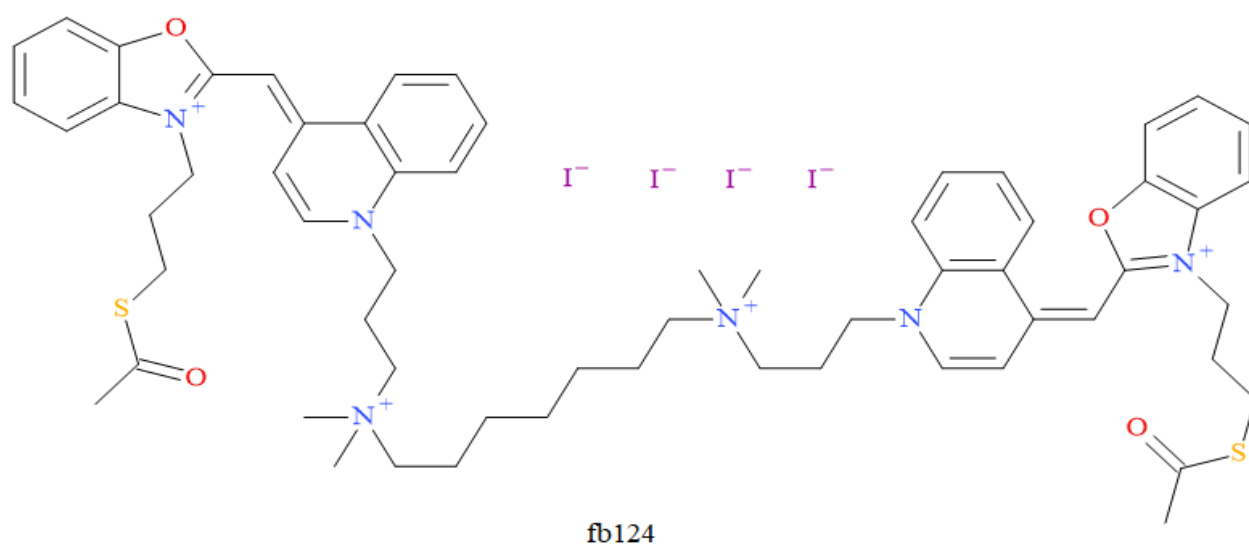


Рис. 3.3. Структура монометинових барвників **fb124**, **fb128**, **fb131**

**3.1.1. Спектральні властивості вільних барвників.** Характеристики спектрів поглинання та флуоресценції барвників в органічному розчиннику (ДМСО) та у водному середовищі (Трис-НСІ буфер, рН 8,0) представлені в таблиці 3.1. Відповідні спектри наведені на рис. 3.4 та рис. 3.5. Спектри поглинання всіх досліджених барвників у ДМСО, які відповідають індивідуальному стану цих сполук, характеризуються наявністю одного інтенсивного максимуму в діапазоні 432–581 нм. Такі спектральні характеристики є типовими для монометинових ціанінових барвників у істинному розчині та свідчать про відсутність суттєвих міжмолекулярних взаємодій.

Таблиця 3.1

Спектральні характеристики монометинових ціанінових барвників у ДМСО та буфері

	ДМСО				0,05М Трис-НСІ буфер (рН 8.0)			
	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	D	$\lambda_{\text{flu}}$ , нм	$I_0$ , в.о.	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	D	$\lambda_{\text{flu}}$ , нм	$I_0$ , в.о.
<b>up385</b>	581	0,299	615	237	632 529	0,128 0,192	680	24
<b>up388</b>	508	0,192	-	-	481	0,158	-*	5
<b>up393</b>	432	0,541	476	35	425	0,55	476	18
<b>up396</b>	523	0,228	-	-	519	0,245	-*	2
<b>fb123</b>	484	0,814	545	39	454	0,548	552	138
<b>fb124</b>	487	0,732	526	19	454	0,555	559	9
<b>fb128</b>	486	1,15	516	31	479	1,09	524	13
<b>fb131</b>	511	0,302	547	5	509	0,336	541	4

$\lambda_{\text{abs}}$ , довжина хвилі максимуму поглинання (нм); D, оптична густина;  $\lambda_{\text{flu}}$ , довжина хвилі максимуму флуоресценції (нм);  $I_0$ , інтенсивність флуоресценції барвника на максимумі (в.о.); \* – інтенсивність шуму, де неможливо було записати спектри випромінювання

Для чотирьох барвників (**up393**, **up396**, **fb128** та **fb131**) спектри поглинання у водному буфері загалом зберігають свою форму порівняно зі спектрами в ДМСО, при цьому максимуми поглинання зазнають незначного гіпсохромного зсуву на 2–7 нм (рис. 3.1.4, рис. 3.1.5). Такі зміни можуть бути пов'язані з відмінностями у сольватації хромофорної системи в полярному апротонному середовищі та не свідчать про асоціацію барвників.

Водночас для барвників **fb123**, **fb124**, **up385** та **up388** форма спектрів поглинання у Тріс-НСІ буфері істотно змінюється. Для цих сполук спостерігається значний короткохвильовий зсув основного максимуму на 27–52 нм порівняно з відповідними спектрами в ДМСО, а також поява менш інтенсивного довгохвильового максимуму. Така форма спектрів поглинання є характерною ознакою утворення Н-агрегатів ціанінових барвників у водному середовищі, що є добре відомим і поширеним явищем для цього класу сполук [59, 96, 97]. Формування агрегатів у буфері можна пояснити поєднанням гідрофобного ефекту, зменшенням ефективності сольватації та посиленням  $\pi$ - $\pi$  взаємодій між планарними хромофорними системами.

Довгохвильовий максимум у спектрах поглинання барвників **fb123** та **fb124** розташований приблизно на тих самих довжинах хвиль, що й максимум у ДМСО, і тому може бути віднесений до поглинання індивідуальних молекул барвника. У випадку барвників **up385** та **up388** довгохвильовий максимум зміщений у довгохвильову область та, з огляду на ширину смуги, ймовірно, відповідає менш інтенсивному довгохвильовому переходу Н-агрегатів для **up385** [98] та J-агрегатів для **up388** [99]. Таким чином, навіть у межах однієї серії монометинових барвників характер самоасоціації у водному середовищі може суттєво відрізнитися.

Спектри флуоресценції досліджених барвників у ДМСО (за винятком **up388** та **up396**, для яких спектр випромінювання не вдалося зареєструвати)

відповідають випромінюванню неагрегованого барвника. Максимуми флуоресценції розташовані в діапазоні 476–615 нм, (рис. Б.5, рис. Б.6, рис. Б.7, рис. Б.8), а величина стоксівського зсуву становить від 30 до 61 нм. Для всіх барвників у ДМСО спостерігаються низькі значення інтенсивності флуоресценції ( $I_0 < 40$  відносних одиниць), за винятком барвника **up385**, для якого інтенсивність досягає 237 відносних одиниць. Низький квантовий вихід флуоресценції у вільному стані є характерною особливістю монометинових ціанінових барвників і пов'язаний з високою внутрішньомолекулярною рухливістю поліметинового ланцюга, що зумовлює ефективну безвипромінювальну релаксацію збудженого стану.

При переході від ДМСО до водного середовища максимуми спектрів флуоресценції барвників **up393**, **fb123**, **fb128** та **fb131** змінюються не більше ніж на 8 нм, що свідчить про збереження характеру випромінювання індивідуального барвника. Водночас для барвників **up385** та **fb124** спостерігається значно більший зсув максимумів (65 та 33 нм відповідно), що може вказувати на флуоресценцію агрегованих форм. Інтенсивність флуоресценції у буфері зменшується для всіх досліджених барвників порівняно з ДМСО, за винятком **fb123**. Таке зниження може бути зумовлене як посиленням агрегаційних процесів у водному середовищі, так і зростанням ефективності безвипромінювальної релаксації у полярному протонному розчиннику.

Барвники **up388** та **up396** у Тріс-НСІ буфері, як і в ДМСО, не демонструють випромінювання вище рівня шуму, у зв'язку з чим у таблиці 3.1 наведено лише значення шумової інтенсивності. Відсутність реєстрованої флуоресценції для цих барвників у вільному стані додатково підкреслює роль середовища та міжмолекулярних взаємодій у формуванні флуоресцентних властивостей монометинових ціанінових барвників.

Отже, результати дослідження спектральних властивостей вільних барвників свідчать, що природа розчинника істотно впливає як на асоціацію їхніх молекул, так і на флуоресцентні характеристики досліджених сполук. Виявлені особливості є важливими для подальшого аналізу змін спектральних властивостей барвників у присутності біологічних макромолекул, де агрегаційні процеси можуть бути модифіковані або пригнічені внаслідок комплексоутворення.

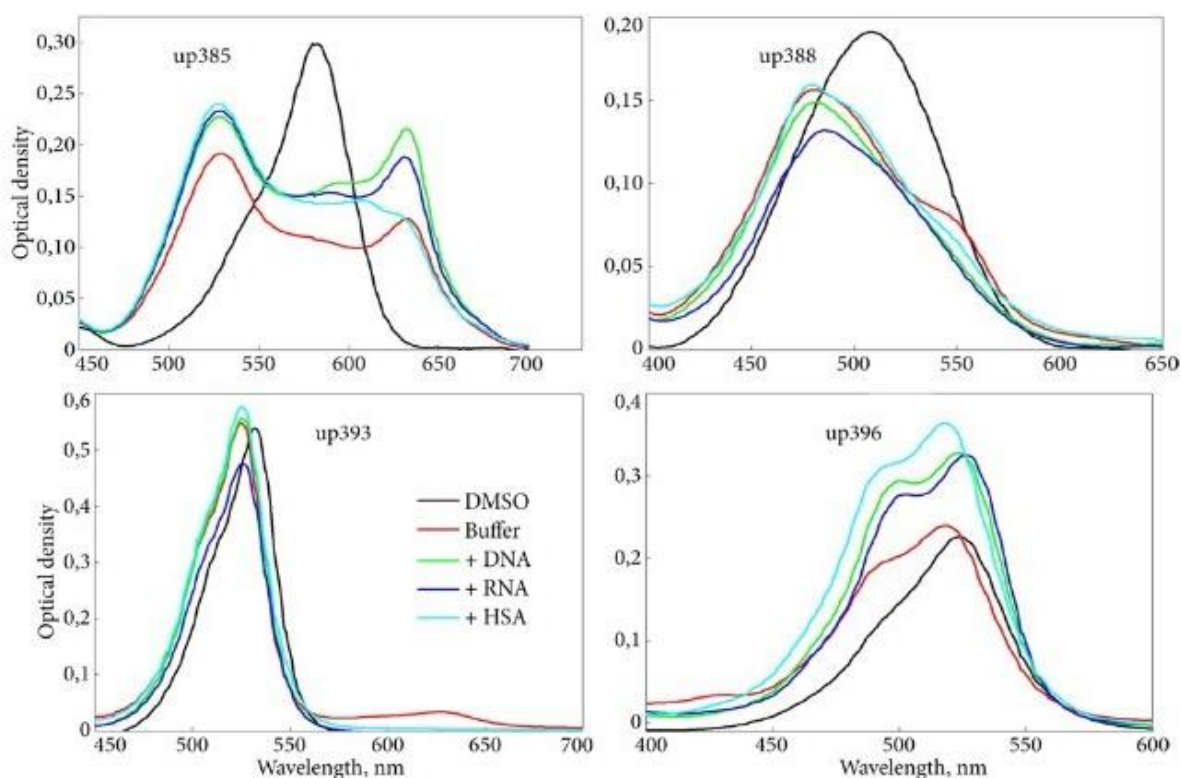


Рис. 3.4. Спектри поглинання барвників **up385**, **up388**, **up393** та **up396** у ДМСО, у буфері та у присутності ДНК, РНК та ЛСА

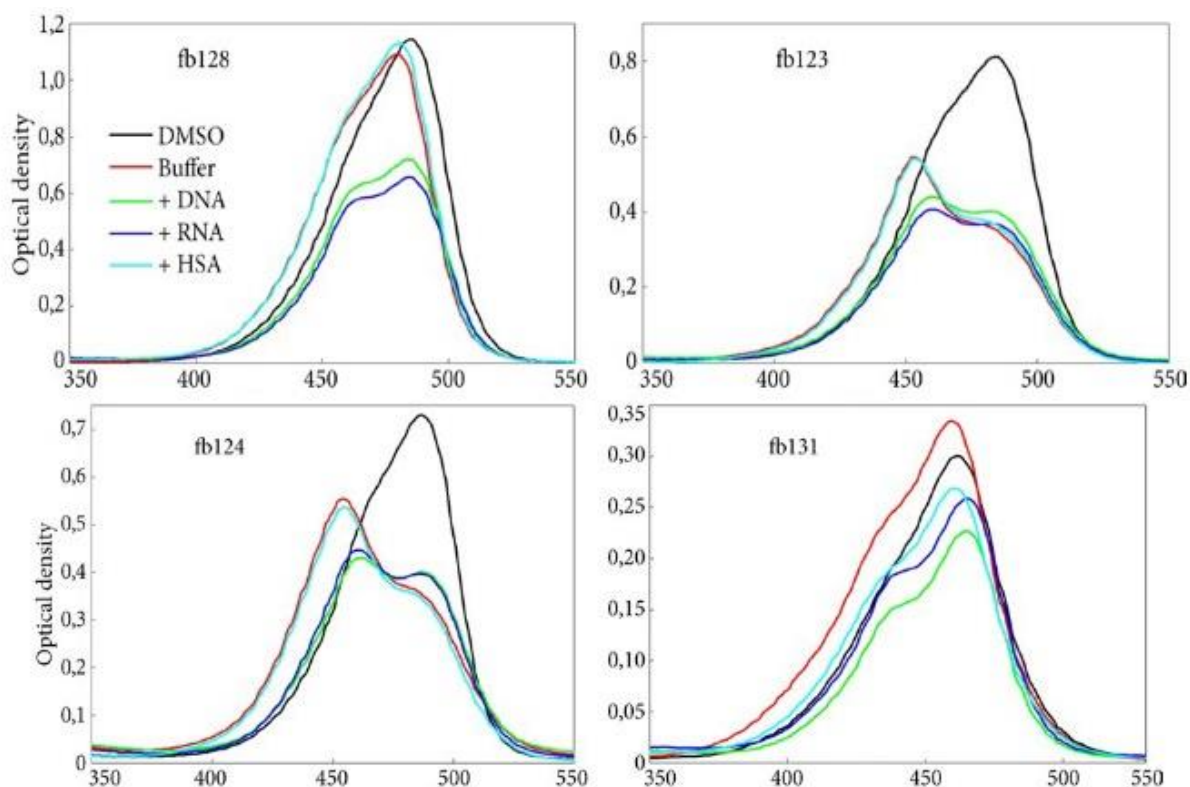


Рис. 3.5. Спектри поглинання барвників **fb123**, **fb124**, **fb128** та **fb131** у ДМСО, у буфері та у присутності ДНК, РНК та ЛСА

### 3.1.2. Спектральні властивості барвників у присутності ДНК та РНК.

Характеристики спектрів поглинання та флуоресценції досліджених барвників у присутності ДНК та РНК наведені в таблиці 3.2, а відповідні спектри представлені на рис. 3.4 та рис. 3.5. Аналіз даних таблиці свідчить, що додавання нуклеїнових кислот у більшості випадків не призводить до суттєвих змін положення основних максимумів спектрів поглинання барвників. Зокрема, для барвників **ur385**, **ur393** та **ur388** у присутності ДНК положення максимумів залишається практично незмінним, тоді як для **ur388** у присутності

РНК, а також для решти досліджених барвників, спостерігається незначний короткохвильовий зсув у межах 4–7 нм.

Таблиця 3.2

## Спектральні характеристики барвників у присутності ДНК, РНК та ЛСА

	ДНК					РНК					ЛСА				
	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	D	$\lambda_{\text{flu}}$ , нм	$I_0$ , в.о.	$\Delta Q$	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	D	$\lambda_{\text{flu}}$ , нм	$I_0$ , в.о.	$\Delta Q$	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	D	$\lambda_{\text{flu}}$ , нм	$I_0$ , в.о.	$\Delta Q$
<b>up385</b>	529 632	0,228 0,216	679	38	<b>1,6</b>	529 632	0,234 0,216	676	58	<b>2,4</b>	528 606	0,24 0,148	618	1409	<b>58,7</b>
<b>up388</b>	482	0,15	543 641	13	<b>2,6</b>	487	0,132	577	23	<b>4,6</b>	480	0,16	619	136	<b>27,2</b>
<b>up393</b>	426	0,557	465	278	<b>15,4</b>	425	0,477	463	660	<b>36,6</b>	425	0,579	482	121	<b>6,72</b>
<b>up396</b>	523	0,329	557	204	<b>102</b>	526	0,365	556	462	<b>231</b>	518	0,365	566	10	<b>5</b>
<b>fb123</b>	459	0,442	537	1545	<b>11,2</b>	461	0,41	530	1500	<b>10,9</b>	454	0,544	547	197	<b>1,4</b>
<b>fb124</b>	461	0,432	520	685	<b>76,1</b>	461	0,449	515	492	<b>54,6</b>	454	0,54	553	88	<b>9,7</b>
<b>fb128</b>	485	0,782	513	2090	<b>160,7</b>	485	0,65	513	3090	<b>237,7</b>	480	1,13	510	38	<b>2,9</b>
<b>fb131</b>	515	0,227	536	590	<b>147,5</b>	515	0,26	538	873	<b>218,3</b>	510	0,27	536	10	<b>2,5</b>

$\lambda_{\text{abs}}$ , довжина хвилі поглинання максимуму (нм); D, оптична густина;  $\lambda_{\text{flu}}$ , довжина хвилі максимуму флуоресценції (нм);  $I_0$ , інтенсивність флуоресценції барвника на максимумі (в.о.);  $\Delta Q$ , приріст інтенсивності флуоресценції

Такі зсуви можуть бути зумовлені змінами локального мікрооточення хромофорної системи барвника при взаємодії з нуклеїновими кислотами, а також частковим пригніченням агрегаційних процесів у водному середовищі. Водночас відсутність значних батохромних зсувів свідчить про те, що електронна структура хромофора в основному зберігається і комплексоутворення з ДНК та РНК не супроводжується суттєвими перебудовами електронної системи барвників.

Для барвників **fb123** та **fb124**, а також у значно меншій мірі для **fb131** та **fb128**, у присутності ДНК та РНК спостерігається зростання відносного внеску

довгохвильової смуги у спектр поглинання, яка відповідає індивідуальним молекулам барвника. Така зміна форми спектрів може бути пов'язана зі зв'язуванням біс-ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами, внаслідок чого два хромофорні фрагменти молекули опиняються на більшій відстані один від одного. Це, у свою чергу, призводить до послаблення міжхромофорної взаємодії та часткового руйнування агрегатних форм, що добре узгоджується з літературними даними щодо поведінки біс-ціанінових барвників у присутності ДНК та РНК.

Спектри флуоресценції більшості досліджених барвників у присутності ДНК та РНК відповідають випромінюванню індивідуальних молекул барвника, а положення максимумів флуоресценції є близьким до відповідних значень, отриманих у ДМСО (рис. Б.5, рис. Б.6, рис. Б.7, рис. Б.8). Це свідчить про те, що зв'язування барвників з нуклеїновими кислотами супроводжується ефективним обмеженням внутрішньомолекулярної рухливості хромофорної системи без формування агрегатних станів, що є характерною особливістю інтеркаляційних або борозенкових комплексів.

Винятком є барвник **up385**, для якого максимуми флуоресценції у присутності ДНК та РНК зміщені на 64 та 61 нм відповідно відносно максимуму в ДМСО і є близькими до максимуму, характерного для агрегатного стану у буфері. Така спектральна поведінка може свідчити про те, що взаємодія **up385** з нуклеїновими кислотами не супроводжується повним руйнуванням агрегатів, або ж про формування специфічних комплексів, спектральні характеристики яких близькі до агрегатних форм барвника.

Наявність ДНК та РНК у всіх випадках призводить до зростання інтенсивності флуоресценції досліджених барвників. Найвищі абсолютні значення інтенсивності флуоресценції у присутності нуклеїнових кислот демонструють барвники **fb123** та **fb128**, для яких інтенсивність досягає 1500–

3000 відносних одиниць (рис. 3.6, рис. Б.5, рис. Б.7). Така флуоресцентна відповідь є типовою для ціанінових барвників, флуоресценція яких суттєво зростає при зв'язуванні з ДНК або РНК внаслідок зменшення безвипромінювальних втрат енергії.

Водночас, максимальне співвідношення інтенсивності флуоресценції у присутності ДНК або РНК до відповідної інтенсивності у буфері ( $\Delta Q$ ) спостерігається для барвників **up396**, **fb128** та **fb131** і становить 100–240 разів. Для барвників **up393**, **fb123** та **fb124** значення приросту флуоресценції  $\Delta Q$  знаходиться в межах 10,9–76,1 разів, тоді як для **up385** та **up388** цей показник не перевищує 4,6 разів. Низькі значення  $\Delta Q$  для останніх двох барвників узгоджуються з їхньою слабкою взаємодією з нуклеїновими кислотами, що проявляється як у відсутності значних змін у спектрах поглинання, так і у незначному зростанні інтенсивності флуоресценції.

Таким чином, аналіз спектральних властивостей барвників у присутності ДНК та РНК свідчить про суттєві відмінності у характері їхньої взаємодії з нуклеїновими кислотами. Для частини барвників зв'язування з ДНК та РНК супроводжується ефективним пригніченням агрегації та значним зростанням флуоресценції, тоді як інші сполуки демонструють лише слабку флуоресцентну відповідь, що вказує на обмежену афінність до нуклеїнових кислот. Отримані результати створюють основу для подальшого аналізу структурних чинників, які визначають ефективність взаємодії монометинових ціанінових барвників з біологічними макромолекулами.

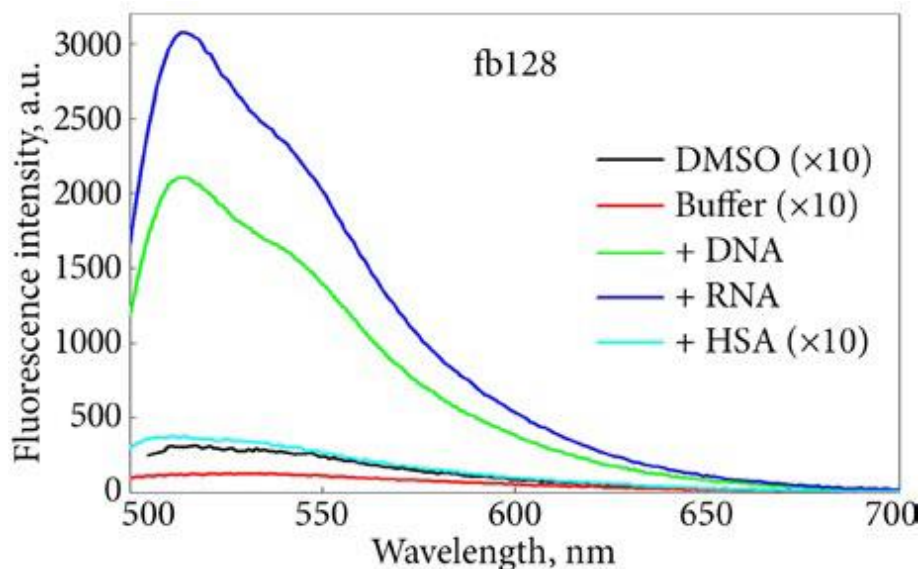


Рис. 3.6. Спектри флуоресценції барвника **fb128** у ДМСО, у буфері та у присутності ДНК, РНК та ЛСА. Спектри в ДМСО, буфері та у присутності ЛСА збільшені в 10 разів для кращої видимості

### 3.1.3. Спектральні властивості барвників у присутності ЛСА.

Характеристики спектрів поглинання та флуоресценції досліджених барвників у присутності людського сироваткового альбуміну (ЛСА) наведені в таблиці 3.2, а відповідні спектри представлені на рис. 3.4 та рис. 3.5. Аналіз положення максимумів спектрів поглинання показує, що додавання ЛСА практично не впливає на електронну структуру хромофорної системи більшості досліджених барвників. Зміни положення максимумів поглинання у присутності білка не перевищують 2 нм порівняно з відповідними значеннями у Тріс-НСІ буфері, що свідчить про відсутність суттєвих батохромних або гіпсохромних зсувів при взаємодії барвників з альбуміном.

Такий характер змін спектрів поглинання дозволяє припустити, що зв'язування барвників з ЛСА не супроводжується значними перебудовами

електронної системи хромофора, а взаємодія з білком відбувається переважно за рахунок нековалентних контактів без істотного впливу на енергетичні рівні електронних переходів. Це узгоджується з відомими даними щодо здатності альбуміну зв'язувати широкий спектр низькомолекулярних лігандів у своїх гідрофобних кишнях без істотної зміни їхніх спектральних характеристик.

Єдиним барвником, для якого спостерігаються помітні зміни у спектрі поглинання при додаванні ЛСА, є **up385**. У цьому випадку введення білка призводить до зменшення інтенсивності максимуму при 632 нм та появи нового максимуму при 606 нм, який може бути віднесений до неагрегованого стану барвника. Така перебудова спектра свідчить про зменшення процесів агрегації **up385** у водному середовищі за рахунок його взаємодії з альбуміном.

Це припущення підтверджується аналізом спектрів флуоресценції. Максимум флуоресценції барвника **up385** у присутності ЛСА розташований при 618 нм, що є близьким до відповідного максимуму в ДМСО (615 нм) і суттєво відрізняється від положення максимуму, характерного для агрегованого стану в буфері. Водночас інтенсивність флуоресценції **up385** у присутності ЛСА зростає майже у 60 разів порівняно з буфером. Таким чином, серед усіх досліджених барвників саме **up385** демонструє як найвищу абсолютну інтенсивність флуоресценції у присутності альбуміну, так і найбільший ступінь її зростання.

Показово, що барвник **up385**, який виявляє найвищу флуоресцентну відповідь у присутності ЛСА, характеризується найнижчим приростом флуоресценції при додаванні ДНК та РНК. Така відмінність у поведінці свідчить про принципово різний характер взаємодії цього барвника з білковими та нуклеїновими мішенями і вказує на його селективну чутливість до білкового мікрооточення.

Іншим барвником, який демонструє суттєве зростання інтенсивності флуоресценції у присутності ЛСА, є **up388**. Для цього барвника приріст інтенсивності випромінювання становить приблизно 27 разів. Водночас, на відміну від **up385**, у спектрах поглинання **up388** не спостерігається чітких ознак переходу від агрегованого до індивідуального стану, що може свідчити про інший механізм флуоресцентної активації, пов'язаний із частковим обмеженням внутрішньомолекулярної рухливості барвника в білковому середовищі.

Для решти досліджених барвників додавання ЛСА призводить до помірної зростання інтенсивності флуоресценції, яке не перевищує 10-кратного значення. Така флуоресцентна відповідь може бути пов'язана з неспецифічною взаємодією барвників з поверхнею або внутрішніми кишнями білка, що лише частково обмежує канали безвипромінювальної релаксації збудженого стану.

Отже, результати дослідження спектральних властивостей барвників у присутності людського сироваткового альбуміну свідчать про наявність істотних відмінностей у їхній взаємодії з білковим мікрооточенням. Для окремих барвників зв'язування з ЛСА супроводжується зменшенням агрегації та значною активацією флуоресценції, тоді як для інших сполук флуоресцентна відповідь є помірною. Виявлені особливості підкреслюють важливу роль структурних чинників у формуванні взаємодії монометинових ціанінових барвників з білками-переносниками.

**3.1.4. Вплив замісників на спектральні та зв'язувальні властивості монометинових ціанінових барвників.** Структурні особливості монометинціанінових барвників, зокрема природа хромофорної системи та наявність замісників, що модифікують спорідненість, суттєво впливають як на їхні спектральні характеристики, так і на ефективність взаємодії з біологічними макромолекулами. У дослідженій серії барвників спостерігається чітка кореляція між хімічною будовою молекул, характером замісників та змінами спектрів поглинання і флуоресценції у різних середовищах.

Одним з ключових чинників є електронна природа замісників, які входять до складу поліметинової системи або безпосередньо прилягають до хромофора. Донорні або слабко донорні замісники сприяють делокалізації  $\pi$ -електронної густини вздовж спряженої системи, що, у свою чергу, може призводити до батохромного зсуву максимумів поглинання та флуоресценції, а також до підвищення коефіцієнта екстинкції. Натомість електронно-акцепторні або об'ємні замісники можуть частково порушувати ефективність  $\pi$ -спряження, що відображається у гіпсохромних зсувах або зниженні інтенсивності випромінювання.

Окрім електронних ефектів, значну роль відіграють стеричні фактори. Наявність об'ємних замісників у безпосередній близькості до поліметинового ланцюга може обмежувати внутрішньомолекулярні обертальні рухи, зокрема обертання навколо метинового зв'язку. Таке обмеження рухливості зменшує безвипромінювальну релаксацію збудженого стану, що є однією з основних причин низької флуоресценції ціанінових барвників у вільному стані.

Особливу увагу слід приділити ролі позитивно заряджених замісників, які безпосередньо впливають на взаємодію барвників з нуклеїновими кислотами. Оскільки фосфатний остов ДНК і РНК має негативний заряд, наявність додаткових катіонних центрів у структурі барвника зміцнює його

електростатичну взаємодію з нуклеїновими кислотами. Це чітко проявляється для барвників **fb128** та **fb131**, які містять додаткові позитивно заряджені групи і демонструють як високі абсолютні значення інтенсивності флуоресценції, так і значний приріст емісії ( $\Delta Q$ ) у присутності ДНК та РНК.

Біс-ціанінові барвники **fb123** та **fb124** є окремим прикладом структурної модифікації, спрямованої на підвищення ефективності взаємодії з нуклеїновими кислотами. У цих сполуках два хромофори з'єднані через позитивно заряджений ланцюг, що дозволяє реалізувати кооперативний ефект зв'язування. У присутності ДНК або РНК відбувається просторове розведення хромофорів, що зменшує перенос енергії між ними і втрату інтенсивності флуоресценції внаслідок перепоглинання характерну агрегатам барвника. Це узгоджується зі збільшенням внеску довгохвильової смуги поглинання та суттєвим зростанням інтенсивності флуоресценції.

Вплив замісників також проявляється у селективності барвників до різних біологічних мішеней. Так, барвники **up385** та **up388**, які мають відносно слабку реакцію на присутність нуклеїнових кислот, проте демонструють значне зростання флуоресценції у присутності людського сироваткового альбуміну. Це може бути пов'язано з наявністю гідрофобних або кисневмісних замісників, які сприяють включенню барвника у гідрофобні кишені білка та стабілізації мономерної форми барвника в білковому мікрооточенні.

Таким чином, результати дослідження свідчать, що варіація замісників у структурі монометинціанінових барвників є ефективним інструментом тонкого налаштування їхніх спектральних властивостей, ступеня агрегації та спорідненості до біологічних макромолекул. Це відкриває можливості цілеспрямованого дизайну флуоресцентних зондів із заданими характеристиками для виявлення нуклеїнових кислот або білків у різних біологічних системах.

**3.1.5. Структурні передумови взаємодії монометинових ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами.** Здатність монометинціанінових барвників до ефективної флуоресцентної відповіді у присутності нуклеїнових кислот визначається не лише їхніми спектральними характеристиками, але й особливостями молекулярної будови, які обумовлюють характер та міцність нековалентної взаємодії з ДНК і РНК. Для барвників **fb123**, **fb124**, **fb128**, **fb131** та **ur396** можна виділити низку структурних факторів, що потенційно сприяють їх зв'язуванню з нуклеїновими кислотами та стабілізації комплексу барвник–біополімер.

Однією з ключових передумов ефективної взаємодії є наявність планарної спряженої  $\pi$ -електронної системи, характерної для ціанінових барвників. Така будова створює умови для  $\pi$ – $\pi$  стекінгових взаємодій з ароматичними основами нуклеїнових кислот, що розглядається як одна з можливих складових інтеркаляційного або напівінтеркаляційного механізму зв'язування. Планарність хромофора особливо важлива для стабілізації комплексу між парами основ ДНК або в упорядкованих ділянках РНК.

Для барвників **fb128** та **fb131** додатковим чинником є наявність позитивно заряджених груп у структурі молекули. Ці групи можуть брати участь в електростатичній взаємодії з негативно зарядженими фосфатними групами остову нуклеїнових кислот, підвищуючи спорідненість барвника до ДНК та РНК, і може стабілізувати його положення як у борозенках так і між парами основ.

Біс-ціанінові барвники **fb123** та **fb124**, які містять два хромофорні фрагменти, з'єднані через заряджений лінкер, потенційно здатні реалізовувати кооперативний механізм зв'язування. У такому випадку один з хромофорів може брати участь у  $\pi$ – $\pi$  взаємодії з основами нуклеїнової кислоти, тоді як другий стабілізується за рахунок електростатичних або гідрофобних контактів з

прилеглими ділянками біополімеру. Подібна просторова організація може підвищувати загальну стабільність комплексу без обов'язкової глибокої інтеркаляції обох хромофорів.

Барвник **ur396**, який містить хромофор тіазолового оранжевого, відомий високою чутливістю до нуклеїнових кислот, може взаємодіяти з ДНК та РНК за рахунок поєднання кількох механізмів: електростатичного притягання, гідрофобної взаємодії в стані часткової інтеркаляції та обмеження внутрішньомолекулярної рухливості після зв'язування. Саме обмеження обертальних ступенів свободи поліметінового ланцюга після комплексоутворення і фіксація планарної конформації  $\pi$ -електронної системи хромофора розглядається як одна з основних причин зростання інтенсивності флуоресценції для таких барвників.

Слід підкреслити, що реальний механізм взаємодії монометінових ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами, ймовірно, не є унітарним і може включати комбінацію інтеркаляції, борозенкового зв'язування та поверхневої електростатичної адсорбції. Відносний внесок кожного з цих механізмів визначається як структурою барвника, так і конформаційним станом ДНК або РНК, а також умовами середовища.

Таким чином, наявність планарних хромофорів, позитивно заряджених груп та можливість просторового розведення або кооперативної взаємодії хромофорних фрагментів дозволяє розглядати барвники **fb123**, **fb124**, **fb128**, **fb131** та **ur396** як перспективні флуоресцентні зонди для нуклеїнових кислот. Їхні структурні особливості створюють передумови для ефективного зв'язування з ДНК та РНК і формування флуоресцентно-активних комплексів, що робить доцільним подальше дослідження цих сполук у прикладних біомолекулярних системах.

**3.1.6. Особливості взаємодії барвників **ur385** та **ur388** з людським сироватковим альбуміном.** Барвники **ur385** та **ur388** істотно відрізняються від інших досліджених сполук характером флуоресцентної відповіді: вони практично не демонструють зв'язування з ДНК та РНК, що підтверджується низькими значеннями приросту флуоресценції ( $\Delta Q \leq 4$ ), однак у присутності людського сироваткового альбуміну спостерігається суттєве зростання інтенсивності випромінювання. Така поведінка свідчить про відмінний механізм взаємодії цих барвників з білковими системами порівняно з нуклеїновими кислотами.

Структурно барвник **ur385** містить фенільний фрагмент з одного боку хромофора та метокси-замісник з іншого, що не створює очевидних передумов для інтеркаляції або електростатичної взаємодії з фосфатним остовом нуклеїнових кислот. Водночас наявність ароматичних фрагментів може сприяти неспецифічним гідрофобним та  $\pi$ - $\pi$  взаємодіям з амінокислотними залишками альбуміну, що потенційно стабілізує барвник у білковому мікрооточенні.

Барвник **ur388** містить тіофеновий фрагмент, з'єднаний через ненасичений цикл, а також хіноліновий фрагмент, характерний для барвників типу тіазолового оранжевого. Поєднання гетероароматичних систем у структурі барвника може сприяти його включенню у білкові кишені альбуміну за рахунок сукупності слабких нековалентних взаємодій, зокрема ван-дер-ваальсових та  $\pi$ - $\pi$  контактів, без утворення специфічних високоспоріднених комплексів.

Суттєве зростання інтенсивності флуоресценції **ur385** та **ur388** у присутності альбуміну, ймовірно, пов'язане не з конкретними функціональними групами, а з ефектом білкового мікрооточення, яке обмежує внутрішньомолекулярну рухливість хромофора та зменшує агрегацію барвників у водному середовищі. Такий механізм є характерним для низки

флуоресцентних барвників, чутливих до білкових матриць, і не вимагає наявності чітко виражених афінних груп.

Таким чином, барвники **ur385** та **ur388** можуть бути віднесені до сполук, флуоресцентні властивості яких значною мірою визначаються умовами мікрооточення, зокрема наявністю білків-переносників, а не специфічною взаємодією з нуклеїновими кислотами. Це відрізняє їх від барвників, орієнтованих на зв'язування з ДНК та РНК, і розширює спектр потенційних застосувань досліджуваної серії сполук.

**3.1.7 Висновки до підрозділу 3.1.** У даному розділі було систематично досліджено вплив ДНК, РНК та ЛСА на спектри поглинання та флуоресценції восьми монометинових ціанінових барвників різної структури. Отримані результати свідчать, що як спектральні характеристики вільних барвників, так і їхня флуоресцентна відповідь у присутності біологічних макромолекул суттєво залежать від будови хромофорної системи, природи замісників та здатності барвників до самоасоціації у водному середовищі.

Слід зазначити, що п'ять з досліджених барвників містять в складі хромофорну частину добре відомих барвників: тіазолового оранжевого (**ur396** та **fb131**) та оксазолового жовтого (**fb123**, **fb124** та **fb128**). Саме ці хромофорні системи лежать в основі низки широко використовуваних комерційних флуоресцентних зондів для детекції нуклеїнових кислот, зокрема SYBR Green I та II, SYBR Gold та споріднених сполук [36, 94]. У зв'язку з цим спостережуваний значний приріст інтенсивності флуоресценції цих барвників у присутності ДНК та РНК є очікуваним і узгоджується з літературними даними щодо поведінки ціанінових барвників у комплексах з нуклеїновими кислотами.

Разом з тим, аналіз спектральних змін показав, що досліджувані барвники загалом не демонструють високої селективності до типу нуклеїнової кислоти. Найбільша відносна селективність спостерігалася для барвника **ur396**, для

якого інтенсивність флуоресценції у присутності РНК була у 2,3 рази вищою, ніж у присутності ДНК. Така поведінка може бути зумовлена особливостями просторової організації комплексів барвника з різними типами нуклеїнових кислот, а також відмінностями у локальному мікрооточенні хромофора.

У структурах досліджених барвників хромофорні системи поєднані з різними замісниками, які модифікують їхню спорідненість до біологічних макромолекул і можуть відігравати важливу роль у стабілізації утворених комплексів. Зокрема, при взаємодії з нуклеїновими кислотами, фосфатний остов яких несе негативний заряд, важливим чинником є наявність у молекулі барвника додаткових позитивно заряджених груп. Такі групи присутні у барвниках **fb128** та **fb131**, тоді як барвники **fb123** та **fb124** є біс-ціанінами, у яких два хромофори з'єднані позитивно зарядженими ланцюгами. Відомо, що як збільшення сумарного позитивного заряду, так і кон'югація двох хромофорів можуть підвищувати ефективність зв'язування з нуклеїновими кислотами, що неодноразово підтверджувалося в літературі [50, 95].

Важливим чинником, який впливає на флуоресцентні властивості барвників, є їхня здатність до утворення мономерних або агрегованих форм у водному середовищі. Показано, що для частини досліджених сполук у буфері характерне утворення Н- або J-агрегатів, що супроводжується пригніченням флуоресценції. Зв'язування барвників з ДНК або РНК у низці випадків призводить до часткового або повного зникнення агрегації, що проявляється у зростанні інтенсивності флуоресценції та зміні форми спектрів поглинання. Таким чином, ефективна флуоресцентна відповідь барвників у присутності нуклеїнових кислот значною мірою зумовлена переходом від агрегованого до мономерного стану хромофора.

Найбільш ефективним з досліджених барвників виявився **fb128**, який характеризується як високою абсолютною інтенсивністю флуоресценції у

присутності ДНК та РНК, так і значним відносним приростом емісії. Збільшення інтенсивності флуоресценції цього барвника становить 160 разів у присутності ДНК та 240 разів у присутності РНК, що свідчить про його високу чутливість до нуклеїнових кислот. Разом з іншими барвниками, які продемонстрували значний флуоресцентний відгук, **fb128** може розглядатися як перспективна сполука для подальших досліджень і потенційних застосувань у якості флуоресцентного зонда.

Окрему групу становлять три інші досліджені барвники, поведінка яких істотно відрізняється від описаних вище. Барвник **up393**, що містить дві бензотіазольні групи, одна з яких модифікована розгалуженим кисневмісним замісником, демонструє помірну, але стабільну чутливість до ДНК та РНК. Натомість барвники **up385** та **up388** характеризуються дуже низькою флуоресцентною реакцією на присутність нуклеїнових кислот, проте проявляють високу чутливість до людського сироваткового альбуміну, особливо барвник **up385**.

Взаємодія **up385** та **up388** з альбуміном супроводжується значним зростанням інтенсивності флуоресценції, що, ймовірно, пов'язано з включенням молекул барвників у білкові кишені та обмеженням їхньої внутрішньомолекулярної рухливості. Для барвника **up385** спостерігається також руйнування агрегатів у водному середовищі, що додатково сприяє активації флуоресценції. Така поведінка вказує на можливість застосування цих барвників у біологічних системах для детекції сироваткового альбуміну та інших білків.

Отже, результати проведених досліджень демонструють, що монометинові ціанінові барвники однієї структурної серії можуть істотно відрізнятися за характером взаємодії з ДНК, РНК та ЛСА. Поєднання хромофорної системи, замісників, сумарного заряду та здатності до агрегації визначає спектральні та

флуоресцентні властивості барвників у біологічно релевантних середовищах. Отримані дані дозволяють розглядати досліджені сполуки як перспективну основу для подальшого цілеспрямованого дизайну флуоресцентних зондів з заданою чутливістю до нуклеїнових кислот або білкових мішеней.

За результатами досліджень опубліковані наступні наукові праці:

Kazakov-Kravchenko O. S., Balanda A., Losytskyy M., Yarmoluk S. “Effect of DNA, RNA and HSA on the spectral-luminescent properties of several monomethine cyanine dyes” *Biopolymers and Cell*, 2025, 41(2), 121; <https://doi.org/10.7124/bc.000B16>

### **3.2. Дослідження флуоресцентних властивостей діоксаборонових барвників з нуклеїновими кислотами та альбумінами**

У дифлуородіоксаборонових аддуктів  $\beta$ -дикетонних поліметинових барвників введення 1,3,2-діоксаборонового кільця до центральної частини довгої  $\pi$ -електронної системи збільшує молекулярну жорсткість і суттєво покращує флуоресцентні характеристики барвників. У цьому розділі ми досліджували спектральну відповідь серії діоксаборонових барвників на присутність нуклеїнових кислот та кількох сироваткових альбумінів: людського, бичачого, кінського та курячих яєць. На додаток до трьох дифлуородіоксаборонових аддуктів мероціанів: **V33**, **V36**, **M25** та трьох аддуктів поліметинкетоенолів: **A74**, **M22**, **M232** для порівняння були включені два споріднені мероціани без аддуктів –  $\beta$ -дикетон **H28** та **In4tb** на основі тіобарбітурової кислоти (рис. 3.7).

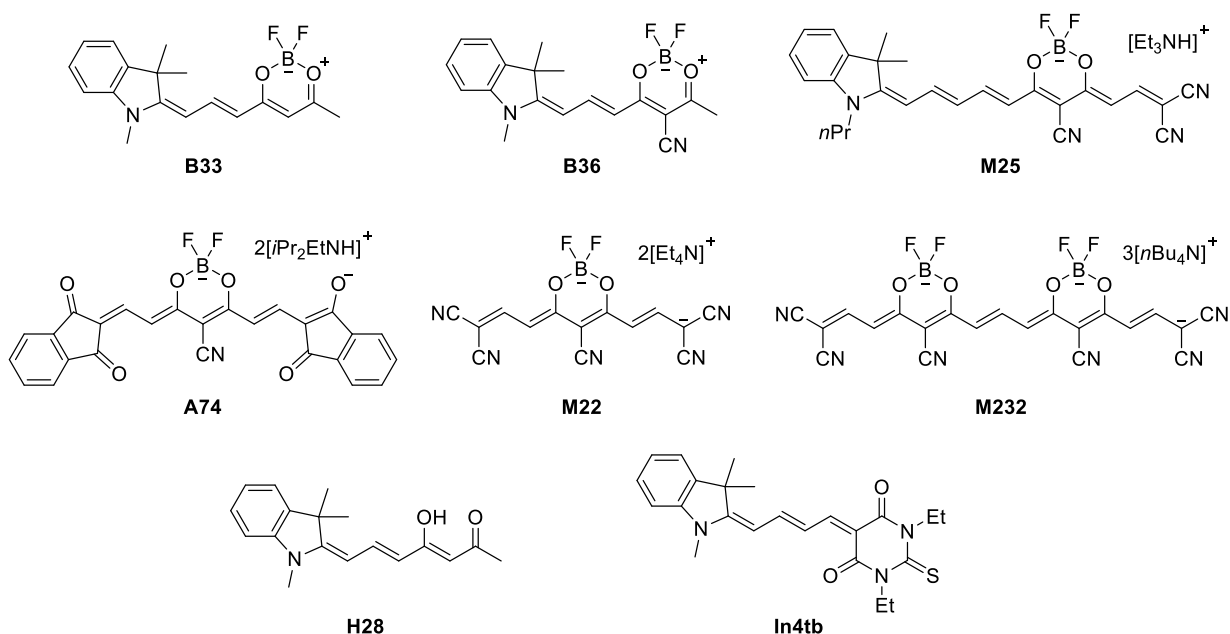


Рис. 3.7. Структура досліджених барвників.

**3.2.1. Спектральні властивості вільних барвників.** Характеристики спектрів поглинання та флуоресценції досліджених барвників в органічних розчинниках (ДМСО, метанол) і у водному середовищі (Тріс-НСІ буфер, рН 8,0) наведені в таблиці 3.3. Значні структурні відмінності між дослідженими сполуками, зокрема різна довжина поліметинового ланцюга, природа електродонорних та електроакцепторних фрагментів, а також наявність бета-дикарбонільних груп у вільному стані чи в аддуктах з трифторидом бору, зумовлюють широкий спектральний діапазон їх електронних переходів, тож максимуми поглинання цих барвників у метанолі охоплюють інтервал від 456 до 676 нм. При концентрації 5 мкМ оптична густина розчинів залишається відносно високою та змінюється в межах від 0,34 до 1,75, що свідчить про добру розчинність та ефективне світлопоглинання у видимій області спектра.

Таблиця 3.3

Спектральні характеристики монометинових ціанінових барвників у  
ДМСО та буфері

	Метанол				ДМСО				0,05М Тріс-НСІ буфер (рН 8.0)			
	$\lambda_{abs}$ , нм	D	$\lambda_{flu}$ , нм	$I_0$ , в.о.	$\lambda_{abs}$ , нм	D	$\lambda_{flu}$ , нм	$I_0$ , в.о.	$\lambda_{abs}$ , нм	D	$\lambda_{flu}$ , нм	$I_0$ , в.о.
<b>B36</b>	530	0.56	552	45	514 540	0.39 0.44	561 597	56 38	502 530	0.32 0.28	—	9*
<b>B33</b>	515	0.95	550	209	529	0.76	560	497	530	0.67	557	36
<b>M25</b>	612 660	0.35 0.38	717	1272	631 689	0.31 0.46	734	4090	629 699	0.21 0.23	739	135
<b>M22</b>	530	0.97	551	12680	541	1.16	558	14140	536	0.94	561	4818
<b>A74</b>	606	1.66	633	196	627	1.7	648	10090	568 611	0.9 0.54	644	14
<b>M232</b>	676	1.75	709	6000	692	1.75	718	9590	694	1.01	728	718
<b>H28</b>	456	0.34	535	535	461	0.33	531	481	452	0.31	504 541	38 37
<b>In4tb</b>	586	1.08	610	1727	594	1.11	618	4090	541 575	0.27 0.26	603	100

$\lambda_{abs}$ , довжина хвилі максимуму поглинання (нм); D, оптична густина;  $\lambda_{flu}$ , довжина хвилі максимуму флуоресценції (нм);  $I_0$ , інтенсивність флуоресценції барвника на максимумі (в.о.); \* – інтенсивність шуму, де неможливо було записати спектри випромінювання

У ДМСО загальна форма смуг поглинання більшості барвників практично не змінюється порівняно з метанолом, однак спостерігається систематичне зміщення максимумів у червону область спектра, яке для окремих сполук сягає 29 нм. Такий батохромний зсув є характерним проявом сольватохромного ефекту і узгоджується з літературними даними для діоксаборонових барвників [100]. Його можна пояснити як більшою сольватаційною здатністю протонного метанолу щодо молекул, що містять карбонільні групи, особливо негативно заряджених, так і значно вищим показником заломлення ДМСО, який впливає навіть на барвники з відносно слабо вираженими сольватохромними властивостями. Примітно, що деякі барвники, зокрема **B36** у ДМСО та **M25** в

обох органічних розчинниках, демонструють наявність двох чітко розділених максимумів поглинання, що може свідчити про співіснування кількох електронних або конформаційних станів молекули у розчині.

Максимуми флуоресценції барвників у метанолі спостерігаються в діапазоні від 535 до 717 нм, при цьому величини зсуву Стокса змінюються від 21 до 79 нм. Такі значення свідчать про різний ступінь структурної релаксації збудженого стану для різних класів барвників. У ДМСО максимуми випромінювання зміщуються в ще більш довгохвильову область і охоплюють інтервал від 531 до 734 нм, що корелює з батохромним зсувом смуг поглинання. Інтенсивність флуоресценції є особливо високою для діоксаборонових барвників **M25**, **M22** та **M232**, а також для мероціаніну **In4tb** в обох органічних розчинниках. Крім того, діаніонний індандіон-похідний **A74** демонструє інтенсивну флуоресценцію в ДМСО. Для цих барвників значення інтенсивності випромінювання досягають 1727-14140 відносних одиниць. Натомість інші досліджені сполуки характеризуються помірною інтенсивністю флуоресценції з інтенсивністю в межах 45-535 відносних одиниць. Висока власна флуоресценція діоксаборонових барвників добре узгоджується з раніше опублікованими даними [100-102] та пов'язана із збільшенням жорсткості їх хромофорної системи і обмеженням шляхів безвипромінювальної дезактивації збудженого стану внаслідок утворення стійкого циклічного аддукту з  $\text{BF}_3$ .

У водному середовищі спектральні властивості барвників зазнають істотних змін. Зокрема, спектри поглинання барвників **B36**, **A74** та **In4tb** у буфері (рис. 3.8, 3.9) суттєво відрізняються від відповідних спектрів у ДМСО та метанолі. У цих випадках з'являються та стають домінуючими короткохвильові максимуми, що вказує на утворення молекулярних агрегатів у водному середовищі. Для барвника **M25** смуга поглинання в буфері є помітно ширшою, ніж у ДМСО, та характеризується додатковим короткохвильовим плечем, що також може свідчити про часткову агрегацію або неоднорідність мікрооточення молекул. Водночас решта барвників загалом зберігає форму своїх спектрів

поглинання, хоча відбувається зміщення положення основних максимумів до 10 нм порівняно з ДМСО.

Максимуми флуоресценції для більшості барвників у буфері також зміщуються, зазвичай до 16 нм відносно їх положення в ДМСО, що відповідає випромінюванню індивідуального збудженого стану молекул. Винятком є барвник **V36**, інтенсивність флуоресценції якого виявилася занадто низькою для надійного визначення максимуму, а також **H28**, спектр якого демонструє два максимуми, з яких більш інтенсивний зміщений у короткохвильову область на 27 нм відносно спектра в ДМСО. Загалом у буфері спостерігається різке зниження інтенсивності флуоресценції для всіх досліджених барвників у 2,6-17 разів порівняно з метанольними розчинами. Таке гасіння флуоресценції, ймовірно, зумовлене гіршою водною сольватацією та, як наслідок – агрегаційними процесами, які сприяють локальному перепоглинанню і безвипромінювальній дезактивації збудженого стану.

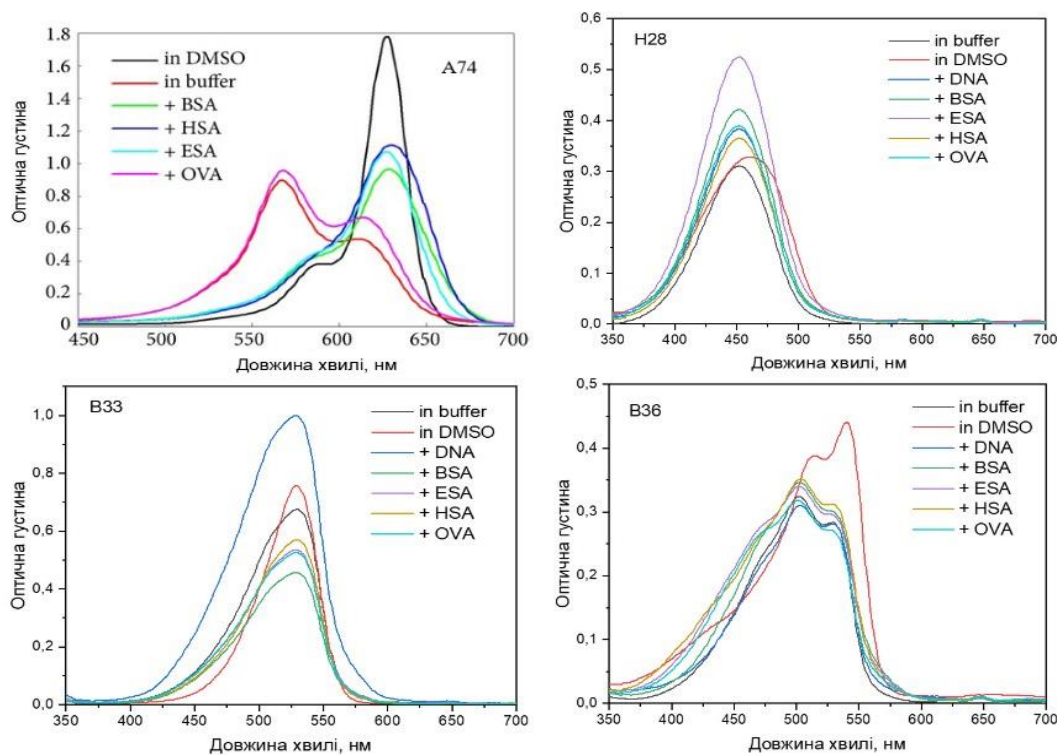


Рис. 3.8. Спектри поглинання барвників **A74**, **H28**, **B33**, **B36** у ДМСО, у буфері та у присутності ЛСА, БСА, КСА та овалбуміну

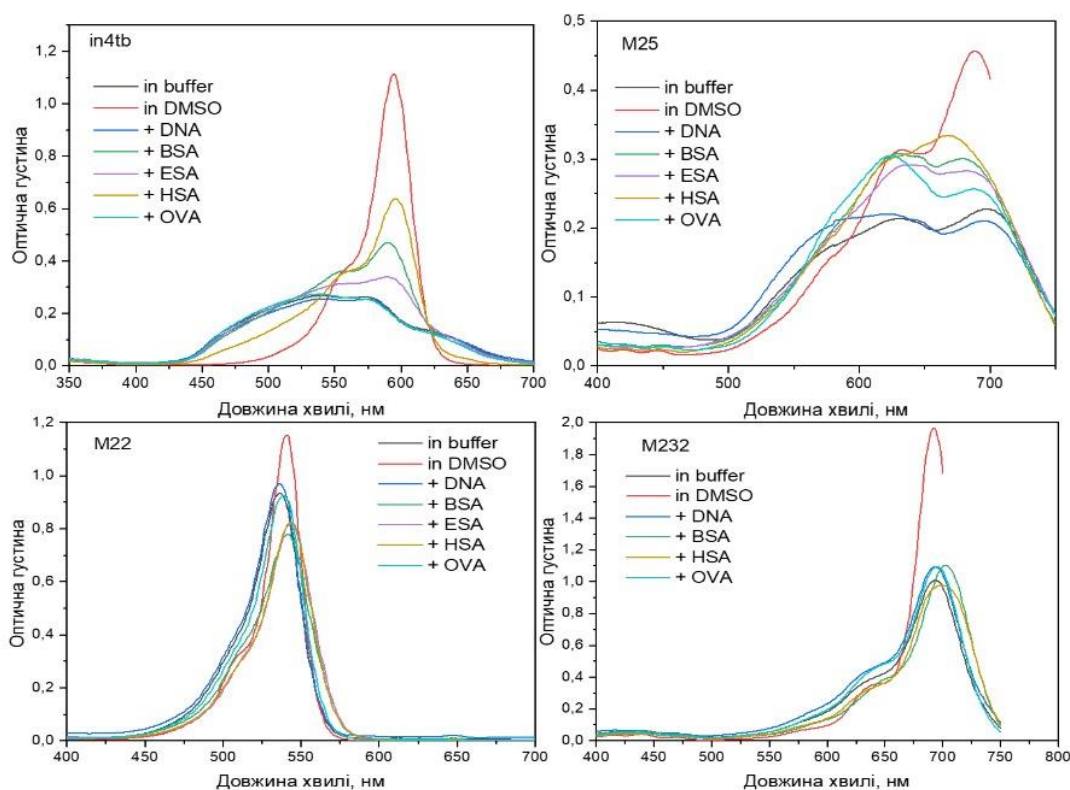


Рис. 3.9. Спектри поглинання барвників **in4tb**, **M25**, **M22**, **M232** у ДМСО, буфері (рН 8,0) та у присутності ЛСА, БСА, КСА та овальбуміну

### 3.2.2. Спектральні властивості барвників у присутності альбумінів.

Спектральні характеристики поглинання та флуоресценції досліджених барвників у присутності сироваткового альбуміну людини (ЛСА), бичачого сироваткового альбуміну (БСА) та кінського сироваткового альбуміну (КСА) наведено в таблиці 3.4. Додавання будь-якого з цих білків у більшості випадків не призводить до кардинальної перебудови спектрів поглинання, однак викликає характерні зміни, що свідчать про взаємодію барвників з білковою матрицею та зміну їх мікрооточення.

Таблиця 3.4

Спектральні характеристики монометинових ціанінових барвників у  
ДМСО та буфері

	ЛСА					БСА					КСА				
	$\lambda_{abs}$ , нм	D	$\lambda_{flu}$ , нм	$I_0$ , в.о.	$\Delta Q$	$\lambda_{abs}$ , нм	D	$\lambda_{flu}$ , нм	$I_0$ , в.о.	$\Delta Q$	$\lambda_{abs}$ , нм	D	$\lambda_{flu}$ , нм	$I_0$ , в.о.	$\Delta Q$
<b>V36</b>	503 529	0.35 0.31	555	173	<b>19</b>	503 529	0.34 0.3	556	124	<b>14</b>	501 529	0.34 0.29	556	99	<b>11</b>
<b>V33</b>	529	0.57	557	470	<b>13</b>	528	0.45	555	350	<b>9.7</b>	528	0.53	555	397	<b>11</b>
<b>M25</b>	669	0.33	744	910	<b>6.7</b>	630 680	0.31 0.3	740	660	<b>4.9</b>	639 685	0.29 0.28	746	691	<b>5.1</b>
<b>M22</b>	543	0.83	670	11409	<b>2.4</b>	542	0.78	568	7727	<b>1.6</b>	544	0.82	566	1031 8	<b>2.1</b>
<b>A74</b>	630	1.12	663	863	<b>62</b>	628	0.97	653	111	<b>7.9</b>	627	1.08	656	392	<b>28</b>
<b>M232</b>	699	0.98	740	3636	<b>5.1</b>	702	1.12	739	3227	<b>4.5</b>	701	1.1	736	4045	<b>5.6</b>
<b>H28</b>	453	0.36	540	155	<b>4.2</b>	452	0.42	538	148	<b>4</b>	451	0.52	537	188	<b>5.1</b>
<b>In4tb</b>	595	0.64	618	5636	<b>56</b>	590	0.47	613	4682	<b>47</b>	589	0.34	613	2454	<b>25</b>

$\lambda_{abs}$ , довжина хвилі поглинання максимуму (нм); D, оптична густина;  $\lambda_{flu}$ , довжина хвилі максимуму флуоресценції (нм);  $I_0$ , інтенсивність флуоресценції барвника на максимумі (в.о.);  $\Delta Q$ , приріст інтенсивності флуоресценції

Зокрема, форма спектрів поглинання барвників **V33**, **M22**, **M232** та **H28** (рис. 3.8, 3.9) у присутності альбумінів залишається практично незмінною порівняно зі спектрами в буферному розчині. Ці барвники перебувають у буфері переважно в індивідуальному стані, і зв'язування з білком не супроводжується суттєвою перебудовою їх електронної структури. Аналогічна ситуація спостерігається і для барвника **V36**, спектр поглинання якого в буфері визначається домінуванням короткохвильової смуги, пов'язаної з утворенням молекулярних агрегатів. У присутності альбумінів форма цієї смуги зберігається, а положення максимумів поглинання для зазначених барвників зміщується не більше ніж на 8 нм відносно їх положення у вільному стані в буфері, що свідчить про відсутність глибоких структурних змін хромофорної системи.

На відміну від цього, спектральна поведінка барвника **A74** у присутності сироваткових альбумінів суттєво відрізняється від його поведінки у водному середовищі. Спектр поглинання **A74** в комплексі з альбумінами наближається до спектра, зареєстрованого в ДМСО, де домінує мономерна форма барвника. При цьому короткохвильова смуга, характерна для агрегованого стану та домінуюча у буфері, повністю зникає (рис. 3.7). Така перебудова спектра однозначно вказує на дезагрегацію барвника внаслідок зв'язування з гідрофобними ділянками білка. Подібна тенденція спостерігається і для барвника **In4tb** (рис. 3.8), однак у цьому випадку смуга, що відповідає агрегованому стану, не зникає повністю, а лише суттєво зменшується за інтенсивністю. Це може свідчити про часткову дезагрегацію або про співіснування агрегованих та індивідуальних форм **In4tb** у комплексі з альбумінами. Примітно, що інтенсивність смуги поглинання **In4tb** змінюється відповідно до ряду ЛСА>БСА>КСА, що вказує на різну ефективність зв'язування або відмінності у силі взаємодії цього барвника з різними альбумінами.

Для барвника **M25** присутність сироваткових альбумінів також призводить до зміни форми спектра поглинання (рис. 3.8), що свідчить про вплив білкової матриці на агрегацію барвника. Однак лише у випадку ЛСА формується одна домінуюча смуга поглинання, що може відповідати переважно індивідуальному стану барвника. Натомість БСА та КСА зумовлюють лише частковий перерозподіл інтенсивності між смугами, що вказує на зменшення частки агрегатів, але не на повну дезагрегацію. Така поведінка може бути пов'язана з відмінностями у доступності та геометрії сайтів зв'язування в різних альбумінах.

Що стосується спектрів флуоресценції – то більшість досліджених барвників у присутності сироваткових альбумінів демонструє довгохвильовий зсув максимумів випромінювання до 19 нм. Цей ефект свідчить про

перенесення барвників у менш полярне мікрооточення білкових гідрофобних кишень. Винятками є барвник **V36**, для якого максимум флуоресценції не вдається визначити у буфері через надто низьку інтенсивність випромінювання, барвник **V33**, для якого зсув не перевищує 2 нм, а також **H28**, спектр флуоресценції якого в буфері містить два максимуми, що у присутності альбумінів зливаються в один пік. При цьому положення цього піка зміщується на 36 нм у червону область спектра відносно більш інтенсивного з двох максимумів у буферному розчині.

У всіх випадках присутність ЛСА, БСА або КСА призводить до зростання інтенсивності флуоресценції порівняно з відповідними значеннями для вільних барвників у буфері. Для барвників **M25**, **M22**, **M232** та **H28** це зростання є помірним і становить від 1,6 до 6,7 раза, практично незалежно від типу альбуміну. Барвники **V36** та **V33** демонструють більш виражене посилення флуоресценції – від 9,7 до 19 разів, що може бути пов'язано з сильнішою взаємодією і міцнішою фіксацією молекул цих барвників в альбумінових комплексах. Найбільш виражену реакцію демонструє мероціанін **In4tb**, інтенсивність флуоресценції якого зростає від 25 до 56 разів залежно від типу альбуміну. Особливу увагу привертає барвник **A74**, для якого спостерігається сильна залежність флуоресцентної відповіді від природи сироваткового альбуміну: інтенсивність випромінювання зростає у 62, 28 та 7,9 раза у присутності ЛСА, КСА та БСА відповідно. Така поведінка робить **A74** найбільш селективним барвником щодо ЛСА серед усіх досліджених сполук.

**3.2.3. Спектральні властивості барвників у присутності ДНК та овальбуміну.** Спектральні властивості досліджених барвників у присутності ДНК та овальбуміну суттєво відрізняються від їх поведінки в системах, що містять сироваткові альбуміни. Як видно з даних, наведених у таблиці 3.5, для

більшості барвників додавання ДНК або овальбуміну не призводить до помітних змін у положенні максимумів та формі смуг поглинання. Це свідчить про відсутність сильних специфічних взаємодій між хромофорами та цими біополімерами, а також про збереження агрегованого або мономерного стану барвників, характерного для буферного розчину.

Таблиця 3.5

Спектральні характеристики барвників у присутності ДНК та овальбуміну

	ДНК					Овальбумін				
	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	D	$\lambda_{\text{flu}}$ , нм	$I_0$ , в.о.	$\Delta Q$	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	D	$\lambda_{\text{flu}}$ , нм	$I_0$ , в.о.	$\Delta Q$
<b>B36</b>	503	0.31	520	29	<b>3.2</b>	501	0.31	554	27	<b>3</b>
	529	0.28				530	0.27			
<b>B33</b>	528	1	559	32	<b>0.89</b>	529	0.52	555	68	<b>1.9</b>
<b>M25</b>	622	0.22	741	179	<b>1.3</b>	623	0.3	719	134	<b>0.99</b>
	696	0.21				690	0.26			
<b>M22</b>	536	0.97	561	4863	<b>1.0</b>	539	0.93	562	5727	<b>1.2</b>
<b>A74</b>	568	0.72	645	17	<b>1.2</b>	568	0.96	646	137	<b>9.8</b>
	613	0.52				614	0.67			
<b>M232</b>	694	1.1	728	676	<b>0.94</b>	696	1.1	727	1636	<b>2.3</b>
<b>H28</b>	452	0.38	505	42	<b>1.1</b>	451	0.39	503	41	<b>1.1</b>
			541	41				540	42	
<b>In4tb</b>	541	0.25	603	106	<b>1.1</b>	539	0.27	609	191	<b>1.9</b>
	575	0.25								

$\lambda_{\text{abs}}$ , довжина хвилі поглинання максимуму (нм); D, оптична густина;  $\lambda_{\text{flu}}$ , довжина хвилі максимуму флуоресценції (нм);  $I_0$ , інтенсивність флуоресценції барвника на максимумі (в.о.);  $\Delta Q$ , приріст інтенсивності флуоресценції

Виняток становлять барвники **B36** та **M25**, для яких у присутності ДНК та овальбуміну спостерігається зростання інтенсивності короткохвильової смуги поглинання. Така зміна спектральної картини вказує на посилену агрегацію барвників у присутності цих біополімерів. Імовірно, макромолекулярна природа ДНК та овальбуміну сприяє локальному зростанню концентрації барвника або створює умови, що полегшують міжмолекулярні взаємодії між хромофорами, на відміну від ситуації у випадку зв'язування з сироватковими альбумінами.

Спектри флуоресценції більшості досліджених барвників після додавання ДНК або овальбуміну залишаються практично незмінними. Для цих сполук положення максимумів флуоресценції зміщується не більше ніж на 2 нм, що свідчить про відсутність суттєвих змін у полярності або жорсткості мікрооточення збудженого стану. Така поведінка контрастує з вираженими спектральними змінами, характерними для систем з альбумінами, і додатково підтверджує слабку взаємодію барвників з ДНК та овальбуміном.

Водночас для окремих барвників спостерігаються помітні відхилення від загальної тенденції. Зокрема, барвник **M25** у присутності овальбуміну демонструє батохромний зсув максимуму флуоресценції приблизно на 20 нм, тоді як для **In4tb** відповідний зсув становить близько 6 нм. Ці зміни можуть свідчити про часткову взаємодію зазначених барвників з гідрофобними або слабо полярними ділянками овальбуміну. Для барвника **B36** максимум флуоресценції не може бути визначений у буферному розчині через надто низьку інтенсивність випромінювання, однак максимумами, що спостерігаються у присутності ДНК та овальбуміну, відрізняються між собою на 34 нм, що вказує на різне мікрооточення барвника в цих системах.

Загалом, збільшення інтенсивності флуоресценції у присутності ДНК або овальбуміну для більшості барвників є незначним і не перевищує 3,2 раза. Це суттєво менше порівняно з посиленням флуоресценції, яке спостерігається у присутності сироваткових альбумінів. Винятком є барвник **A74**, який демонструє 9,8-кратне зростання інтенсивності флуоресценції при додаванні овальбуміну. Така поведінка може бути пов'язана зі зменшенням гасіння флуоресценції внаслідок витіснення молекул води з безпосереднього оточення барвника.

Слід також зазначити, що присутність ДНК призводить до певного зниження інтенсивності флуоресценції барвників **B33** та **M232**. Причини такої

поведінки наразі залишаються незрозумілими та можуть бути пов'язані як з особливостями електронної структури цих барвників, так і з неспецифічними взаємодіями з полінуклеотидним ланцюгом. З'ясування механізмів цього ефекту потребує подальших досліджень.

**3.2.4. Вплив довжини та будови поліметинового ланцюга на спектральні властивості барвників.** Аналіз даних, наведених у таблиці 3.3, демонструє чітку залежність спектральних характеристик досліджених барвників від довжини та будови поліметинового ланцюга, що з'єднує гетероциклічні фрагменти. Зокрема, найбільш показовим є порівняння барвників **V36** та **M25**, для яких спостерігається різниця положення максимумів поглинання майже на 100 нм. Такий значний батохромний зсув узгоджується з класичними уявленнями про ціанінові барвники, де збільшення довжини поліметинового ланцюга призводить до розширення ефективної  $\pi$ -системи та, відповідно, до зменшення енергетичного зазору між HOMO та LUMO.

Подібна тенденція простежується і для інших досліджених барвників цього ряду: зі збільшенням кількості спряжених подвійних зв'язків спостерігається систематичне зміщення смуг поглинання у довгохвильову область спектра. Водночас, варто зазначити, що величина спектрального зсуву не є строго лінійною функцією довжини поліметинового фрагмента, що свідчить про додатковий вплив природи гетероциклів, а також замісників, які можуть змінювати електронну густину вздовж поліметинового ланцюга та стабільність його планарної конформації.

Окрему увагу привертає поведінка барвника **M22**, який є єдиним представником дослідженої серії, що демонструє значну інтенсивність флуоресценції безпосередньо у водному буфері. Така особливість різко контрастує з поведінкою більшості інших поліметинових барвників, для яких у

водному середовищі спостерігається майже повне гасіння флуоресценції. Ймовірно, це пов'язано з найменшим розміром і мінімальним вмістом неполярних фрагментів в молекулі **M22**, що робить її найбільш розчинною і зменшує агрегацію навіть у полярному середовищі.

Порівняння **M22** зі структурно подібним **M232** з довшим поліметиновим ланцюгом, що є фактично спряженою димерною формою **M22** схожої полярності, є додатковим аргументом на користь важливості довжини поліметинового ланцюга барвника. Хоча **M232** також зберігає здатність до флуоресценції у буфері, її інтенсивність є нижчою порівняно з відповідним мономером. Це може бути зумовлено як частковим екситонним розщепленням енергетичних рівнів у димері внаслідок міжхромової взаємодії так і меншою розчинністю у воді з підсумковим збільшенням агрегації. Таким чином, димеризація у цьому випадку не призводить до посилення емісії, як можна було б очікувати від молекули з двома хромофорами замість одного, а навпаки, нівелює очікувані переваги.

Загалом, результати, отримані для барвників із різною довжиною поліметинового ланцюга, підтверджують ключову роль цього структурного елементу у формуванні спектральних властивостей. Довший поліметиновий фрагмент забезпечує батохромний зсув поглинання, тоді як поєднання оптимальної довжини ланцюга з обмеженою конформаційною рухливістю сприяє збереженню флуоресцентних властивостей у водному середовищі. Отже, варіація довжини та архітектури поліметинового ланцюга є ефективним інструментом тонкого налаштування спектральних характеристик поліметинових барвників, що має важливе значення для їх подальшого цілеспрямованого дизайну.

**3.2.5. Вплив полярності розчинника та асиметрії електронної густини молекули на спектральні властивості барвників.** Згідно з даними,

наведеними у таблиці 3.3, спектральні властивості досліджених барвників у ряді випадків суттєво залежать від природи розчинника, що вказує на важливу роль сольватаційних ефектів у формуванні їх оптичної відповіді. Для більшості досліджених сполук заміна метанолу на ДМСО не супроводжується істотними змінами інтенсивності флуоресценції, що є характерним для поліметинових барвників із відносно симетричним розподілом електронної густини, у яких збуджений стан не супроводжується значним внутрішньомолекулярним перерозподілом заряду.

Водночас, барвник **A74** демонструє принципово іншу поведінку, яка суттєво відрізняється від загальної тенденції. Зокрема, у метанолі **A74** практично не проявляє флуоресценції, тоді як у ДМСО спостерігається різке зростання інтенсивності емісії. Така чутливість до природи розчинника свідчить про наявність у молекулі **A74** асиметрії електронної густини, що зумовлює різну стабілізацію основного та збудженого станів у середовищах з різними сольватаційними властивостями.

У протонному розчиннику, такому як метанол, можливі специфічні взаємодії між молекулами розчинника та функціональними групами барвника, зокрема утворення водневих зв'язків. Такі взаємодії можуть сприяти стабілізації основного стану або підвищенню ефективності безвипромінювальних каналів релаксації збудженого стану, що, у свою чергу, призводить до значного гасіння флуоресценції. Натомість у апротонному, але високополярному ДМСО подібні канали гасіння є менш імовірними, що сприяє подовженню тривалості життя збудженого стану та збільшенню ймовірності випромінювальної релаксації.

Слід зазначити, що подібна залежність спектральних характеристик від природи розчинника не є типовою для симетричних ціанінових барвників, для яких сольватохромні ефекти зазвичай проявляються у вигляді незначних спектральних зсувів без суттєвої зміни інтенсивності флуоресценції. Таким

чином, поведінка барвника **A74** підкреслює важливість асиметрії електронної густини молекули, яка робить її спектральні властивості особливо чутливими до локального мікрооточення.

Отже, отримані результати демонструють, що навіть за однакової довжини поліметинового ланцюга, особливості розподілу електронної густини та здатність молекули до специфічної сольватації можуть відігравати вирішальну роль у формуванні спектральних властивостей барвників. Це відкриває можливість цілеспрямованого регулювання їх чутливості до середовища шляхом модифікації структури.

### 3.2.6. Вплив структури барвників на їх взаємодію з альбумінами.

Аналіз результатів, наведених у таблиці 3.4, свідчить про те, що взаємодія досліджених барвників з альбумінами суттєво залежить від особливостей їх молекулярної будови і не обмежується лише належністю до певного класу хімічних сполук. Для більшості досліджених барвників значення приросту флуоресценції у присутності сироваткових альбумінів людини, бика та коня є близькими між собою, що узгоджується з високим ступенем структурної подібності цих білків. Водночас, для окремих барвників спостерігаються суттєві відмінності у спектральній відповіді залежно від природи альбуміну, що вказує на більш специфічний характер їх взаємодії з білком.

Найбільш виражену та селективну взаємодію з альбумінами демонструють барвники **A74** та **In4tb**. Попри значні відмінності у хімічній природі та будові хромофорних систем, обидві сполуки характеризуються наявністю розширеної спряженої системи, відносно жорсткої молекулярної архітектури та достатньої гідрофобної поверхні. Сукупність цих структурних факторів створює сприятливі умови для включення молекул барвників у гідрофобні зв'язувальні

кишені альбумінів, де відбувається їх стабілізація у менш рухомому мікрооточенні.

Водночас, саме для **A74** та **In4tb** спостерігаються найбільші відмінності у величинах приросту флуоресценції при переході від одного альбуміну до іншого у ряду ЛСА–БСА–КСА. Така поведінка може бути зумовлена локальними відмінностями у будові зв'язувальних ділянок цих білків, зокрема варіаціями амінокислотного складу та геометрії гідрофобних кишень, які, попри загальну структурну подібність альбумінів, можуть по-різному стабілізувати молекули барвників з чутливою до мікрооточення структурою.

Для решти досліджених барвників взаємодія з альбумінами є менш вираженою та характеризується близькими значеннями флуоресцентної відповіді для ЛСА, БСА та КСА. Це може бути пов'язано з більшою конформаційною гнучкістю поліметинового ланцюга, схильністю до агрегації у водному середовищі або ж недостатньою площею гідрофобних фрагментів, необхідних для ефективного включення у білкові зв'язувальні сайти. У таких випадках зв'язування барвників з альбумінами, ймовірно, має неспецифічний характер і визначається загальними властивостями білкової матриці, а не тонкими структурними відмінностями між окремими альбумінами.

Таким чином, результати дослідження демонструють, що характер взаємодії барвників з альбумінами визначається поєднанням структурних параметрів молекул, серед яких ключову роль відіграють жорсткість хромофорної системи, ступінь конформаційної рухливості, наявність гідрофобних фрагментів та схильність до агрегації. При цьому для більшості барвників загальна подібність структури альбумінів зумовлює схожу спектральну відповідь, тоді як для окремих сполук із більш чутливою до мікрооточення структурою спостерігається селективність, пов'язана з локальними відмінностями у будові білків.

**3.2.7. Висновки до підрозділу 3.2.** На основі отриманих спектрально-люмінесцентних характеристик досліджених барвників у присутності трьох сироваткових альбумінів, ДНК та овальбуміну, можна зробити кілька узагальнених висновків. По-перше, всі барвники демонструють значно сильнішу флуоресцентну реакцію на сироваткові альбуміни, ніж на ДНК або овальбумін. Цей ефект не може бути безпосередньо пов'язаний з електростатичними взаємодіями, оскільки досліджувані хромофори включають як нейтральні (**B36**, **B33**, **H28** та **In4tb**), так і аніонні (**M25**, **M22**, **A74** та **M232**) сполуки, тоді як усі використані біополімери за рН 8,0 несуть негативний заряд. Таким чином, найбільш правдоподібним поясненням спостережуваної поведінки є специфічна біологічна функція сироваткових альбумінів як транспортних білків, що забезпечують ефективне зв'язування та стабілізацію малих гідрофобних молекул.

Результати свідчать про те, що характер флуоресцентної відповіді барвників у присутності альбумінів значною мірою визначається їх структурними особливостями. Зокрема, довжина поліметинового ланцюга, ступінь конформаційної жорсткості молекули, а також схильність до агрегації у водному середовищі відіграють ключову роль у формуванні спектральних властивостей. Барвники з довгими та більш спряженими поліметиновими системами демонструють батохромні зсуви максимумів поглинання, однак надмірна гнучкість або димеризація можуть зменшувати ефективність їх взаємодії з білковою матрицею.

Порівняння трьох структурно подібних барвників **B36**, **B33** та **H28** дозволяє зробити додаткові висновки щодо ролі окремих структурних елементів у формуванні їх спектрально-люмінесцентних властивостей. Зокрема, наявність дифлуорооксаборонового містка у барвниках **B36** та **B33** зумовлює червоний зсув максимумів поглинання та флуоресценції порівняно з барвником **H28**. Водночас, присутність ціаногрупи у структурі **B36** призводить до зниження

інтенсивності флуоресценції як в органічних розчинниках, так і в буфері Тріс-НСІ порівняно з **B33** та **H28**. Крім того, барвник **B33** і подібний за структурою **B36**, що містять діоксабороновий фрагмент, демонструють більш виражену флуоресцентну реакцію на сироваткові альбуміни, за структурний аналог без діоксаборонового містка – барвник **H28**. У цьому контексті слід також відзначити барвник **In4tb**, синтезований на основі тіобарбітурової кислоти, який характеризується значно вищою інтенсивністю флуоресценції та сильнішою реакцією на сироваткові альбуміни. Водночас, таке порівняння слід розглядати з певною обережністю, оскільки **In4tb** містить довший поліметиновий ланцюг з більшою кількістю метинових ланок, що саме по собі істотно впливає на його спектральні характеристики.

Барвники **M25**, **M22** та **M232**, які містять малонітрильні фрагменти як електроноакцепторні групи, демонструють відносно слабкі зміни флуоресценції у присутності сироваткових альбумінів. Це може бути пов'язано з їх більшою конформаційною гнучкістю та менш сприятливими структурними передумовами для стабільного включення у гідрофобні зв'язувальні ділянки білка. На цьому тлі барвник **A74** демонструє принципово іншу поведінку, що узгоджується з літературними даними, згідно з якими флуоресценція **A74** та інших поліметинів на основі індандіону суттєво знижується у протонних розчинниках [102]. Отже, посилення флуоресценції **A74** у присутності сироваткових альбумінів, імовірно, пов'язане з витісненням молекул води із сольватної оболонки барвника та його стабілізацією у менш полярному білковому мікрооточенні.

Особливої уваги заслуговує диференціальна чутливість **A74** до різних сироваткових альбумінів. Інтенсивність його флуоресценції зростає у 62, 28 та 7,9 рази у присутності ЛСА, КСА та БСА відповідно. Зважаючи на загальну подібність глобулярної структури цих білків, такий результат свідчить про чутливість **A74** до тонких локальних відмінностей у будові зв'язувальних

ділянок альбумінів. Водночас, **A74** демонструє 9,8-кратне зростання інтенсивності флуоресценції у присутності овальбуміну, що вказує на можливість його неспецифічної взаємодії з іншими білками. Таким чином, при використанні **A74** як флуоресцентного зонда для вивчення конформаційних переходів у сироваткових альбумінах необхідно забезпечувати відсутність інших білкових компонентів. З іншого боку, потенціал застосування цього барвника для виявлення сироваткового альбуміну в присутності сторонніх білків потребує окремого детального дослідження.

Загалом встановлено, що діоксаборонові мероціаніни **B36** та **B33** збільшують інтенсивність флуоресценції приблизно у 10 разів у присутності сироваткових альбумінів. Водночас, діаніонний діоксаборон **A74** на основі індандіону та мероціанін **In4tb** на основі тіобарбітурової кислоти демонструють найбільш перспективні характеристики як флуоресцентні зонди для виявлення сироваткового альбуміну людини, забезпечуючи 62- та 56-кратне зростання інтенсивності флуоресценції відповідно. Крім того, висока селективність **A74** до ЛСА порівняно з іншими сироватковими альбумінами свідчить про його чутливість до незначних конформаційних відмінностей у глобулярній структурі білка, що робить цей барвник особливо цікавим об'єктом для подальших фундаментальних та прикладних досліджень.

За результатами досліджень опубліковані наступні наукові праці:

1) Kazakov-Kravchenko O. S., Losytskyy M., Polishchuk V. M., Kulinich A. V., Shandura M.P., Yarmoluk S. "Spectral-fluorescent response of dioxaborine dyes with varying chromophore charge in the presence of serum albumins" *Biopolymers and Cell*, 2025; 41(3); 230; <https://doi.org/10.7124/bc.000B1A>

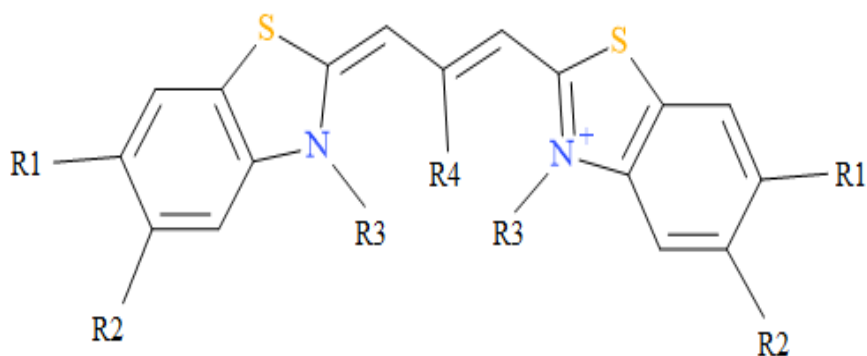
2) Kazakov-Kravchenko O. S., Yarmoluk S. M. Fluorescent properties of 1,3,2-dioxaborine polymethine dyes upon interaction with albumins. *Book of Abstracts of the VIII International (XVIII Ukrainian) Scientific Conference for*

Students and Young Scientists “Current Chemical Problems”, March 25–27, 2025, Vinnytsia, Ukraine, P. 30.

### **3.3. Дослідження флуоресцентних властивостей симетричних триметинціанінових барвників з нуклеїновими кислотами та альбумінами**

Одним з підходів до створення флуоресцентних зондів є структурна модифікація флуорофорів, які вже проявляють сприятливі спектральні властивості та здатність до взаємодії з біомолекулами. Введення різних замісників у молекулу барвника дозволяє змінювати його спектральні характеристики, спорідненість до біологічних мішеней та селективність взаємодії. Відомо, що спектральні властивості та чутливість таких барвників значною мірою визначаються структурою триметинового ланцюга та природою замісників у гетероциклічних фрагментах молекули. Зокрема, модифікації в  $\beta$ -положенні триметинового ланцюга можуть суттєво впливати на квантовий вихід флуоресценції та характер взаємодії барвників з нуклеїновими кислотами.

У цьому розділі досліджено серію барвників, які містять O-метильні або гідроксильні групи у 5,5'- або 6,6'-положеннях бензотіазольних кілець, N-алкільні замісники різної довжини та замісники в  $\beta$ -положенні триметинового ланцюга (рис. 3.10). Для цих сполук вивчено спектрально-люмінесцентні властивості у присутності нуклеїнових кислот, а також сироваткових альбумінів людини, бичачого та конячого.



7515 R1=H R2=OH R3=CH<sub>3</sub> R4=CH<sub>3</sub>

7520 R1=OH R2=H R3=CH<sub>3</sub> R4=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

7514 R1=H R2=OCH<sub>3</sub> R3=CH<sub>3</sub> R4=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

7545 R1=OCH<sub>3</sub> R2=H R3=CH<sub>3</sub> R4=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

7724 R1=H R2=OCH<sub>3</sub> R3=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> R4=H

7513 R1=H R2=OCH<sub>3</sub> R3=CH<sub>3</sub> R4=H

7544 R1=OCH<sub>3</sub> R2=H R3=CH<sub>3</sub> R4=H

7642 R1=H R2=OCH<sub>3</sub> R3=C<sub>5</sub>H<sub>11</sub> R4=CH<sub>3</sub>

7647 R1=H R2=OH R3=C<sub>5</sub>H<sub>11</sub> R4=CH<sub>3</sub>

7748 R1=H R2=OH R3=C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> R4=CH<sub>3</sub>

Рис. 3.10. Структура триметинціанінових барвників

### 3.3.1. Спектрально-люмінесцентні властивості вільних барвників.

Спектральні параметри поглинання та флуоресценції досліджених барвників у диметилсульфоксиді (ДМСО) та в 50 мМ буфері Тріс-НСІ (рН 8,0) наведені в таблиці 3.6. Репрезентативні спектри поглинання представлені на рисунках 3.11, 3.12, 3.13.

У розчині ДМСО спектри поглинання всіх досліджених барвників характеризуються наявністю одного інтенсивного довгохвильового максимуму в діапазоні 562-583 нм. Форма спектральних смуг є типовою для індивідуального стану ціанінових барвників в істинному розчині і відповідає  $\pi-\pi^*$  електронному переходу в поліметиновому хромофорі [97]. Відсутність додаткових короткохвильових компонентів у спектрах поглинання свідчить про те, що в органічному середовищі молекули барвників перебувають в розчині без суттєвої агрегації.

Таблиця 3.6

Спектральні характеристики триметинціанінових барвників у ДМСО та водному буфері

	ДМСО				0,05М Тріс-НСІ буфер (рН 8.0)			
	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	$D$	$\lambda_{\text{flu}}$ , нм	$I$ , в.о.	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	$D$	$\lambda_{\text{flu}}$ , нм	$I$ , в.о.
<b>7513</b>	580	0.565	605	1363	466	0.330	587	104
<b>7514</b>	564	0.455	596	308	488	0.251	582	19
<b>7515</b>	562	0.568	597	172	511	0.210	581	7
<b>7520</b>	568	0.525	600	244	490	0.200	584	6
<b>7544</b>	577	0.764	601	1227	471 573	0.520 0.380	581	54
<b>7545</b>	566	0.439	596	270	489 553	0.230 0.110	578	21
<b>7724</b>	583	0.422	606	1500	523 569	0.227 0.160	588	342
<b>7642</b>	566	0.647	601	289	513	0.380	588	25
<b>7647</b>	569	0.555	600	187	553	0.254	–	4*
<b>7748</b>	568	0.475	603	183	524 556	0.217 0.211	586	9

$\lambda_{\text{abs}}$ , довжина хвилі максимуму поглинання (нм);  $D$ , оптична густина;  $\lambda_{\text{flu}}$ , довжина хвилі максимуму флуоресценції (нм);  $I_0$ , інтенсивність флуоресценції барвника на максимумі (в.о.); \* – інтенсивність шуму, де неможливо було записати спектри випромінювання

Спектри флуоресценції барвників у ДМСО характеризуються максимумами випромінювання в діапазоні 596-606 нм. Форма цих спектрів є близькою до дзеркального відображення відповідних спектрів поглинання, що є характерною ознакою флуоресценції індивідуальних молекул симетричних ціанінових барвників (рис. Б.1, рис. Б.2, рис. Б.3, рис. Б.4), Інтенсивність флуоресценції в ДМСО варіює в широких межах від 172 до 1500 відносних одиниць (в.о.), що свідчить про помірну або високу ефективність

випромінювання для більшості досліджених сполук у органічному середовищі середньої полярності з відносно низькою в'язкістю.

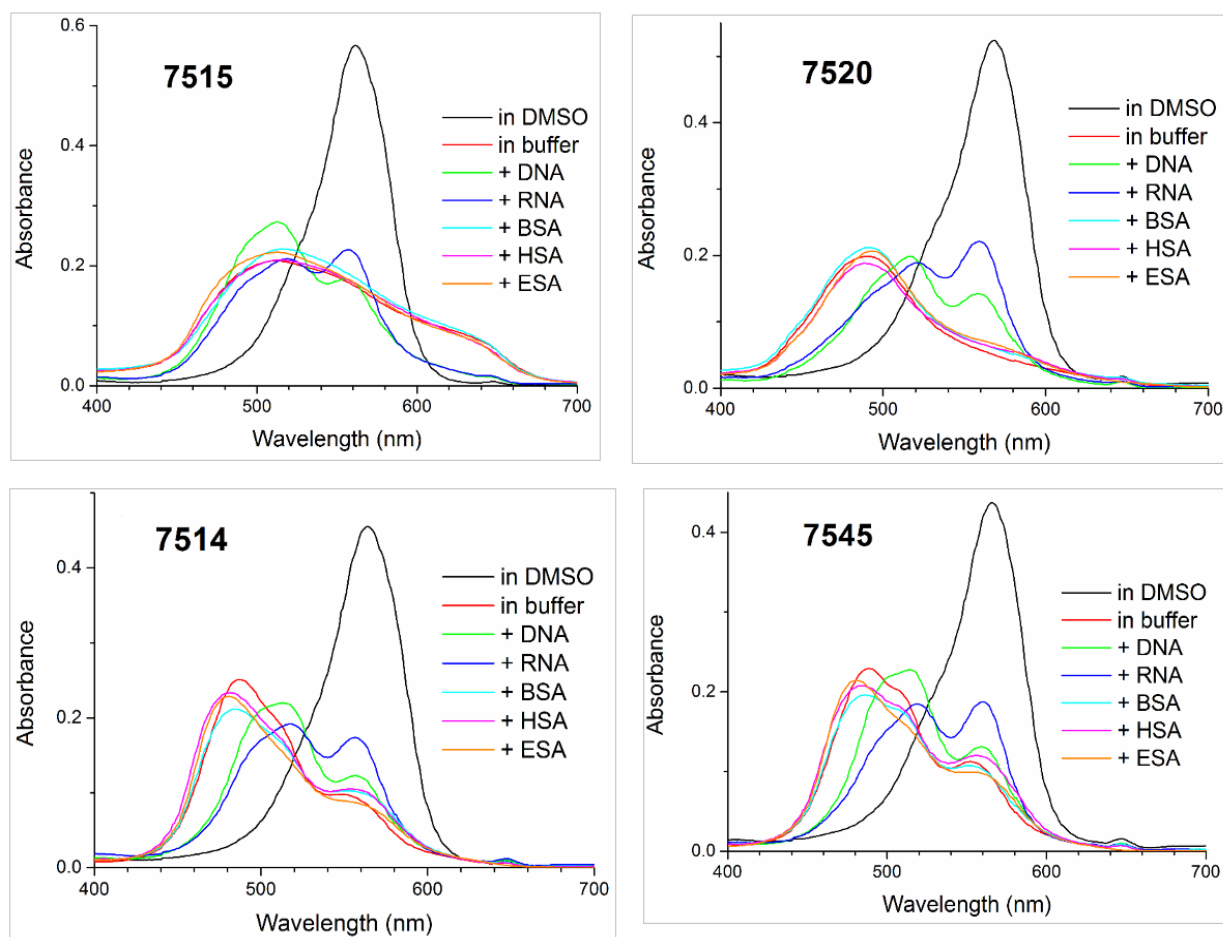


Рис. 3.11. Спектри поглинання барвників **7515**, **7520**, **7514** та **7545** у ДМСО, у буфері та у присутності ДНК, РНК, ЛСА, БСА та КСА

Значні зміни спектральних характеристик спостерігаються при переході до водного середовища. У 50 мМ буфері Тріс-НСІ (рН 8,0) спектри поглинання барвників зазнають істотних змін. Найбільш помітною особливістю є зміщення найбільш інтенсивного максимуму поглинання у короткохвильову область на 16-114 нм порівняно з відповідними значеннями у ДМСО. Окрім основної смуги, у спектрах поглинання з'являються додаткові спектральні компоненти,

які можуть проявлятися як окремі смуги або як менш виражені плечі на короткохвильовому боці спектра.

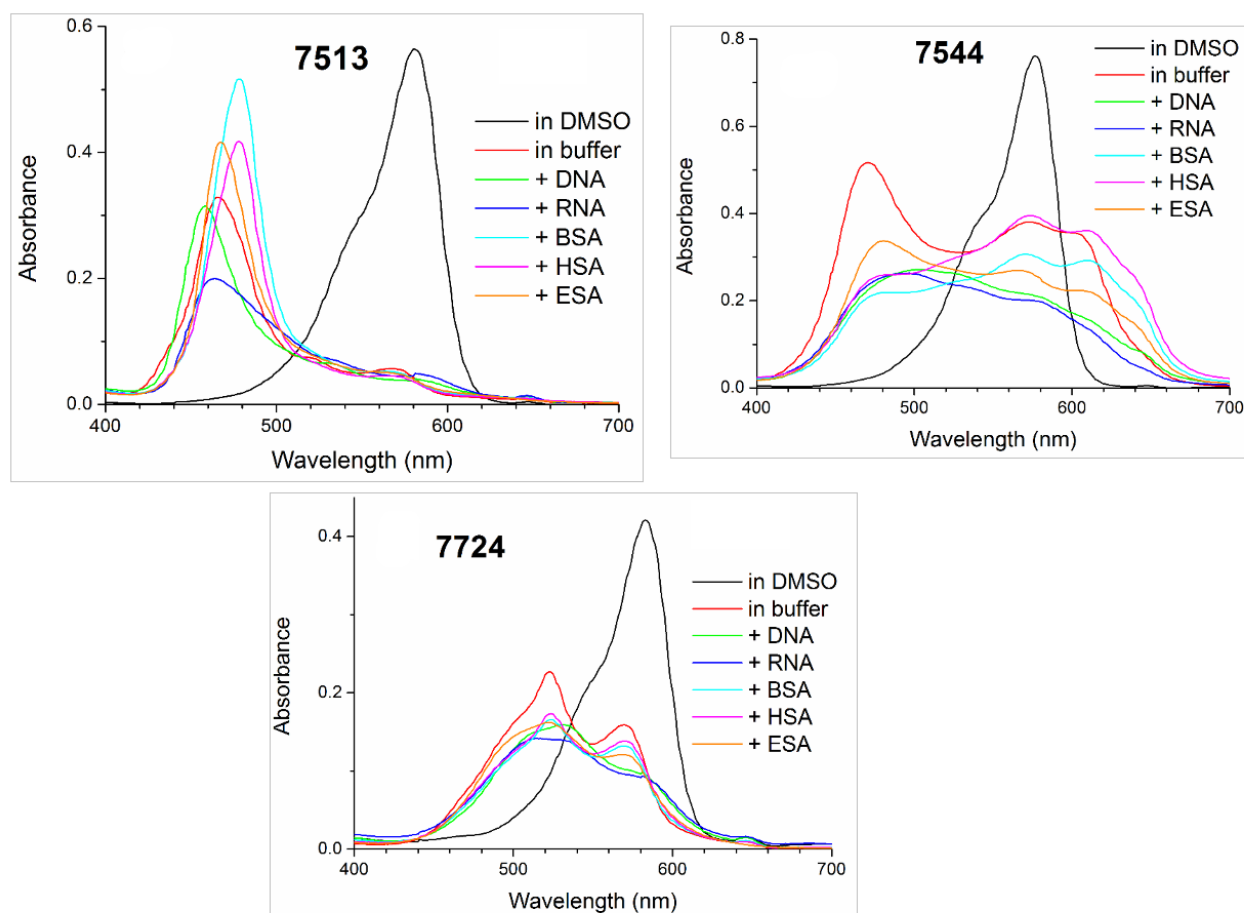


Рис. 3.12. Спектри поглинання барвників **7513**, **7544** та **7724** у ДМСО, у буфері та у присутності ДНК, РНК, ЛСА, БСА та КСА

Подібна спектральна поведінка характерна для процесів самоасоціації ціанінових барвників у водному середовищі та може свідчити про утворення молекулярних агрегатів. Для триметинових ціанінових барвників у водних розчинах подібні зміни спектрів поглинання зазвичай пов'язують з формуванням H-агрегатів, які характеризуються гіпсхромним зміщенням максимуму поглинання [97, 103]. Водночас не можна виключати можливість утворення різних конформаційних ізомерів молекул барвника, що виникають внаслідок обертання навколо метинового зв'язку поліметинового ланцюга [104].

Такі ізомеризаційні процеси також можуть впливати на форму та положення спектральних смуг.

Спектри флуоресценції барвників у буферному середовищі загалом зберігають форму, подібну до спектрів, зареєстрованих у ДМСО, та характеризуються одним максимумом випромінювання в діапазоні 578-588 нм (рис. Б.1, рис. Б.2, рис. Б.3, рис. Б.4). Водночас положення максимумів флуоресценції зміщене у короткохвильову область на 13-20 нм відносно відповідних значень у ДМСО. Винятком є барвник **7647**, для якого інтенсивність флуоресценції в буферному середовищі була занадто низькою для надійного визначення положення максимуму випромінювання.

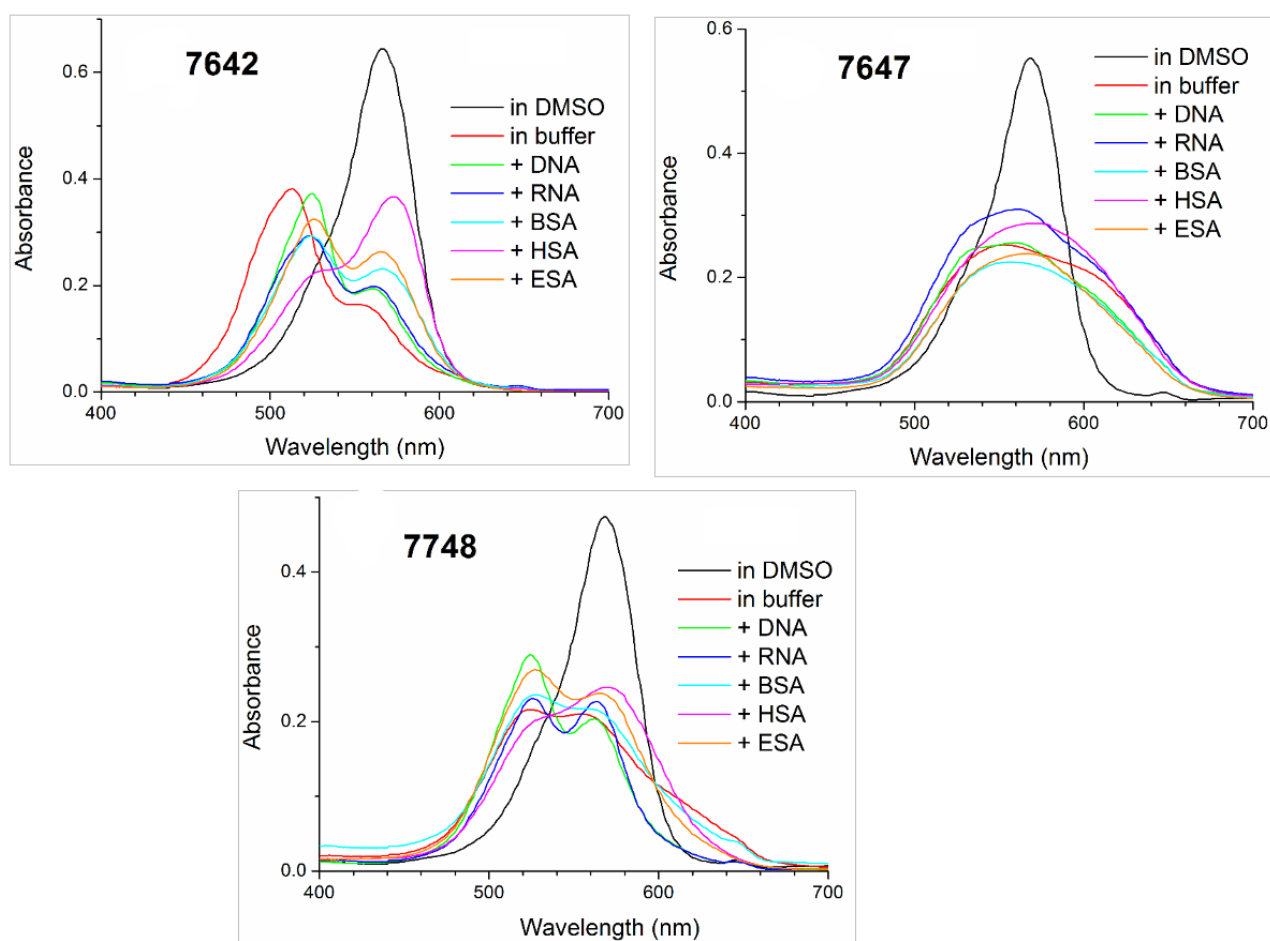


Рис. 3.13. Спектри поглинання барвників **7642**, **7647** та **7748** у ДМСО, у буфері та у присутності ДНК, РНК, ЛСА, БСА та КСА

Порівняно з органічним розчинником, інтенсивність флуоресценції барвників у буфері суттєво зменшується у 4-47 разів. У результаті значення інтенсивності випромінювання в буферному середовищі знаходяться у діапазоні від 4 до 342 відносних одиниць. Таке значне зниження флуоресценції може бути зумовлене кількома факторами, зокрема агрегацією барвників у водному середовищі, підвищеною ефективністю безвипромінювальних процесів релаксації, а також можливими взаємодіями з молекулами води, які можуть сприяти гасінню флуоресценції.

Загалом отримані спектральні дані свідчать про те, що у буферному середовищі значна частина молекул барвника перебуває в агрегованому стані. Проте спостережуване флуоресцентне випромінювання, ймовірно, походить переважно від мономерної фракції барвників, оскільки агреговані форми ціанінових барвників зазвичай характеризуються значно нижчим квантовим виходом флуоресценції.

**3.3.2. Спектрально-люмінесцентні властивості барвників у присутності нуклеїнових кислот.** Параметри спектрів поглинання та флуоресценції досліджених барвників у 50 мМ буфері Тріс-НСІ (рН 8,0) у присутності ДНК та РНК наведені в таблиці 3.7. Додавання нуклеїнових кислот призводить до складних змін спектрів поглинання барвників, характер і ступінь яких залежать від структури конкретного барвника (рис. 3.11, 3.12, 3.13). Загалом ці зміни можуть бути пов'язані з поєднанням кількох процесів, зокрема частковим руйнуванням агрегатів барвників, які утворюються у водному буферному середовищі, а також із безпосередньою взаємодією молекул барвників з нуклеїновими кислотами. При цьому зв'язування може відбуватися як за участю індивідуальних молекул барвника, так з утворенням агрегованих комплексів різної геометрії та ступеня агрегації на матрицях ДНК або РНК.

Таблиця 3.7

## Спектральні характеристики барвників у присутності ДНК та РНК

	+ ДНК					+ РНК				
	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	$D$	$\lambda_{\text{flu}}$ , нм	$I$ , в.о.	$\Delta Q$	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	$D$	$\lambda_{\text{flu}}$ , нм	$I$ , в.о.	$\Delta Q$
<b>7513</b>	458	0.315	602	348	<b>3.3</b>	464	0.200	604	580	<b>5.6</b>
<b>7514</b>	513 557	0.220 0.124	587	361	<b>19</b>	517 557	0.192 0.175	587	969	<b>51</b>
<b>7515</b>	513 556	0.274 0.179	585	683	<b>98</b>	519 557	0.212 0.227	584	1636	<b>223</b>
<b>7520</b>	516 559	0.199 0.143	585	562	<b>94</b>	521 559	0.190 0.222	584	1681	<b>280</b>
<b>7544</b>	503	0.272	595	408	<b>7.5</b>	495	0.264	597	675	<b>12.5</b>
<b>7545</b>	515 560	0.228 0.132	586	436	<b>21</b>	519 560	0.185 0.188	585	1500	<b>71</b>
<b>7724</b>	531	0.16	601	520	<b>1.5</b>	515	0.142	603	706	<b>2</b>
<b>7642</b>	524 561	0.374 0.196	591	409	<b>16.4</b>	524 562	0.294 0.199	588	673	<b>27</b>
<b>7647</b>	559	0.257	590	193	<b>48</b>	561	0.310	587	281	<b>70</b>
<b>7748</b>	525 563	0.290 0.204	590	464	<b>51.5</b>	526 563	0.231 0.228	587	1030	<b>114</b>

$\lambda_{\text{abs}}$ , довжина хвилі поглинання максимуму (нм);  $D$ , оптична густина;  $\lambda_{\text{flu}}$ , довжина хвилі максимуму флуоресценції (нм);  $I_0$ , інтенсивність флуоресценції барвника на максимумі (в.о.);  $\Delta Q$ , приріст інтенсивності флуоресценції

Однією з найбільш характерних спектральних ознак взаємодії барвників з нуклеїновими кислотами є збільшення внеску смуги поглинання, що відповідає індивідуальному стану барвника. Такий ефект особливо чітко проявляється для барвників **7515**, **7520** та **7748** у присутності як ДНК, так і РНК. При цьому у випадку РНК відповідне зростання інтенсивності поглинання індивідуального барвника є більш вираженим. Подібну поведінку також спостерігають для барвників **7514** та **7545** у присутності РНК. Збільшення внеску індивідуальної компоненти у спектрах поглинання може свідчити про часткову дезагрегацію

молекул барвника при взаємодії з нуклеїновими кислотами та утворення більш стабільних комплексів барвника з біополімером. Варто зазначити, що барвники **7515**, **7520** та **7748** мають спільну структурну особливість наявність гідроксильних замісників у бензотіазольних фрагментах, що, ймовірно, сприяє їх ефективнішій взаємодії з нуклеїновими кислотами.

Спектри флуоресценції барвників у присутності ДНК та РНК загалом відповідають випромінюванню неагрегованого барвника. У більшості випадків максимуми флуоресценції зміщуються у довгохвильову область на 1-17 нм порівняно з максимумами випромінювання вільних барвників у буферному середовищі. Для барвників **7520** та **7642** спектральний зсув практично відсутній, тоді як для барвника **7647** максимум випромінювання вільного барвника у буфері не вдалося визначити через надто низьку інтенсивність флуоресценції.

Додавання нуклеїнових кислот супроводжується суттєвим зростанням інтенсивності флуоресценції для всіх досліджених барвників. У всіх випадках посилення флуоресценції є більш вираженим у присутності РНК порівняно з ДНК. Найвищі значення інтенсивності флуоресценції та приросту інтенсивності ( $\Delta Q$ ) спостерігаються для барвників **7515** та **7520**. Ці барвники мають подібні структурні характеристики, зокрема наявність гідроксильних замісників у положеннях 6,6' та 5,5' відповідно, а також N-метильних груп на бензотіазольних кільцях. У присутності РНК інтенсивність флуоресценції цих барвників зростає у 223 та 280 разів відповідно, тоді як у присутності ДНК відповідні прирости становлять 98 та 94.

Барвники **7514**, **7545**, **7647** та **7748** демонструють дещо нижчі абсолютні значення інтенсивності флуоресценції та коефіцієнти посилення, однак також характеризуються вираженою реакцією на присутність нуклеїнових кислот. Для цих сполук збільшення інтенсивності флуоресценції становить 51-114 разів у

присутності РНК та 19-51,5 разів у присутності ДНК. Спільною особливістю структур цих барвників є відсутність однієї з двох структурних характеристик, притаманних найбільш чутливим барвникам **7515** та **7520**. Зокрема, у барвників **7514** та **7545** гідроксильні групи у положеннях 5,5' або 6,6' заміщені метоксильними замісниками, тоді як у барвників **7647** та **7748** на бензотіазольних кільцях присутні більш об'ємні N-алкільні замісники.

Барвник **7642**, який поєднує обидві зазначені структурні особливості – метоксильні замісники та довші N-пентильні алкільні групи, демонструє ще нижчу чутливість до нуклеїнових кислот. Для цієї сполуки приріст інтенсивності флуоресценції становить 27 разів у присутності РНК та 16 разів у присутності ДНК.

Найменшу чутливість до присутності нуклеїнових кислот проявляють барвники **7513**, **7544** та **7724**, для яких збільшення інтенсивності флуоресценції становить лише 2-12,5 разів у присутності РНК та 1,5-7,5 разів у присутності ДНК. Спільною структурною характеристикою цих барвників є відсутність замісника у  $\beta$ -положенні триметинового поліметинового ланцюга. Відомо, що така особливість будови часто пов'язана з підвищеною інтенсивністю флуоресценції вільних молекул барвника у водному середовищі. У результаті при взаємодії з нуклеїновими кислотами спостерігається менш виражений приріст інтенсивності флуоресценції.

Загалом отримані результати свідчать про те, що спектрально-люмінесцентна відповідь барвників на присутність нуклеїнових кислот значною мірою визначається їх структурними особливостями. Наявність гідроксильних замісників у бензотіазольних фрагментах, а також характер замісників у поліметиновому ланцюзі та на атомах азоту гетероциклів істотно впливають на ефективність взаємодії барвників з ДНК та РНК і, відповідно, на величину флуоресцентної відповіді.

**3.3.3. Спектрально-люмінесцентні властивості барвників у присутності сироваткових альбумінів.** Параметри спектрів поглинання та флуоресценції досліджених барвників у 50 мМ буфері Тріс-НСІ (рН 8,0) у присутності сироваткових альбумінів ЛСА, КСА та БСА наведені в таблиці 3.8.

Таблиця 3.8

Спектральні характеристики барвників у присутності ЛСА, КСА та БСА

	+ ЛСА					+ КСА					+ БСА				
	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	$D$	$\lambda_{\text{fl}}$ , нм	$I$ , в.о.	$\Delta Q$	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	$D$	$\lambda_{\text{fl}}$ , нм	$I$ , в.о.	$\Delta Q$	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	$D$	$\lambda_{\text{fl}}$ , нм	$I$ , в.о.	$\Delta Q$
<b>7513</b>	478	0.420	595	191	<b>1.83</b>	467	0.420	597	173	<b>1.66</b>	478	0.520	590	106	<b>1</b>
<b>7514</b>	481 557	0.230 0.105	596	466	<b>24.5</b>	481	0.230	593	178	<b>9.4</b>	485	0.210	594	117	<b>6.2</b>
<b>7515</b>	516	0.210	594	70	<b>10</b>	512	0.220	593	74	<b>10.6</b>	515	0.230	591	30	<b>4.3</b>
<b>7520</b>	490	0.190	595	186	<b>31</b>	494	0.206	596	125	<b>21</b>	491	0.210	596	44	<b>7.3</b>
<b>7544</b>	574 611	0.400 0.360	597	628	<b>11.6</b>	480 568	0.340 0.270	589	113	<b>2.1</b>	571 610	0.310 0.290	585	65	<b>1.2</b>
<b>7545</b>	484 557	0.210 0.120	592	548	<b>26.1</b>	481	0.220	592	362	<b>17.2</b>	486 553	0.196 0.108	592	177	<b>8.4</b>
<b>7724</b>	524 571	0.170 0.140	597	548	<b>1.6</b>	522 571	0.160 0.120	598	614	<b>1.8</b>	523 569	0.165 0.130	594	387	<b>1.13</b>
<b>7642</b>	573	0.370	599	1954	<b>78</b>	526 566	0.330 0.260	597	912	<b>36.5</b>	524 567	0.290 0.230	598	844	<b>34</b>
<b>7647</b>	570	0.288	600	158	<b>39.5</b>	566	0.240	599	251	<b>63</b>	558	0.225	597	176	<b>44</b>
<b>7748</b>	570	0.245	602	295	<b>33</b>	528 567	0.270 0.240	598	367	<b>41</b>	527	0.240	595	147	<b>16.3</b>

$\lambda_{\text{abs}}$ , довжина хвилі поглинання максимуму (нм);  $D$ , оптична густина;  $\lambda_{\text{flu}}$ , довжина хвилі максимуму флуоресценції (нм);  $I_0$ , інтенсивність флуоресценції барвника на максимумі (в.о.);  $\Delta Q$ , приріст інтенсивності флуоресценції

Додавання сироваткових альбумінів призводить до змін спектрів поглинання барвників, характер яких залежить від їх структурних особливостей. Для барвників **7513**, **7514**, **7515**, **7520**, **7545** та **7724** форма спектрів поглинання загалом зберігається, при цьому спостерігається лише

незначне зміщення основного максимуму поглинання у довгохвильову або короткохвильову область. Така поведінка може свідчити про відносно слабку взаємодію барвників з альбумінами не здатну змінити переважно агрегований стан барвників у водному розині.

Іншу спектральну поведінку демонструє барвник **7544**. У присутності сироваткових альбумінів для нього спостерігається перерозподіл інтенсивності між різними агрегатними смугами поглинання. Зокрема, відзначається зменшення внеску короткохвильових компонентів спектра та одночасне збільшення інтенсивності довгохвильових смуг. Найбільш виражено цей ефект проявляється у присутності ЛСА та БСА, що може свідчити про часткову перебудову агрегатних форм барвника при взаємодії з цими білками.

Для барвника **7642** (рис. 3.13) спектральні зміни є більш характерними для процесів дезагрегації барвника при зв'язуванні з білком. Після додавання сироваткових альбумінів спостерігається зменшення інтенсивності агрегатної смуги поглинання та її батохромний зсув з 513 нм до 524-526 нм. Одночасно відбувається збільшення інтенсивності смуги, що відповідає неагрегованій формі барвника в області 566-573 нм. Найбільш виражене зростання цієї смуги спостерігається у присутності ЛСА, що може свідчити про переважне зв'язування індивідуальних молекул барвника **7642** з цим білком. У випадку взаємодії з КСА та БСА, внесок агрегованих форм барвника лишається суттєвим.

Більш складні спектральні зміни спостерігаються для барвників **7647** та **7748** (рис. 3.13). У цих випадках спектри поглинання характеризуються наявністю кількох агрегатних смуг, що перериваються з індивідуальною смугою. Для барвника **7748** у присутності ЛСА максимум індивідуальної смуги поглинання при 570 нм стає домінуючим, що може свідчити про ефективне зв'язування індивідуальних молекул барвника з білком. Натомість додавання

КСА та БСА призводить до менш виражених змін спектра. Для барвника **7647** інтерпретація спектрів поглинання є складнішою через значне перекриття широких спектральних смуг, унаслідок чого окремі максимуми поглинання важко чітко розрізнити.

Спектри флуоресценції всіх досліджених барвників у присутності трьох типів сироваткових альбумінів відповідають випромінюванню неагрегованого барвника. Максимуми флуоресценції зазнають батохромного зсуву порівняно з відповідними максимумами вільних барвників у буфері. Для систем з ЛСА ці зсуви становлять 8-16 нм, для КСА 8-14 нм, а для БСА 2-14 нм. Подібні зміни положення максимумів можуть бути пов'язані зі зміною мікрооточення барвника при зв'язуванні з білковими структурами.

У присутності сироваткових альбумінів інтенсивність флуоресценції всіх барвників зростає, хоча ступінь посилення істотно залежить від структури молекули. Найбільше підсилення флуоресценції спостерігається для барвників **7642**, **7647** та **7748**, які містять N-пропілові або N-пентильні замісники на бензотіазольних кільцях. Для цих барвників приріст інтенсивності флуоресценції становить 33-78, 36,5-63 та 16,3-44 у присутності ЛСА, КСА та БСА відповідно. Для барвника **7642** максимальний приріст флуоресценції спостерігається у присутності ЛСА (у 78 разів), тоді як барвники **7647** та **7748** демонструють найбільш виражену флуоресцентну відповідь у присутності КСА (63 та 41 раз відповідно). При цьому барвник **7642** характеризується значно вищою абсолютною інтенсивністю флуоресценції порівняно з двома іншими барвниками цієї групи.

На відміну від них, барвники **7513**, **7544** та **7724** демонструють значно нижчу чутливість до сироваткових альбумінів. Для цих сполук збільшення інтенсивності флуоресценції зазвичай не перевищує 2,1 раза у присутності всіх досліджених білків, за винятком барвника **7544** у присутності ЛСА, де

спостерігається посилення флуоресценції у 11,6 раза. Подібно до їх поведінки у системах з нуклеїновими кислотами, така низька чутливість пов'язана з відсутністю замісників у  $\beta$ -положенні триметинового поліметинового ланцюга, що зумовлює відносно високу інтенсивність флуоресценції вільних барвників у буферному середовищі.

Інші барвники **7514**, **7515**, **7520** та **7545** містять N-метильні замісники на бензотіазольних кільцях, а також метильні або етильні групи у  $\beta$ -положенні поліметинового ланцюга. Для цієї групи барвників прирости інтенсивності флуоресценції становлять 10-31 раз у присутності ЛСА, 9,4-21 раз у присутності КСА та 4,3-8,4 рази у присутності БСА. При цьому барвники **7514**, **7520** та **7545** демонструють більш виражену флуоресцентну відповідь у присутності ЛСА порівняно з іншими досліджуваними альбумінами, тоді як барвник **7515** характеризується подібною інтенсивністю флуоресцентної реакції щодо ЛСА та КСА.

Загалом отримані результати свідчать про те, що ефективність взаємодії барвників із сироватковими альбумінами значною мірою визначається їх структурними особливостями. Зокрема, наявність довших N-алкільних замісників сприяє більш ефективному зв'язуванню барвників з білками та більш вираженому посиленню флуоресценції, що, ймовірно, пов'язано з участю гідروفобних взаємодій у стабілізації комплексів барвник-білок.

**3.3.4. Вплив  $\beta$ -заміщення триметинового ланцюга на спектральні та флуоресцентні властивості барвників.** Однією з ключових структурних особливостей досліджених барвників є наявність або відсутність замісника в  $\beta$ -положенні триметинового поліметинового ланцюга. У представленій серії барвників ця модифікація реалізована введенням алкільних груп (метильної або етильної) у центральну частину поліметинового хромофору. Порівняння

спектральних характеристик барвників з  $\beta$ -заміщенням та без нього дозволяє простежити вплив цієї структурної модифікації на люмінесцентні властивості молекул та їх флуоресцентну відповідь у присутності біополімерів.

Загалом барвники, що не містять замісника в  $\beta$ -положенні поліметинового ланцюга, характеризуються відносно високою інтенсивністю власної флуоресценції у водному буфері. Це пов'язано з тим, що незаміщений поліметиновий ланцюг зберігає високий ступінь планарності та ефективну  $\pi$ -кон'югацію між гетероциклічними фрагментами молекули. У таких системах випромінювальна релаксація збудженого стану відбувається достатньо ефективно, що зумовлює помітну флуоресценцію навіть у відсутності біомолекул. Водночас при взаємодії з нуклеїновими кислотами або білками посилення флуоресценції для таких барвників є відносно невеликим, оскільки їх власна емісія вже є досить інтенсивною.

На відміну від цього, введення замісника у  $\beta$ -положення триметинового ланцюга суттєво змінює люмінесцентні властивості барвника. Наявність метильної або етильної групи створює стеричні перешкоди для повної планаризації поліметинового хромофору, що зменшує ефективність  $\pi$ -делокалізації електронної густини вздовж молекули. У результаті вільні барвники з  $\beta$ -заміщенням характеризуються значно нижчою інтенсивністю власної флуоресценції. Перешкоди планарній геометрії люмінофора посилюють безвипромінювальну релаксацію збудженого стану, зокрема внутрішню конверсію та можливі процеси фотоізомеризації поліметинового ланцюга.

Важливою особливістю барвників з  $\beta$ -заміщенням є те, що їх флуоресценція значно зростає при зв'язуванні з біополімерами. Утворення комплексу з нуклеїновими кислотами або білками обмежує внутрішню рухливість поліметинового ланцюга та зменшує можливість конформаційних перебудов молекули. Така фіксація структури призводить до пригнічення

процесів безвипромінювальної релаксації та, відповідно, до значного підвищення квантового виходу флуоресценції. Саме тому для барвників з  $\beta$ -заміщенням часто спостерігається більш виражений ефект “turn-on” флуоресценції при зв’язуванні з біомолекулами.

Порівняння барвників, що містять різні алкільні замісники в  $\beta$ -положенні, також свідчить про роль стеричних факторів у формуванні спектральних властивостей. Збільшення розміру замісника може додатково посилювати викривлення поліметинового ланцюга у вільному стані, що ще більше знижує власну флуоресценцію барвника. Водночас після зв’язування з макромолекулою обмеження внутрішньомолекулярної рухливості частково компенсує цей ефект, що призводить до значного посилення емісії.

Таким чином,  $\beta$ -заміщення триметинового ланцюга є важливим структурним фактором, який визначає співвідношення між власною флуоресценцією барвника та його флуоресценцією при взаємодії з біополімерами. Барвники без  $\beta$ -замісника характеризуються вищою власною емісією, тоді як  $\beta$ -заміщені похідні демонструють більш виражене посилення флуоресценції при зв’язуванні з біомолекулами, що робить останні перспективними флуоресцентними зондами для біоаналітичних застосувань.

**3.3.5. Вплив замісників у бензотіазольних фрагментах на взаємодію барвників з нуклеїновими кислотами.** Окрім будови поліметинового ланцюга, важливим фактором, що впливає на спектральні властивості барвників та їх взаємодію з біополімерами, є природа замісників у бензотіазольних фрагментах молекули. У досліджуваній серії барвників варіювання цього елементу структури реалізовано введенням гідроксильних або метоксильних

груп у бензотіазольні кільця. Такі замісники можуть змінювати електронні характеристики хромофору, а також створювати додаткові можливості для специфічних міжмолекулярних взаємодій з нуклеїновими кислотами.

Порівняння спектральних характеристик барвників із гідроксильними та метоксильними замісниками показує, що барвники, які містять гідроксильні групи, демонструють значно вищу інтенсивність флуоресценції та більші значення приросту флуоресценції ( $\Delta Q$ ) у присутності нуклеїнових кислот. Така поведінка свідчить про більш ефективну стабілізацію люмінофора у складі комплексу з ДНК або РНК. Зростання інтенсивності флуоресценції може бути пов'язане з формуванням більш стабільних міжмолекулярних взаємодій, які обмежують внутрішньомолекулярну рухливість поліметинового ланцюга барвника.

Гідроксильні групи здатні утворювати водневі зв'язки з функціональними групами азотистих основ нуклеїнових кислот. Зокрема, можливими є взаємодії з карбонільними ( $=O$ ) та амінними ( $-NH_2$ ) групами основ, що розташовані у великій або малій борозенках подвійної спіралі ДНК або відповідних структурних елементах РНК. При цьому гідроксильна група може виступати як донор водневого зв'язку ( $-OH \rightarrow O$  або  $N$  основи), так і як акцептор ( $H-N$  основи  $\rightarrow O$  гідроксильної групи). Така подвійна функціональність значно розширює можливості формування стабілізуючих міжмолекулярних контактів у комплексі барвника з нуклеїновою кислотою.

Крім взаємодій з азотистими основами, гідроксильні групи можуть брати участь у контактах з фосфатним остовом нуклеїнових кислот. Зокрема, вони здатні утворювати водневі зв'язки з нестерифікованими кисневими атомами фосфатних груп. У водному буферному середовищі додаткову роль може відігравати структурована вода, яка бере участь у формуванні так званих водневих містків. У таких випадках реалізуються взаємодії типу барвник–

$\text{OH}\cdots\text{H}_2\text{O}\cdots\text{P}=\text{O}$  або барвник– $\text{OH}\cdots\text{H}_2\text{O}\cdots\text{O}=\text{C}$  азотистих основ. Формування подібних контактів сприяє фіксації просторової орієнтації молекули барвника у комплексі та підвищує жорсткість системи.

Зростання жорсткості молекулярного комплексу має важливі фотонні наслідки. Обмеження внутрішнього обертання фрагментів поліметинового ланцюга та пригнічення конформаційної рухливості зменшує ймовірність безвипромінювальної релаксації збудженого стану. У результаті підвищується ефективність випромінювальної релаксації, що проявляється у збільшенні квантового виходу та інтенсивності флуоресценції барвника у присутності нуклеїнових кислот.

На відміну від гідроксильних груп, метоксильні замісники характеризуються обмеженою здатністю до утворення водневих зв'язків. Метокси група здебільшого може виступати лише як акцептор водневого зв'язку і не здатна ефективно функціонувати як донор. Крім того, метоксильні групи є дещо більш стерично об'ємними та менш гідрофільними порівняно з гідроксильними. Це може ускладнювати їх розміщення у борозенках молекули нуклеїнової кислоти та зменшувати ефективність формування стабілізуючих контактів з біополімером.

Таким чином, варіювання замісників у бензотіазольних фрагментах дозволяє суттєво впливати на характер взаємодії барвників з нуклеїновими кислотами. Наявність гідроксильних груп сприяє формуванню додаткових водневих зв'язків і стабілізації комплексу барвник-нуклеїнова кислота, що приводить до більш вираженого посилення флуоресценції. Натомість метоксильні замісники мають менш виражений вплив на стабільність комплексу та ефективність флуоресцентної відповіді. Отримані результати свідчать, що природа функціональних груп у бензотіазольних фрагментах є важливим фактором, який визначає ефективність зв'язування поліметинових барвників з

нуклеїновими кислотами та їх потенціал як флуоресцентних зондів для дослідження біологічних систем.

### **3.3.6 Вплив N-алкільних замісників на взаємодію барвників з білками.**

Ще одним важливим структурним фактором, що впливає на спектральні властивості поліметинових барвників та їх здатність до взаємодії з біомолекулами, є природа N-алкільних замісників у гетероциклічних фрагментах молекули. У досліджуваній серії барвників варіювання цієї частини структури реалізовано шляхом зміни довжини алкільного ланцюга, зокрема метильних, пропільних та пентильних замісників. Така модифікація дозволяє оцінити вплив гідрофобності та стеричних параметрів молекули на ефективність зв'язування барвників з білками.

Білки, зокрема альбуміни, містять у своїй структурі численні гідрофобні ділянки та порожнини, здатні зв'язувати низькомолекулярні органічні сполуки. Відомо, що у молекулах альбуміну існують гідрофобні кишені, сформовані залишками ароматичних та аліфатичних амінокислот, які можуть виступати сайтами зв'язування для барвників. У таких ділянках гідрофобні фрагменти молекули барвника здатні взаємодіяти з неполярними амінокислотними залишками, що сприяє стабілізації комплексу.

Збільшення довжини N-алкільних замісників призводить до підвищення гідрофобності молекули барвника, що може сприяти більш ефективному включенню барвника у гідрофобні порожнини білка. У результаті формуються більш стабільні комплекси барвник–білок, у яких молекула барвника фіксується у певному просторовому положенні. Така фіксація обмежує внутрішньомолекулярну рухливість поліметинового ланцюга та зменшує ймовірність процесів безвипромінювальної релаксації збудженого стану.

Внаслідок цього при взаємодії з білками спостерігається зростання інтенсивності флуоресценції барвників, причому ефект посилення може залежати від довжини алкільного ланцюга. Барвники з довшими N-алкільними замісниками, як правило, демонструють більш виражене збільшення інтенсивності флуоресценції у присутності білків, що узгоджується з припущенням про більш ефективне занурення таких молекул у гідрофобні ділянки білкової структури. Крім того, гідрофобне середовище всередині білкових порожнин може сприяти додатковій стабілізації збудженого стану барвника та зменшенню впливу молекул води, які здатні ефективно гасити флуоресценцію.

Слід також враховувати, що надмірне збільшення розміру алкільних замісників може призводити до появи стеричних перешкод для ефективного проникнення молекули барвника у зв'язувальні сайти білка. Тому оптимальне співвідношення між гідрофобністю та розміром замісників є важливим фактором, що визначає ефективність формування комплексу барвник-білок.

Таким чином, варіювання довжини N-алкільних замісників у гетероциклічних фрагментах поліметинових барвників дозволяє модулювати їх здатність до взаємодії з білками. Збільшення довжини алкільного ланцюга підвищує гідрофобність молекули та сприяє більш ефективному зв'язуванню барвника з гідрофобними ділянками білків, що призводить до посилення флуоресценції у складі відповідних комплексів. Отримані результати свідчать про важливу роль гідрофобних взаємодій у формуванні комплексів поліметинових барвників з білками та підкреслюють значення структурної модифікації барвників для створення ефективних флуоресцентних зондів для біологічних систем.

**3.3.7 Висновки до підрозділу 3.3.** Досліджені барвники побудовані на симетричному тіакарбоціаніновому каркасі та відрізняються замісниками у

трьох структурних елементах молекули: у положеннях 6,6' або 5,5' бензотіазольних кілець (гідроксильні або О-метильні групи), у положенні атома азоту бензотіазольних гетероциклів (N-алкільні замісники різної довжини), а також у  $\beta$ -положенні триметинового поліметинового ланцюга (метильні, етильні замісники або їх відсутність). Отримані результати дозволили встановити основні закономірності впливу цих структурних модифікацій на спектрально-люмінесцентні властивості барвників у присутності нуклеїнових кислот та сироваткових альбумінів.

Найбільш виражена флуоресцентна реакція на нуклеїнові кислоти спостерігається для барвників **7515** та **7520**, які містять гідроксильні групи в положеннях 6,6' або 5,5' бензотіазольних кілець, N-метильні замісники на гетероциклах та невеликі  $\beta$ -замісники (метильні або етильні групи) у триметиновому ланцюзі. Заміна гідроксильних груп на О-метильні, подовження N-алкільних ланцюгів або відсутність  $\beta$ -замісника призводять до зменшення флуоресцентної відповіді на нуклеїнові кислоти. Імовірно, гідроксильні групи можуть брати участь у формуванні водневих зв'язків з функціональними групами нуклеотидних основ або фосфатного остова, що підвищує стабільність комплексів барвник–нуклеїнова кислота. Водночас більш об'ємні О-метильні групи та довші алкільні замісники можуть створювати додаткові стеричні перешкоди для ефективного зв'язування барвника з нуклеїновими кислотами.

Для всіх досліджених барвників спостерігається виражена перевага РНК над ДНК за інтенсивністю флуоресцентної відповіді. Зокрема, для найбільш чутливих барвників інтенсивність флуоресценції у присутності РНК зростає приблизно у 2–3 рази сильніше, ніж у присутності ДНК. Така поведінка може свідчити про можливу участь інтеркаляційного зв'язування, яке здатне реалізовуватися навіть у частково одноланцюгових ділянках РНК, хоча не виключено співіснування кількох режимів взаємодії барвників з нуклеїновими кислотами.

Аналіз спектрально-люмінесцентних властивостей барвників у присутності сироваткових альбумінів показав інші структурні закономірності. Заміна гідроксильних груп на О-метильні в положеннях 5,5' або 6,6' бензотіазольних кілець істотно не впливає на інтенсивність флуоресцентної реакції барвників у присутності ЛСА, КСА та БСА. Натомість подовження N-алкільних замісників на бензотіазольних кільцях приводить до помітного зростання флуоресцентної відповіді на всі три досліджені білки. Ймовірно, це пов'язано з тим, що гідрофобні алкільні ланцюги барвників можуть взаємодіяти з гідрофобними ділянками білкових глобул, що сприяє стабілізації комплексів барвник-білок.

Важливу роль також відіграє заміщення у  $\beta$ -положенні триметинового ланцюга. Відсутність замісника в цьому положенні призводить до зниження чутливості барвників як до нуклеїнових кислот, так і до сироваткових альбумінів. Це пов'язано з тим, що барвники з незаміщеним триметиновим ланцюгом характеризуються відносно високою власною інтенсивністю флуоресценції у вільному стані, тоді як  $\beta$ -заміщення може знижувати квантовий вихід флуоресценції вільної молекули, що забезпечує більш виражений ефект приросту флуоресценції після зв'язування з біомакромолекулами.

Таким чином, встановлені залежності між структурою барвників і їх спектрально-люмінесцентними властивостями дозволяють визначити перспективні напрями подальшої модифікації тіакарбоціанінових флуоресцентних зондів. Зокрема, барвники **7515** та **7520** можуть розглядатися як перспективні кандидати для створення РНК-чутливих флуоресцентних зондів, тоді як барвник **7642** демонструє високу чутливість до сироваткового альбуміну людини та заслуговує на подальше дослідження як флуоресцентний зонд для білкових систем.

За результатами досліджень опубліковані наступні наукові праці:

1) Kazakov-Kravchenko O.S., Losytskyy M.Yu., Derevyanko N.A., Kulinich A.V., Shandura M.P., Yarmoluk S.M. (2026) Substituent effects in thiocarbocyanine dyes on their spectral-fluorescent response in the presence of nucleic acids and serum albumins. *Biopolymers & Cell*, 2(42), 139—149. <https://doi.org/10.7124/bc.000B39>

2) Kazakov-Kravchenko O. S., Polishchuk V. M., Shandura M. P., Yarmoluk S. M. Spectral-luminescent properties of cyanine dyes for nucleic acid detection. Abstracts of the IX International (XIX Ukrainian) Scientific Conference for Students, Postgraduates and Young Scientists “Current Chemical Problems” (CCP-2026), March 24–26, 2026, Vinnytsia, Ukraine, P. 19.

### **3.4. Дослідження монометинціанінового барвника fb128 для застосування в плр у реальному часі**

Ефективність застосування флуоресцентних барвників у полімеразній ланцюговій реакції в реальному часі визначається не лише їх здатністю демонструвати значний приріст флуоресценції при зв'язуванні з дволанцюговою ДНК, але й фізико-хімічними особливостями утворення комплексу барвника з длДНК, оскільки утворення комплексу суттєво впливає на перебіг ампліфікаційної реакції. Тому, при дослідженні нових інтеркалюючих барвників важливо оцінювати комплекс показників, які характеризують їхню придатність для використання в системах ПЛР в реальному часі.

Одним із ключових параметрів є вплив концентрації барвника на перебіг ПЛР, що проявляється у змінах значення порогу циклу (Ct) та можливому інгібуючому ефекті барвника щодо активності ДНК-полімерази. Визначення діапазону концентрацій, у якому барвник забезпечує достатній рівень

флуоресценції без пригнічення ампліфікації, є важливою передумовою його практичного використання. Не менш суттєвим показником є ефективність ПЛР, що оцінюється на основі стандартної кривої титрування та відображає здатність системи ампліфікації до експоненційного накопичення продукту. Паралельно аналізується нахил лінії тренду, розрахований за результатами лінійного наближення залежності значення  $C_t$  від концентрації барвника, що дозволяє кількісно оцінити вплив барвника на кінетику реакції. Важливим елементом характеристики барвників також є аналіз кривих плавлення, який дає змогу оцінити специфічність ампліфікації та придатність барвника для аналізу продуктів ПЛР після ампліфікації. Додатково враховується вплив складу реакційної суміші на ефективність ПЛР, оскільки взаємодія барвника з компонентами реакції може істотно впливати на інтенсивність сигналу та стабільність ампліфікаційного процесу. Нарешті, одним із практично значущих параметрів є інтенсивність флуоресценції барвників у кінцевій точці кПЛР, що визначає співвідношення сигнал/шум і, відповідно, чутливість методу детекції.

Таким чином, комплексний аналіз зазначених параметрів дозволяє всебічно оцінити придатність нових флуоресцентних барвників для застосування у кількісній ПЛР у реальному часі та визначити їх потенційні переваги порівняно з існуючими аналогами.

**3.4.1. Відбір перспективних барвників за спектрально-люмінесцентними властивостями.** Серед усіх барвників, які досліджувалися в роботі, барвники **fb123** та **fb128** проявили найбільш перспективні спектрально-люмінесцентні властивості для потенційного застосування їх в ПЛР у реальному часі. Так, барвник **fb128** (рис. 3.3) продемонстрував найвищу інтенсивність флуоресценції у присутності нуклеїнових кислот. На рисунку 3.14 показано спектри збудження та флуоресценції **fb128** у водному середовищі (50

мМ Трис-НСІ буфер, рН 8,0) за відсутності (1, 2) та за наявності (3, 4) дволанцюгової ДНК. Максимуми збудження ( $\lambda_{ex}$ ) та випромінювання ( $\lambda_{em}$ ) для **fb128**, зв'язаного з ДНК, становили 491 нм та 513 нм відповідно, при цьому інтенсивність флуоресценції ( $I_{DNA+buf}$ ) досягала 2090 відносних одиниць (в.о.). Натомість, інтенсивність флуоресценції вільного барвника в буфері ( $I_{buf}$ ) становила лише 13 відносних одиниць. Таким чином, додавання ДНК призвело до 160,7-кратного збільшення інтенсивності флуоресценції ( $\Delta Q = I_{DNA+buf}/I_{buf}$ ) барвника в буфері.

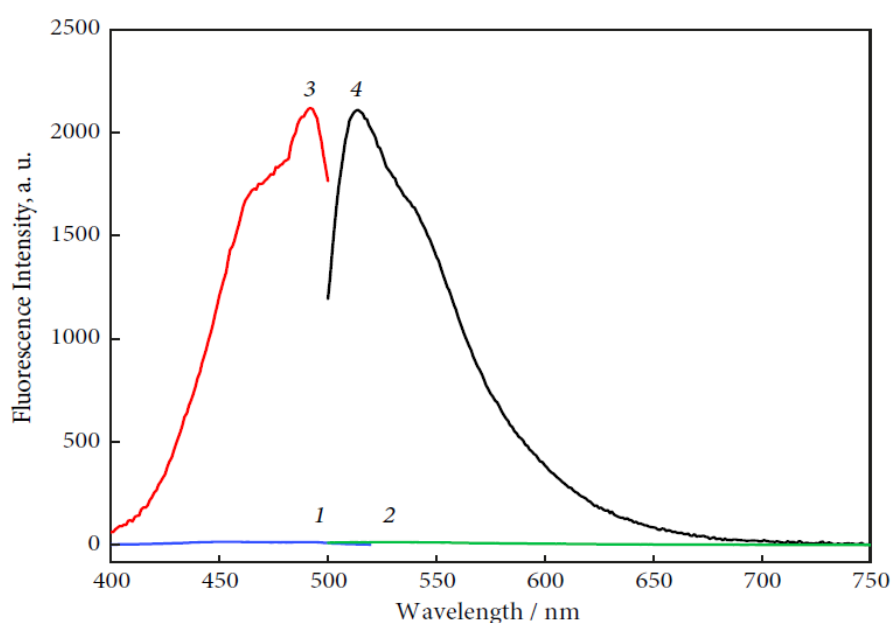


Рис. 3.14. Нормалізовані спектри збудження та випромінювання для **fb128**: 1 – спектр збудження в буфері; 2 – спектр випромінювання в буфері; 3 – спектр збудження в присутності ДНК; 4 – спектр випромінювання в присутності ДНК

Для барвника **fb123** (рис. 3.2) максимуми збудження ( $\lambda_{ex}$ ) та випромінювання ( $\lambda_{em}$ ), зв'язаного з ДНК, становили 459 нм та 537 нм відповідно, при цьому інтенсивність флуоресценції ( $I_{DNA+buf}$ ) була дещо меншою ніж для **fb128**, але сягала 1545 відносних одиниць (в.о.). Щоправда, інтенсивність флуоресценції вільного барвника в буфері ( $I_{buf}$ ) була досить високою і становила 138 відносних одиниць. Проте, незважаючи на наявність

такої помітної власної флуоресценції, барвник **fb123** продемонстрував зростання інтенсивності флуоресценції при зв'язуванні з дволанцюговою ДНК (приблизно у 12 разів), що свідчить про достатній контраст між сигналом та фоновою флуоресценцією. Слід зазначити, що високий приріст флуоресценції не є єдиним критерієм придатності барвника для застосування у ПЛР. Барвники з надто сильним зв'язуванням з дволанцюговою ДНК можуть інгібувати ампліфікацію. Тому для практичного використання більш важливим є баланс між підсиленням флуоресценції та мінімальним впливом на ефективність ПЛР.

Також, цікаво було провести порівняльний аналіз ефективності застосування цих флуоресцентних барвників у ПЛР в реальному часі, оскільки вони є структурно спорідненими - барвник **fb128** являє собою мономерну форму, тоді як **fb123** є його димерним аналогом. Таким чином, за результатами досліджень спектрально-люмінесцентних властивостей флуоресцентних барвників, **fb123** та **fb128** були відібрані для подальших тестувань фізико-хімічних параметрів, які впливають на перебіг ампліфікаційної реакції.

**3.4.2. Вплив концентрації барвника на інгібування та ампліфікаційні параметри ПЛР у реальному часі.** Визначення порогу інгібування ПЛР барвниками є першим і критично важливим етапом у будь-якому дослідженні нових флуоресцентних барвників для ПЛР у реальному часі. Відомо, що зв'язування молекул барвника з ДНК є критичним для моніторингу процесу ампліфікації, однак барвники з надмірно високою спорідненістю до ДНК або при надлишковій концентрації можуть пригнічувати реакцію полімеризації, стабілізуючи дуплекс ДНК, або безпосередньо інгібувати ДНК-полімеразу. Різні флуоресцентні барвники для ПЛР у реальному часі, як комерційні, так і альтернативні, що досліджуються останнім часом, мають різні концентрації порогів інгібування, які складають для SYBR Green I  $> 1 \mu\text{M}$ , для EvaGreen  $> 2 \mu\text{M}$ , для барвників сімейства SYTO  $> 10 \mu\text{M}$ , а деяких  $> 20 \mu\text{M}$ , для барвників сімейства VAO  $> 5 \mu\text{M}$ , для VEVO  $> 1 \mu\text{M}$  [85, 88, 91]

Отже, для визначення порогів інгібування флуоресцентних барвників **fb123** та **fb128** було проведено аналіз ПЛР фрагменту гена *RMP22* розміром 201 пар нуклеотидів при додаванні в ампліфікаційну суміш цих барвників в чотирьох різних концентраціях – 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  та 1  $\mu\text{M}$ . При цьому, кількість матричної ДНК та склад реакційної суміші залишався постійними. На рис. 3.15 та 3.16 зображені електрофореграми продуктів ПЛР ампліфікованих фрагментів гена *RMP22* в 1,6% агарозному гелі для барвників **fb123** та **fb128** при різних концентраціях.

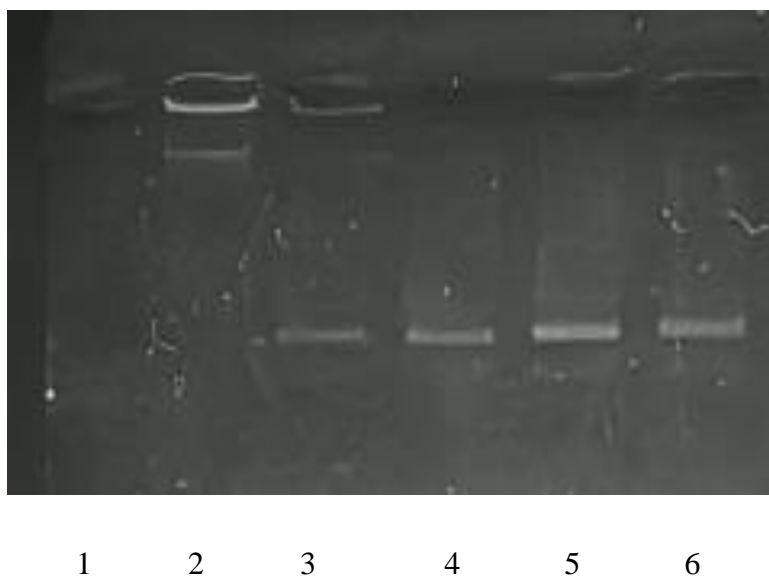


Рис. 3.15. Електрофореграма продуктів ПЛР гена *SMN1*, в 1,6% агарозному гелі: 1 – негативний контроль (NTC); 2-5 – зразки, які містять **fb123** у концентраціях: 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  відповідно. 6 – позитивний контроль (ПЛР суміш без флуоресцентного барвника)

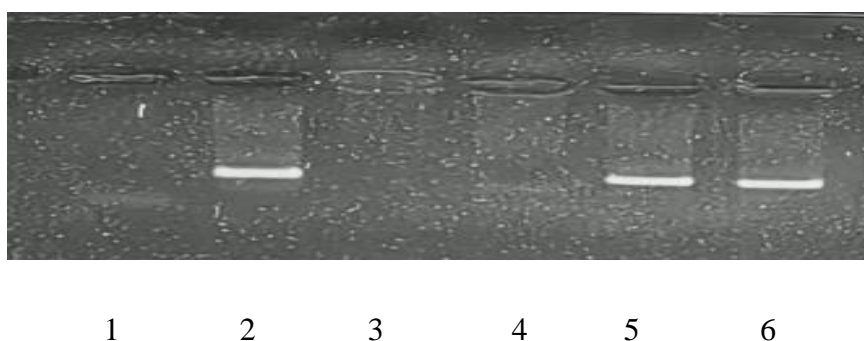


Рис. 3.16. Електрофореграма продуктів ПЛР гена *RMP22*, в 1,6% агарозному гелі: 1 – негативний контроль (НТС); 2 – позитивний контроль (ПЛР суміш без флуоресцентного барвника); 3-6 – зразки, які містять **fb128** у концентраціях: 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  відповідно

Результати першого тестування впливу концентрацій барвників на інгібування ПЛР показали, що при концентрації 20 $\mu\text{M}$  барвники як **fb128**, так і **fb123** повністю інгібували ампліфікацію – продукти ПЛР були відсутні (рис. 3.15 – доріжка 2, 4.5; рис. 3.16 – доріжка 3). При концентраціях 10 $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  та 1  $\mu\text{M}$  **fb123** не проявляв інгібуючого ефекту на ПЛР (рис. 3.15, доріжки 3-5). Натомість, **fb128** з концентрацією 10 $\mu\text{M}$  в реакційній суміші проявляв інгібуючий ефект, тоді як концентрації 2  $\mu\text{M}$  та 1  $\mu\text{M}$  цього барвника інгібуючого ефекту не мали (рис. 3.16).

Таким чином, оптимальний робочий діапазон концентрацій досліджених барвників для подальшого флуоресцентного моніторингу ПЛР в реальному часі виявився наступним – для **fb123** верхня межа (інгібування ПЛР) має бути меншою 20 $\mu\text{M}$ , а для **fb128** - меншою 10 $\mu\text{M}$ . Нижню межу нами було обрано в концентрації 0,1 $\mu\text{M}$ . Виходячи з цього, на наступному етапі було досліджено ключові параметри, що описують ефективність барвників в аналізі ПЛР в реальному часі, а саме, значення порогу циклу ( $C_t$ ) - кількістю циклів, які визначають досягнення порогу позитивного результату тесту, нахил лінії тренду залежності  $C_t$  від концентрації, інтенсивність флуоресценції барвників у кінцевій точці ампліфікації, а також більш точний діапазон концентрації барвника без ефекту інгібування. Високе значення  $C_t$ , позитивний нахил лінії тренду та низька інтенсивність флуоресценції барвників можуть вказувати на посилене інгібування ампліфікації. З іншого боку, високе значення  $C_t$  та низька інтенсивність флуоресценції може бути пов'язана не з інгібуванням ПЛР, а з чутливістю флуоресцентної детекції.

Для визначення параметрів ефективності флуоресцентного барвника **fb123** було проведено ПЛР в реальному часі фрагмента гена *RMP22* розміром 131 п.н. На рис. 3.17 представлено ампліфікаційні криві при різних концентраціях **fb123**: 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 та 16  $\mu\text{M}$ .

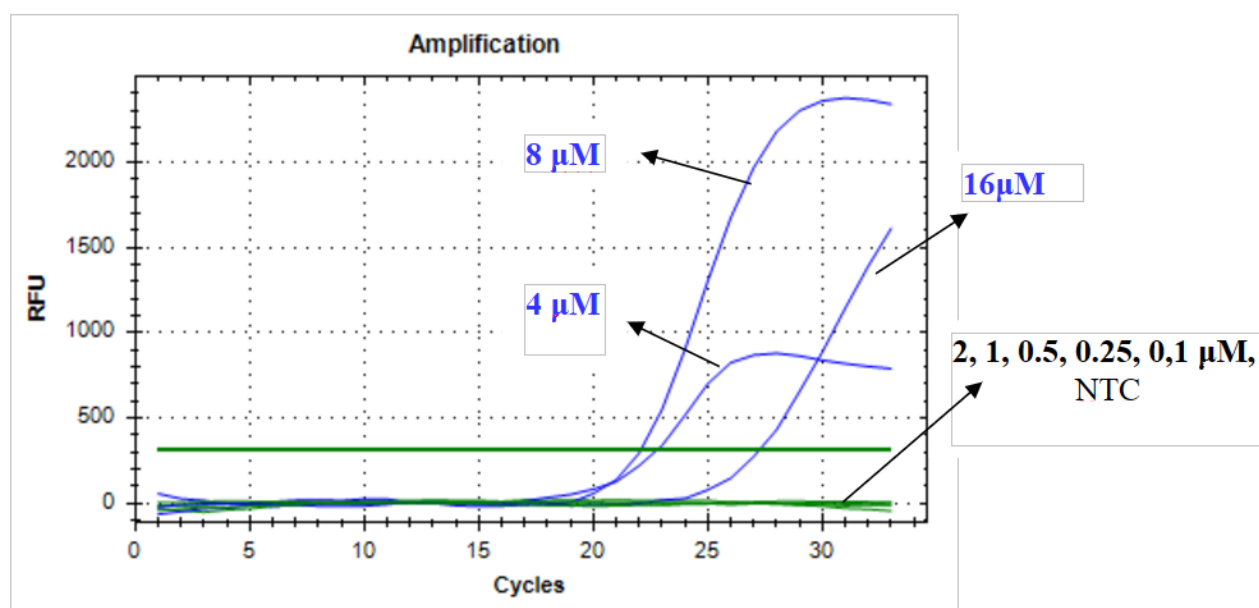


Рис. 3.17. Графіки ампліфікації фрагмента гена *RMP22* з використанням **fb123** для флуоресцентного моніторингу ПЛР в режимі реального часу. Концентрації **fb123** вказано на графіку ( $\mu\text{M}$ )

На рис. 3.18 представлено ампліфікаційні криві при різних концентраціях барвника **fb128**: 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 та 8  $\mu\text{M}$ .

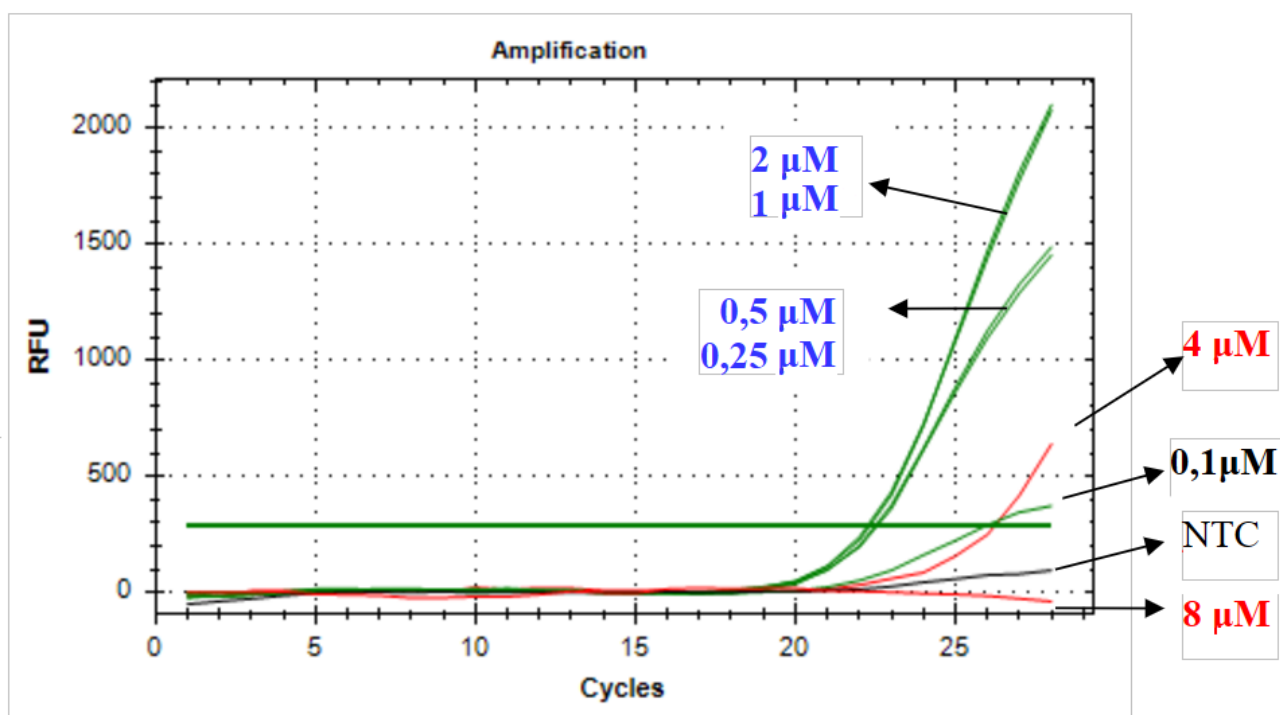


Рис. 3.18. Графіки ампліфікації фрагмента гену *PMP22* з використанням **fb128** для флуоресцентного моніторингу ПЛР в режимі реального часу. Концентрації **fb128** вказано на графіку ( $\mu\text{M}$ )

Попри те, що **fb123** демонстрував відносно низький рівень інгібування ампліфікації навіть при високих концентраціях (до  $10\mu\text{M}$ ; рис. 3.15 - доріжка 3), його робочий діапазон флуоресцентної детекції виявився надзвичайно вузьким. Найкраща концентрація цього барвника для ПЛР становила  $8\mu\text{M}$ , коли значення  $C_t$  були найменшими (22,2). Значне підвищення  $C_t$  (27,4) при збільшенні концентрації до  $16\mu\text{M}$  вказувало на початок інгібування реакції, тоді як при нижчих концентраціях спостерігалось зменшення ефективності ПЛР. Так, вже при концентрації  $4\mu\text{M}$  значення  $C_t$  зросло на один цикл (23,1) в порівнянні з концентрацією  $8\mu\text{M}$ , а також спостерігалось різке зниження інтенсивності флуоресценції в кінцевій точці. В свою чергу, ще за нижчих концентрацій (2, 1, 0.5, 0.25, 0,1  $\mu\text{M}$ ) флуоресцентна крива навіть не досягала

порогового рівня (рис. 3.17). Водночас електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР у агарозному гелі підтверджував наявність чітких ампліфікованих фрагментів ДНК.

Слід відзначити, що при зниженні концентрації барвника нижче певного критичного рівня спостерігалось збільшення значення  $C_t$  також і для **fb128**, але цей ефект був зафіксований лише при найнижчій з протестованих концентрації барвника – 0,1  $\mu\text{M}$  (рис. 3.18). Все це може свідчити про те, що зниження концентрації барвника не пригнічує ампліфікацію, а обмежує ефективність флуоресцентної детекції, яка пов'язана з недостатнім насиченням новосинтезованої дволанцюгової ДНК молекулами барвника. В свою чергу, графіки ампліфікації флуоресцентного моніторингу ПЛР в режимі реального часу з використанням **fb128** мали виражену відмінність від графіків для **fb123**. Попри те, що інгібуючий ефект барвника **fb128** проявлявся вже при концентрації 4  $\mu\text{M}$ , показники  $C_t$  для концентрацій в діапазоні від 2  $\mu\text{M}$  до 0,25  $\mu\text{M}$  мали низькі значення і слабо варіювали в цьому діапазоні, змінюючись від 22,25 до 22,56.

Залежність значень  $C_t$  від концентрації флуоресцентних барвників **fb123** та **fb128** оцінювали методом лінійної регресії, що дозволило кількісно охарактеризувати вплив барвника на ефективність ПЛР. Лінійна апроксимація значення  $C_t$  до концентрації барвника **fb128** показала негативний коефіцієнт нахилу ( $\text{slope} = -0,11 \text{ Ct}/\mu\text{M}$ ), що свідчило про відсутність вираженого інгібування ПЛР в цьому діапазоні концентрацій (рис. 3.19). Розраховані коефіцієнти рівняння є достовірними за статистичним критерієм Краскела-Уоліса ( $H = 10,38$ ;  $p = 0,02$ ). Невелика величина нахилу вказує на низьку чутливість  $C_t$  до зміни концентрації, що характеризує **fb128** як стабільний барвник із мінімальним впливом на ефективність ампліфікації.

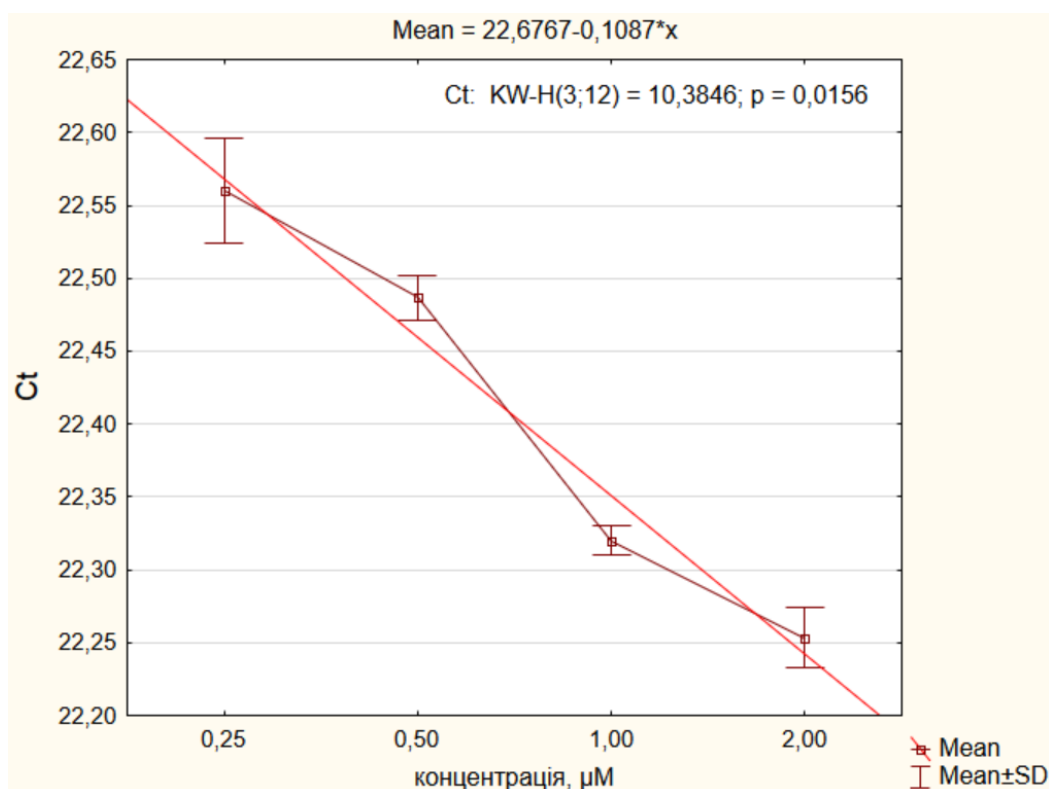


Рис. 3.19. Вплив концентрації барвника **fb128** на середнє значення порогового циклу (Ct) під час ампліфікації гену *PMP22*. До лінійних апроксимацій були включені лише точки без значного пригнічення ПЛР.

На відміну від цього, для **fb123** спостерігалася значна варіабельність Ct у значно вужчому діапазоні концентрацій (4–16 μM), де значення Ct змінювалися від 22 до 27. Лінійна регресія виявила позитивний нахил (slope = +2,25 Ct/μM; p<0,05), що свідчить про зростання Ct зі збільшенням концентрації барвника (рис. 3.20).

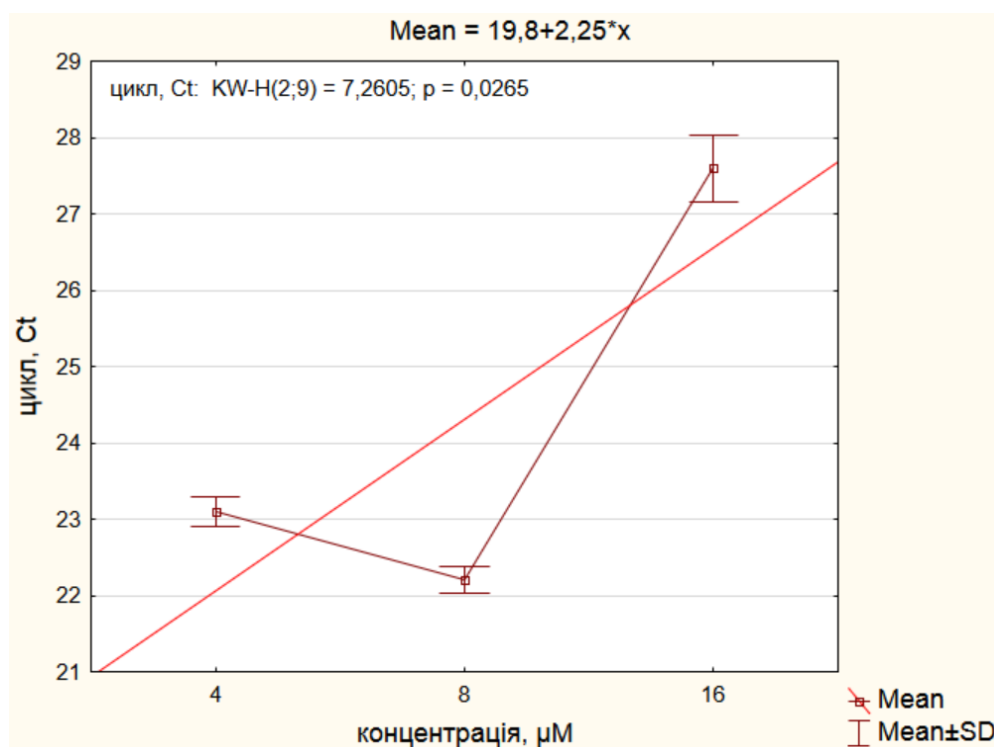


Рис. 3.20. Вплив концентрації барвника **fb123** на середнє значення порогового циклу (Ct) під час ампліфікації гену PMP22

Така залежність є характерною для інгібування ПЛР при високих концентраціях барвника, коли підвищення концентрації призводить до затримки ампліфікації. Більша величина slope для **fb123** порівняно з **fb128** вказує на сильну залежність Ct від концентрації, що підтверджує вузький робочий діапазон цього барвника. Навіть незначні зміни концентрації **fb123** призводять до суттєвих змін Ct, що ускладнює його практичне застосування без точного контролю умов реакції.

На наступному етапі було проаналізовано залежність кінцевої інтенсивності флуоресценції від концентрації барвників **fb123** та **fb128** (рис. 3.21 та рис. 3.22). Для обох барвників отримані криві мали нелінійний (поліноміальний) характер. В обох випадках спостерігалася типова залежність: зі збільшенням концентрації барвника інтенсивність флуоресценції спочатку

зростала, досягала максимуму або плато, після чого зменшувалася при подальшому підвищенні концентрації. Така поведінка є характерною для систем ПЛР у реальному часі та пояснюється інгібуванням ампліфікації при високих концентраціях барвника.

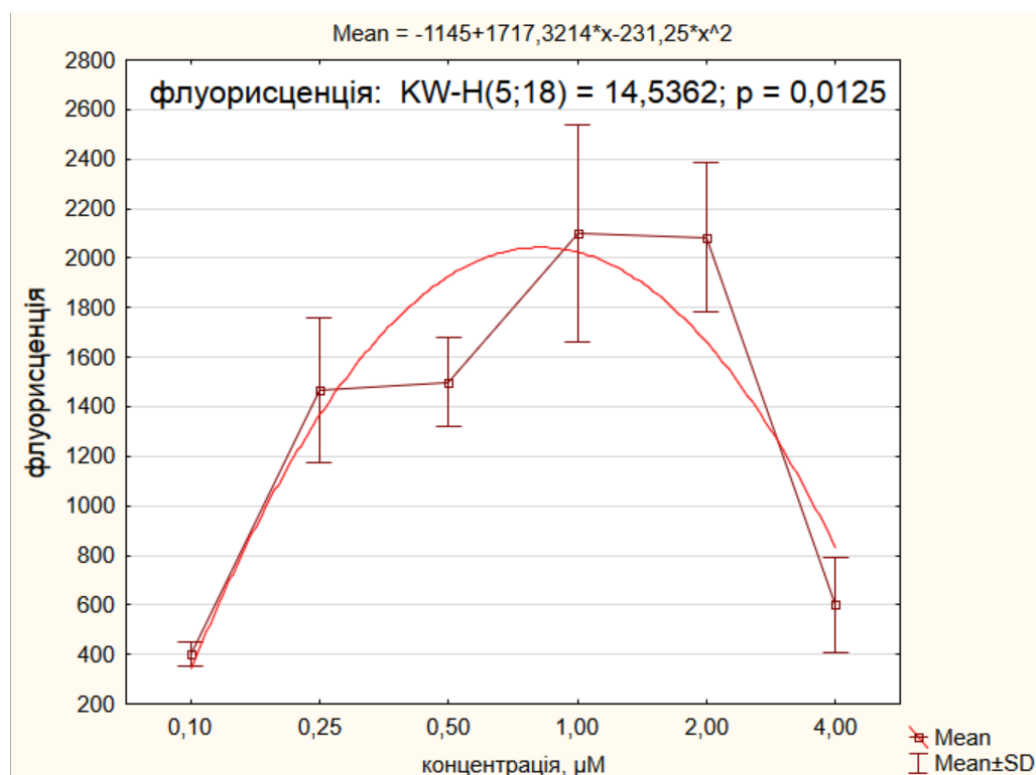


Рис. 3.21. Вплив концентрації барвника **fb128** на кінцеву інтенсивність флуоресценції у відносних одиницях флуоресценції (в.о.) під час ампліфікації гену *PMP22*

Для **fb128** максимальна інтенсивність флуоресценції становила близько 2100 відносних одиниць (в.о.) при концентрації 1  $\mu\text{M}$ . У діапазоні концентрацій 0,5–2  $\mu\text{M}$  інтенсивність залишалася на близькому рівні ( $\approx 1500$ –2100 в.о.), формуючи широке плато. Подальше зниження концентрації супроводжувалося поступовим зменшенням сигналу (до  $\sim 400$  в.о. при 0,1  $\mu\text{M}$ ), що свідчить про плавну, передбачувану залежність флуоресценції від концентрації. Така форма

кривої вказує на широкий робочий діапазон **fb128** та його толерантність до варіацій концентрації.

Для **fb123**, незважаючи на досягнення вищої максимальної інтенсивності (~2300 в.о. при 8  $\mu\text{M}$ ), спостерігалася різко виражена залежність сигналу від концентрації. Зменшення концентрації до 4  $\mu\text{M}$  призводило до значного падіння флуоресценції (~800 в.о.), тоді як при концентраціях  $\leq 2$   $\mu\text{M}$  сигнал практично не реєструвався. Такий різкий спад свідчить про високу чутливість системи до концентрації **fb123** та відсутність стабільного плато.

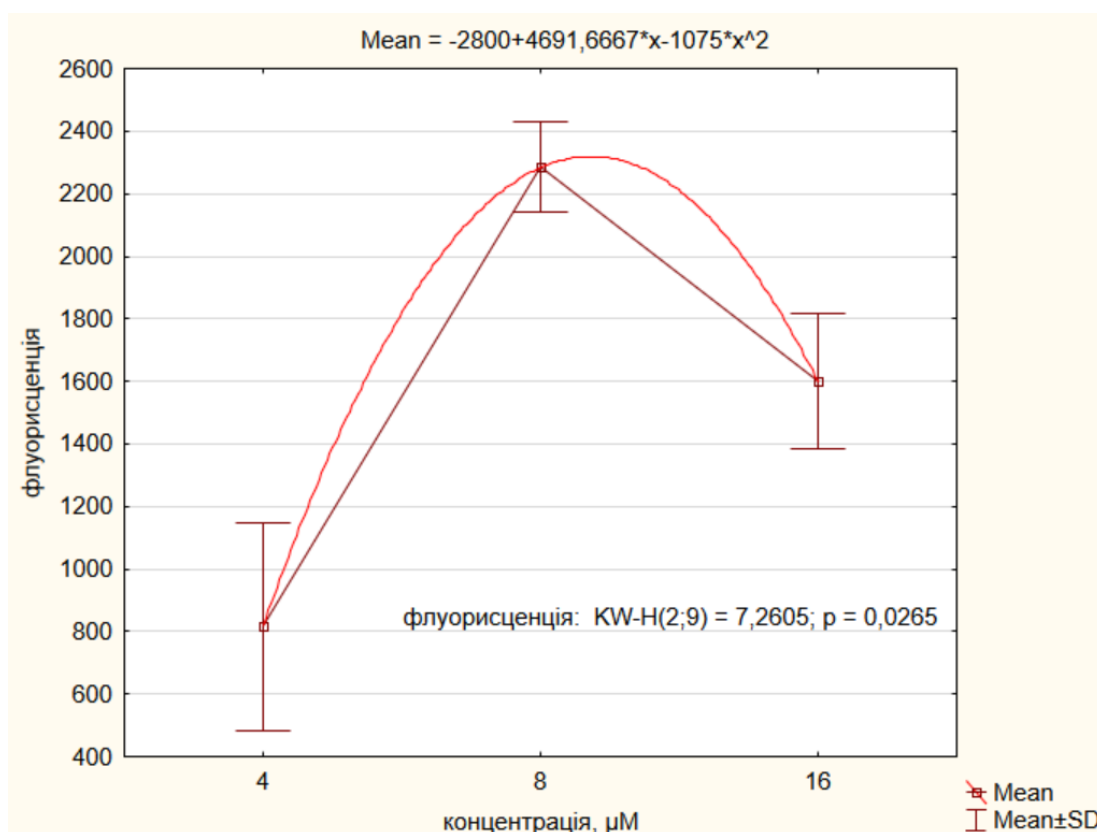


Рис. 3.22. Вплив концентрації барвника **fb123** на кінцеву інтенсивність флуоресценції у відносних одиницях флуоресценції (в.о.) під час ампліфікації гену RMP22

Важливо зазначити, що така висока чутливість  $C_t$  до змін концентрації та різко нелінійна залежність флуоресцентного сигналу для **fb123** зумовлена не лише інгібуванням ПЛР при високих концентраціях, але й, імовірно, обмеженнями ефективності флуоресцентної детекції при низьких концентраціях барвника. Відсутність сигналу при 2  $\mu\text{M}$  і нижче свідчить про те, що за цих умов кількість зв'язаного барвника або квантовий вихід флуоресценції є недостатніми для надійної реєстрації сигналу, навіть якщо ампліфікація ДНК відбувається. Враховуючи ці результати, подальші експериментальні дослідження були сфокусовані на барвнику **fb128** як більш перспективному кандидатові для застосування в ПЛР у реальному часі.

Відомо, що характеристики ПЛР у реальному часі, зокрема значення  $C_t$  та інтенсивність флуоресценції, можуть залежати не лише від властивостей барвника, але й від параметрів амплікону, включаючи його довжину та нуклеотидну послідовність. Зокрема, збільшення довжини амплікону може впливати на ефективність ампліфікації. Оптимальною довжиною амплікону вважається розмір в 80–150 п.н., допустимою довжиною  $\sim 200$  п.н., а довжина амплікону  $> 200$  п.н. може впливати на ефективність ПЛР в реальному часі [105]. У цьому контексті наступним етапом була оцінка впливу концентрації **fb128** на значення  $C_t$  та кінцеву інтенсивність флуоресценції при ампліфікації альтернативної ДНК-мішені ( $>200$  п.н.) за незмінних умов реакції. Такий підхід дозволив перевірити, чи зберігається стабільна поведінка барвника при зміні параметрів амплікону для оцінки універсальності застосування **fb128** для різних ПЛР-мішеней.

Було проведено ПЛР у реальному часі на альтернативній ДНК-мішені зі сталим складом реакційної суміші та різною концентрацією **fb128**, яка варіювала від 0,05 мкМ до 6 мкМ. На рис. 3.23 показано криві ампліфікації для фрагмента гена *SMN1* розміром 201 п.н. при шести різних концентраціях **fb128**: 0,05, 0,2, 0,7, 1,6, 3 та 6 мкМ.

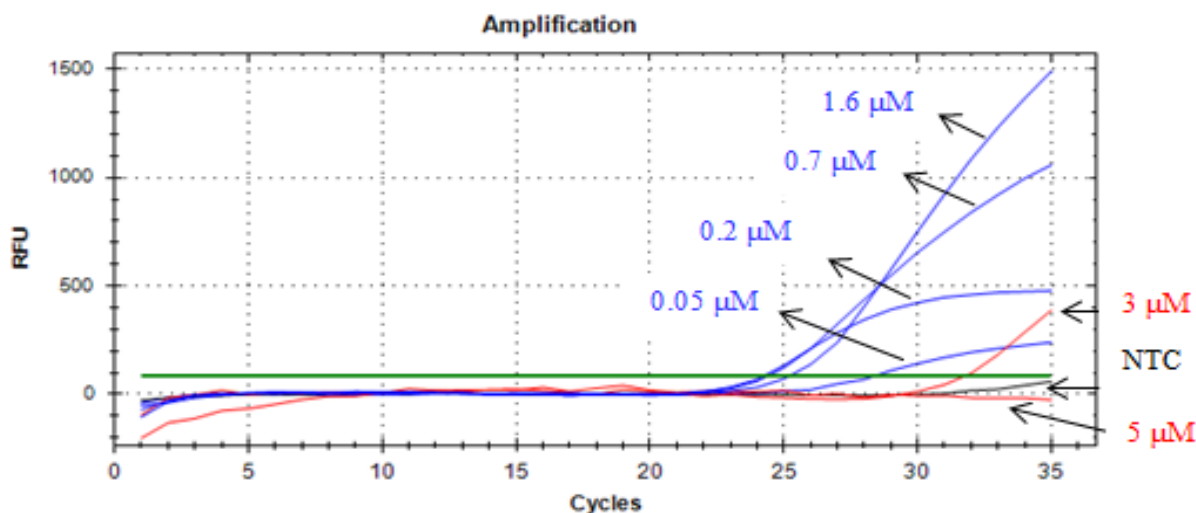


Рис. 3.23. Графіки ампліфікації фрагмента гену SMN1 довжиною 201 п.н. з використанням **fb128** для флуоресцентного моніторингу в режимі реального часу. Концентрації **fb128** вказано на графіку (мкМ). NTC – контроль без матриці

Результати показали, що **fb128** при 0,7 мкМ та 0,2 мкМ дав порівнянні та відносно ранні значення  $C_t$  – 24 цикл. При 1,6 мкМ спостерігалася невелика затримка  $C_t$  - 25 цикл. Однак збільшення концентрації барвника до 3 мкМ, спричинило суттєві затримки  $C_t$ . При 6 мкМ реакція не дала виявлюваного сигналу флуоресценції (відсутність  $C_t$ ), що свідчить про повне пригнічення ампліфікації. Концентрація 0,05 мкМ дала виявлюваний продукт, але із затримкою значень  $C_t$  та низькою кінцевою флуоресценцією. Максимальна інтенсивність флуоресценції становила близько 1500 відносних одиниць при концентрації 1,6  $\mu\text{M}$ . Подальше зниження концентрації супроводжувалося поступовим зменшенням сигналу (до  $\sim 300$  в.о. при 0,05  $\mu\text{M}$ ), що свідчить про плавну, передбачувану залежність флуоресценції від концентрації.

Для підтвердження цих спостережень продукти ПЛР з реакцій, показаних на рис. 3.23, були проаналізовані за допомогою електрофорезу в агарозному гелі (див. рис. 3.24). Специфічні продукти були виявлені при концентраціях **fb128**

від 0,05 до 1,6 мкМ, тоді як при 6 мкМ продукт не спостерігався, і лише сліди продукту ПЛР були помітні при 3 мкМ. Ці дані свідчать про те, що концентрації **fb128** вище ~2 мкМ інгібують ПЛР за даних умов, а оптимальний робочий діапазон за наших експериментальних параметрів був визначений як між 0,2 мкМ та 1,6 мкМ.

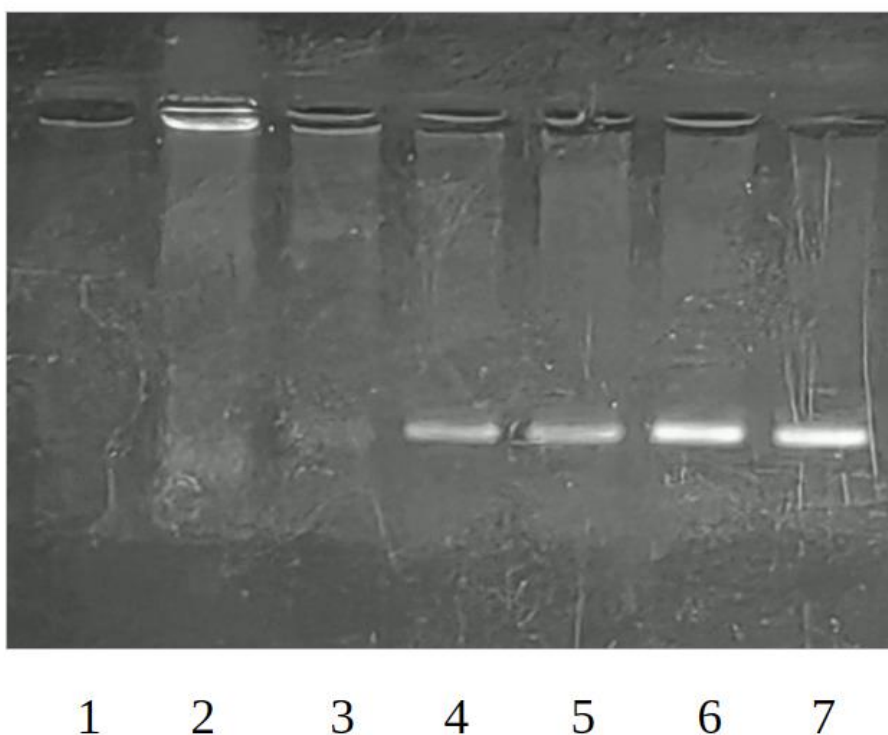


Рис. 3.24. Електрофореграма продуктів ПЛР гена *SMN1*, в 1,6% агарозному гелі: 1 – НТС, 2–7 – зразки з концентраціями **fb128** відповідно 6 мкМ, 3 мкМ, 1,6 мкМ, 0,7 мкМ, 0,2 мкМ та 0,05 мкМ

Порівняльний аналіз впливу довжини амплікону на ефективність ПЛР у реальному часі на двох ДНК-мішенях (фрагменти генів *PMP22* (131 п.н.) та *SMN1* (201 п.н.)) показав, що для обох ампліконів спостерігалася подібна залежність  $C_t$  від концентрації барвника **fb128**. В обох випадках у середньому діапазоні концентрацій барвника реєструвалися стабільні та відносно низькі

значення  $C_t$ , тоді як при крайніх значеннях концентрації (надто високих або надто низьких) спостерігалися відхилення. Водночас, для довшого амплікону (201 п.н.) відзначалася затримка  $C_t$  приблизно на 1,5–2 цикли порівняно з ампліконом 131 п.н.. Так, оптимальні концентрації **fb128** (0,2–0,7  $\mu\text{M}$ ) забезпечували  $C_t \approx 24$  для 201 п.н., тоді як для 131 п.н. у подібному діапазоні концентрацій  $C_t$  становили  $\approx 22,3$ – $22,5$ . Це узгоджується з очікуваним зниженням ефективності ампліфікації при збільшенні довжини амплікону та відображає загальновідомий ефект повільнішого накопичення продукту для довших ДНК-фрагментів. Аналіз кінцевої інтенсивності флуоресценції також виявив подібні закономірності для обох ампліконів. В обох випадках спостерігалася характерна нелінійна залежність: інтенсивність сигналу зростала зі збільшенням концентрації барвника, досягала максимуму в середньому діапазоні концентрацій і зменшувалася при подальшому підвищенні концентрації. Однак для амплікону 201 п.н. спостерігалось незначне зниження максимальної інтенсивності флуоресценції ( $\sim 1500$  в.о.) порівняно з ампліконом 131 п.н. ( $\sim 2100$  в.о.). При цьому для обох ампліконів характерним залишалось формування плато сигналу в оптимальному діапазоні концентрацій. При низьких концентраціях (0,05–0,1  $\mu\text{M}$ ) в обох випадках спостерігалось зниження сигналу, що супроводжувалося затримкою  $C_t$ , незважаючи на наявність продукту ПЛР, що підтверджено електрофорезом. Це вказує на те, що при низьких концентраціях **fb128** обмежувальним фактором є ефективність флуоресцентної детекції, а не ампліфікація ДНК. Для обох ампліконів було виявлено інгібуючий ефект **fb128** при підвищених концентраціях. Однак для амплікону 201 п.н. цей ефект проявлявся більш виражено, що може свідчити про те, що довші амплікони є більш чутливими до інгібуючого впливу барвника, ймовірно через зниження ефективності роботи ДНК-полімерази в умовах підвищеного навантаження барвником. Узагальнюючи результати тестування на двох ампліконах різної довжини (201 п.н., та 131 п.н.), було встановлено, що робочий діапазон концентрацій барвника **fb128** обмежується, з одного боку,

інгібуванням ПЛР при підвищених концентраціях барвника ( $\approx 3-4 \mu\text{M}$ ), а з іншого – зниженням ефективності флуоресцентної детекції при дуже низьких концентраціях ( $0,05-0,1 \mu\text{M}$ ). Враховуючи ці обмеження, найбільш придатний діапазон концентрацій **fb128** для застосування у ПЛР у реальному часі становить приблизно  $0,2-2 \mu\text{M}$ , оскільки в цьому інтервалі забезпечується достатня інтенсивність флуоресцентного сигналу без помітного пригнічення ампліфікації. Для подальших експериментів як робочу концентрацію було обрано  $1 \mu\text{M}$  **fb128**, що відповідає центральній частині визначеного оптимального діапазону.

Отримані результати демонструють, що основні закономірності впливу концентрації **fb128** на параметри ПЛР зберігаються незалежно від довжини амплікону. Зокрема, у середньому діапазоні концентрацій барвник **fb128** забезпечує стабільні  $C_t$  та високий рівень флуоресценції, при низьких концентраціях обмежується ефективність детекції, а при високих концентраціях спостерігається інгібування ПЛР. Отже, можна зробити висновок, що барвник **fb128** демонструє відтворювану та передбачувану поведінку для ампліконів різної довжини, а основні механізми, що визначають сигнал (зв'язування барвника з ДНК та інгібування при високих концентраціях) є універсальними для різних мішеней.

**3.4.3. Аналіз кривої плавлення продуктів ПЛР.** Аналіз кривих плавлення продуктів ПЛР використовували для оцінки специфічності ампліфікації та виявлення можливого утворення неспецифічних продуктів або димерів праймерів. Профілі плавлення ампліконів досліджували після завершення ПЛР у реальному часі при різних умовах реакції, а також при зміні концентрації барвника. Отримані криві плавлення порівнювали для оцінки стабільності ампліфікованих продуктів та характеру взаємодії барвників з дволанцюговою ДНК. На першому етапі було проведено аналіз кривих плавлення з метою

перевірки специфічності ампліфікації при використанні досліджуваного барвника **fb128** у порівнянні зі стандартними барвниками SYBR Green I та EvaGreen.

При використанні барвника **fb128** в концентрації 1  $\mu\text{M}$ , амплікон фрагмента гена *SMN1* розміром 201 п.н. (GC-вміст 29,4%) утворював один чіткий пік плавлення при 74,5°C, тоді як SYBR Green I (1 $\times$ ) генерував пік при 77,0°C (рис. 3.25). Таким чином, температура плавлення амплікона, забарвленого **fb128**, була приблизно на 2,5°C нижчою, ніж у випадку SYBR Green I. Для обох барвників не було виявлено додаткових піків, що свідчить про відсутність неспецифічних продуктів ампліфікації або димерів праймерів. Пік плавлення для **fb128** мав значно більшу амплітуду порівняно з SYBR Green I, в той час як кінцева інтенсивність флуоресценції на кривих ампліфікації хоча і варіювала для обох барвників, але спостерігалася одному діапазоні. Такий більш виражений пік плавлення ймовірно свідчить про покращене співвідношення сигнал/шум при використанні **fb128** у аналізі кривих плавлення.

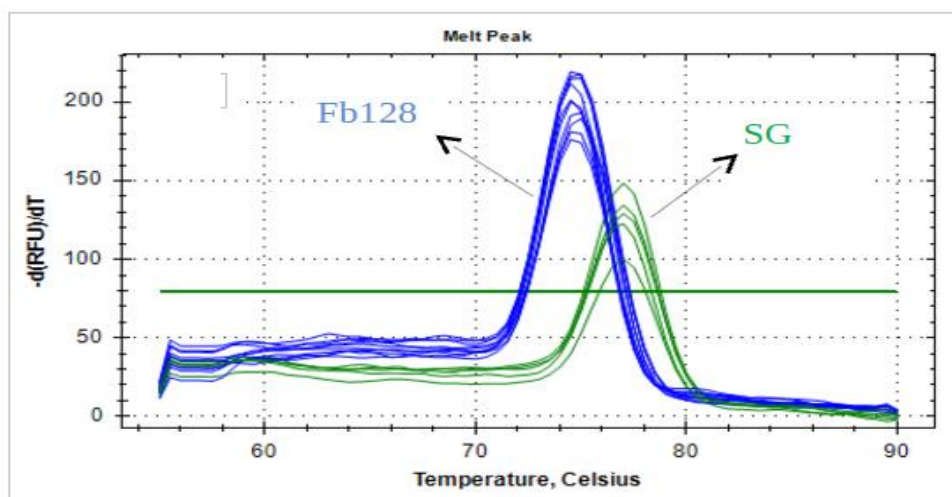


Рис. 3.25. Аналіз кривої плавлення фрагмента гена *SMN1* за допомогою **fb128** та SYBR Green I (SG) для різних початкових концентрацій ДНК у діапазоні 15–50 нг/мкл

Аналогічний аналіз було проведено для другого амплікона – фрагмента гена *PMP22* розміром 131 п.н. (GC-вміст 33,6%), порівняння проводили з комерційним барвником EvaGreen. У цьому випадку при використанні **fb128** спостерігався один виражений пік плавлення при 76°C, тоді як барвник EvaGreen формував пік при 75,5°C. Додаткових піків плавлення також не було виявлено, що підтверджує специфічність ампліфікації для цієї мішені. При цьому пік плавлення, отриманий з **fb128**, характеризувався дещо меншою амплітудою але вузкою формою порівняно з EvaGreen (рис. 3.26).

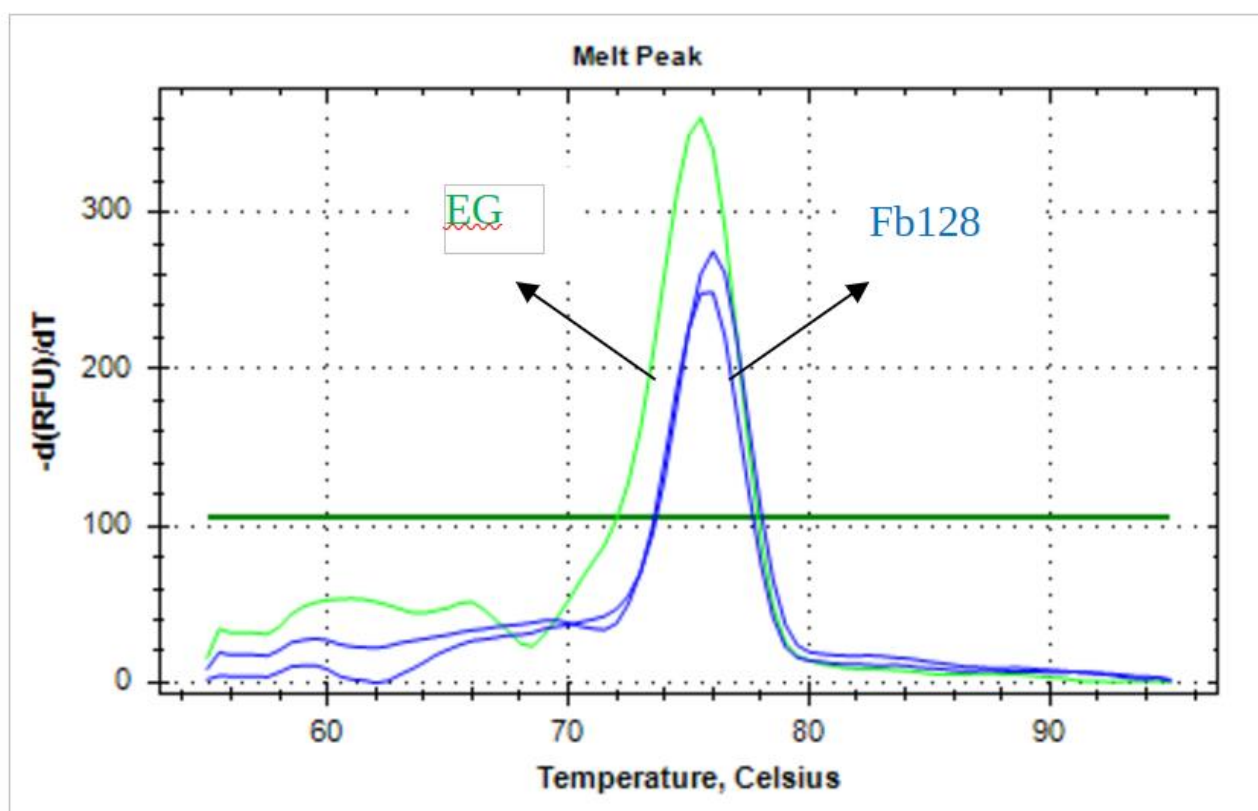


Рис. 3.26. Криві плавлення фрагмента гена *PMP22* з використанням **fb128** та EvaGreen.

Цікаво зазначити, що амплікон фрагменту гена *PMP22*, незважаючи на меншу довжину (131 п.н.) порівняно з ампліконом гена *SMN1* (201 п.н.), демонстрував дещо вищу температуру плавлення. Це можна пояснити вищим GC-вмістом послідовності *PMP22* (33,6% проти 29,4% для *SMN*). Таким чином, у даному випадку вплив GC-вмісту на стабільність дуплексу переважає ефект

довжини амплікона. Варто зазначити, що експериментально визначена температура плавлення для амплікона *RMP22* ( $76^{\circ}\text{C}$ ) добре узгоджується з теоретично очікуваним діапазоном ( $74,7\text{--}76,5^{\circ}\text{C}$ ), розрахованим нами з урахуванням довжини амплікона (131 п.н.) та його GC-вмісту (33,6%). Таким чином, результати аналізу кривих плавлення підтверджують специфічність ампліфікації для обох досліджених мішеней та демонструють узгодженість експериментальних і теоретичних значень температури плавлення.

На наступному етапі було досліджено вплив концентрації флуоресцентного барвника **fb128** на температуру плавлення продуктів ПЛР. Аналіз кривих плавлення показав подібний вплив концентрації барвника **fb128** на температуру плавлення для обох досліджених ампліконів. Для амплікона *SMN1* (201 п.н.) температура плавлення становила  $74,5^{\circ}\text{C}$  при концентраціях барвника  $0,2\text{--}1\ \mu\text{M}$  і зростала до  $75^{\circ}\text{C}$  при  $2\ \mu\text{M}$  (рис. 3.27).

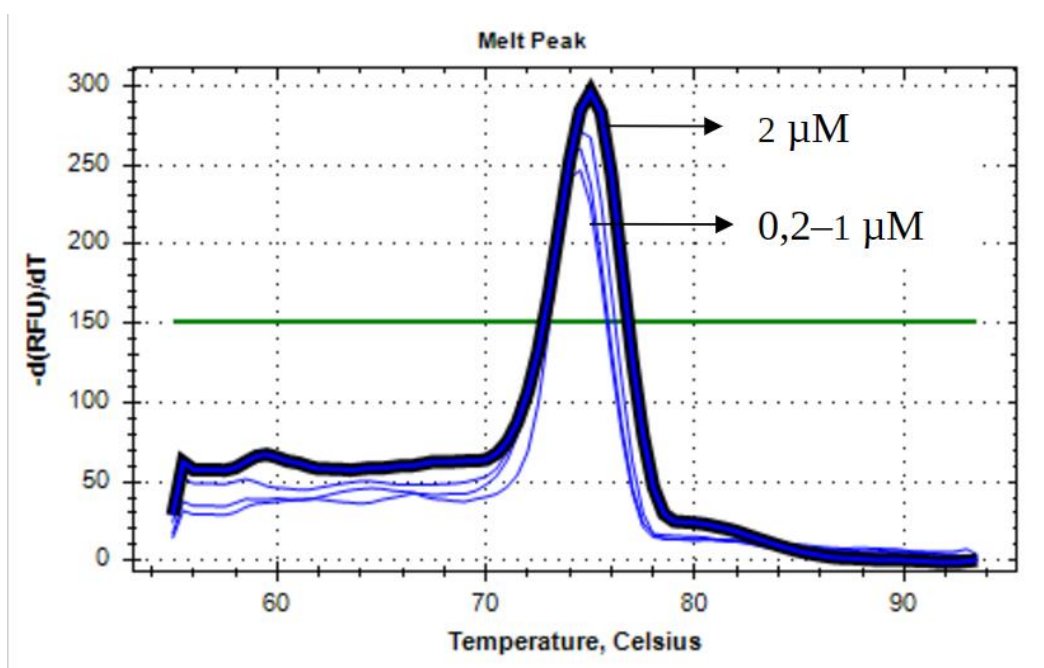


Рис. 3.27. Криві плавлення фрагмента гену *SMN1* з використанням **fb128** при різних концентраціях  $0,2\text{--}2\ \mu\text{M}$

Аналогічну тенденцію було виявлено для амплікона *PMP22* (131 п.н.), для якого  $T_m$  становила  $76^\circ\text{C}$  при концентраціях  $0,2\text{--}1\ \mu\text{M}$  і збільшувалася до  $76,5^\circ\text{C}$  при  $2\ \mu\text{M}$  (рис. 3.28).

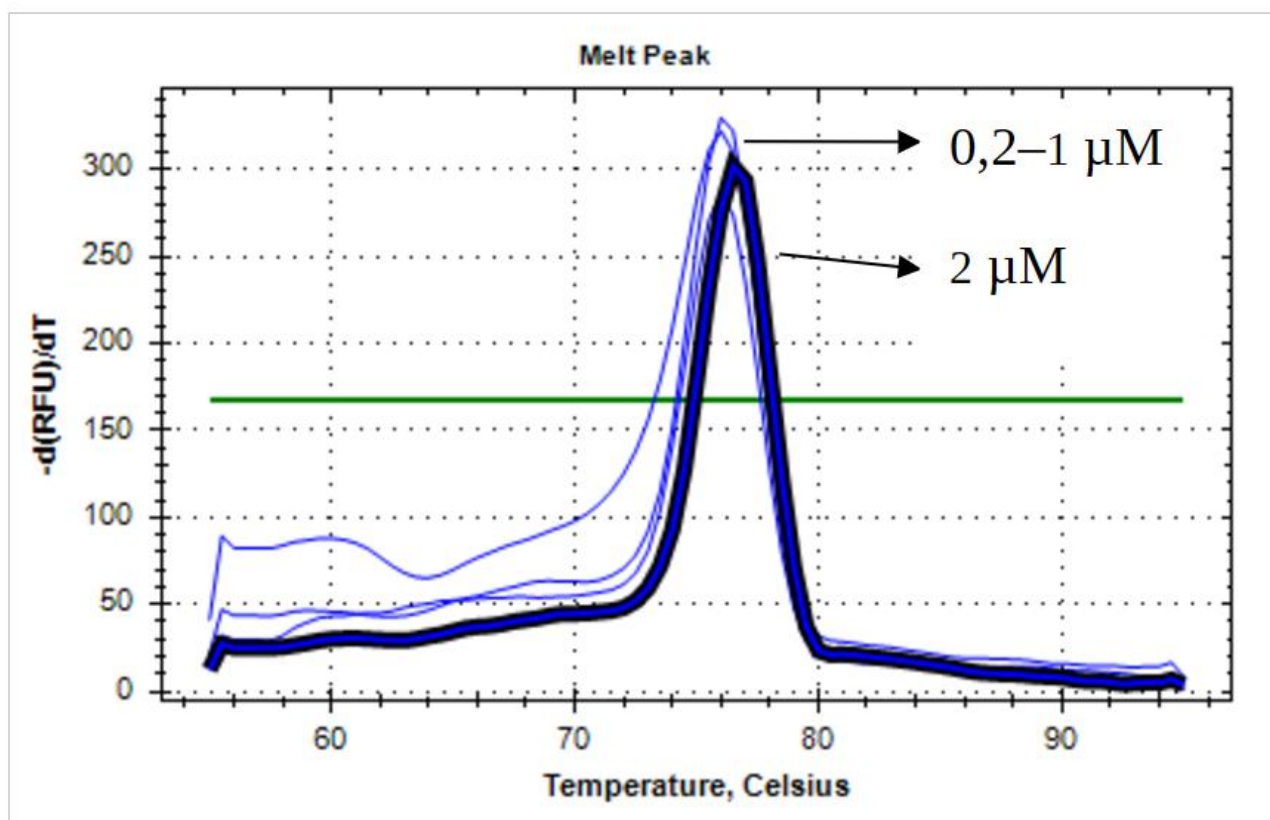


Рис. 3.28. Криві плавлення фрагмента гену *PMP22* з використанням **fb128** при різних концентраціях  $0,2\text{--}2\ \mu\text{M}$

Таким чином, навіть при максимальній дослідженій концентрації **fb128** зміщення температури плавлення не перевищувало  $0,5^\circ\text{C}$ , що свідчить про мінімальний вплив концентрації барвника на положення піку плавлення.

Останнім етапом аналізу кривих плавлення була оцінка здатності методу виявляти можливе утворення неспецифічних продуктів ампліфікації. Під час оптимізації умов ПЛР (зокрема складу буфера) на агарозному гелі в окремих зразках поряд з основним продуктом спостерігалися додаткові фрагменти

більшої молекулярної маси, що свідчило про наявність неспецифічної ампліфікації (рис. 3.29.а).

Аналіз кривих плавлення показав чітку відповідність між електрофоретичними даними та профілями плавлення. Зразки, в яких на гелі виявлявся лише один специфічний продукт, характеризувалися наявністю одного вузького піку плавлення при  $74,7^{\circ}\text{C}$ . Натомість у зразках із неспецифічними продуктами, крім основного піку при  $74,7^{\circ}\text{C}$  (зниженої амплітуди), спостерігався додатковий виражений пік при  $\sim 81^{\circ}\text{C}$ , а також множинні низькоамплітудні піки в діапазоні  $60\text{--}70^{\circ}\text{C}$ , що формували нерегулярний профіль кривої плавлення (рис. 3.29.б).

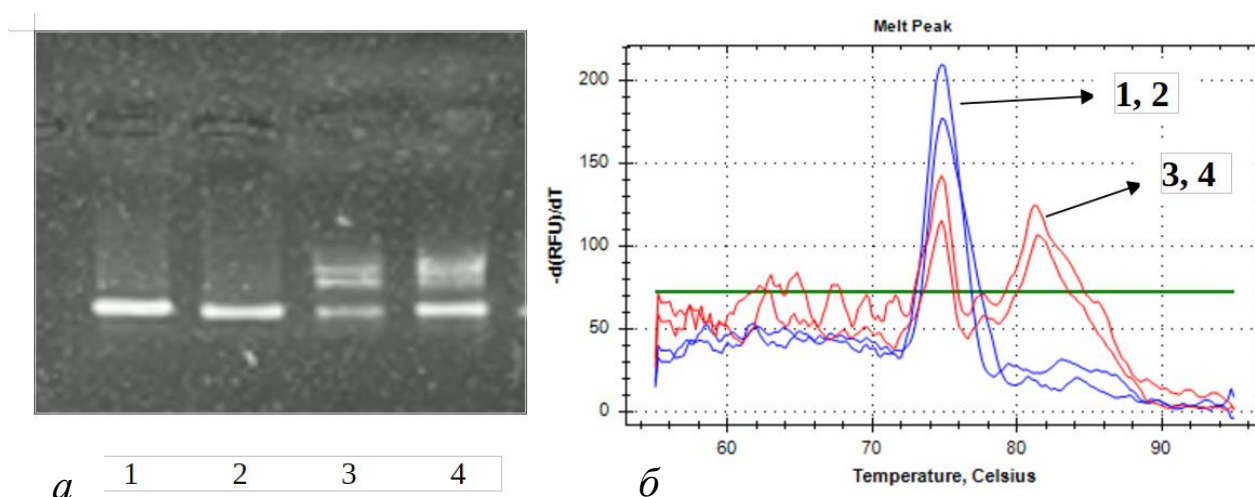


Рис. 3.29. Аналіз специфічності ампліфікації за допомогою електрофорезу в агарозному гелі та кривих плавлення: а) – електрофорез продуктів ПЛР у 1,6% агарозному гелі: 1, 2 – зразки зі специфічним ампліконом (сині), 3, 4 – зразки з додатковими фрагментами більшої молекулярної маси (червоні); б) – відповідні криві плавлення: 1, 2 – зразки зі специфічним продуктом, 3, 4 – зразки з додатковими неспецифічними продуктами

Отримані результати свідчать про те, що флуоресцентний барвник **fb128** дозволяє ефективно детектувати не лише специфічний амплікон, але й додаткові продукти ампліфікації, які відрізняються за довжиною та/або нуклеотидним складом, що проявляється у вигляді окремих піків плавлення з відмінними температурами. Таким чином, **fb128** забезпечує високу інформативність аналізу кривих плавлення та дозволяє надійно ідентифікувати наявність неспецифічної ампліфікації.

**3.4.4. Ефективність ампліфікації та придатність fb128 для кількісної ПЛР.** Заключним етапом дослідження було оцінити можливість застосування барвника **fb128** для кількісної ПЛР у реальному часі. Одним із ключових параметрів, що визначає придатність флуоресцентного барвника для кількісного аналізу, є ефективність ампліфікації, яку зазвичай оцінюють шляхом побудови стандартної кривої залежності значень  $C_t$  від логарифма початкової концентрації ДНК-матриці. Стандартна крива титрування залежить від численних факторів, одним з яких є інтеркаляційний барвник, оскільки він може змінювати активність полімерази та квантовий вихід флуоресценції.

Щоб оцінити вплив барвника **fb128** на ефективність ампліфікації, було проведено аналіз 2-кратних серійних розведень геномної ДНК людини (12,5–100 нг/мкл) методом кількісної ПЛР у реальному часі з використанням 1  $\mu$ M **fb128**. На рис. 3.30 представлено криві ампліфікації фрагмента *PMP22* (131 п.н) у серії розведень (а) та відповідну стандартну криву (б).

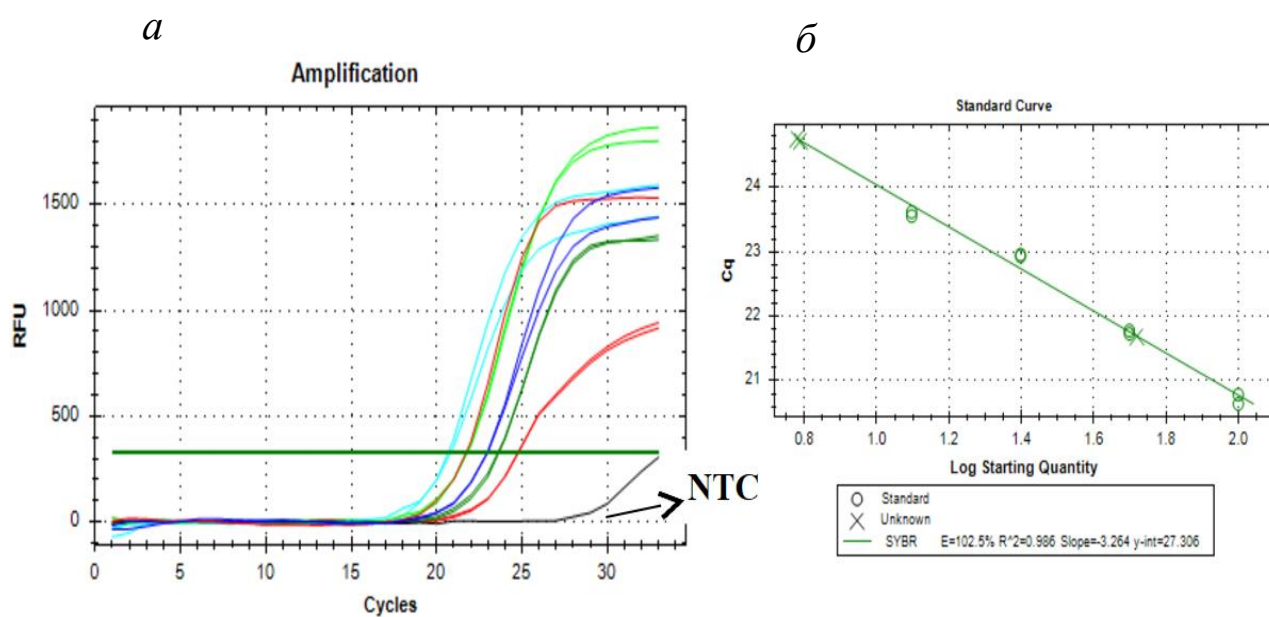


Рис. 3.30. Ампліфікація фрагмента гену *PMP22* в різних серійних розведеннях геномної ДНК людини в діапазоні (12,5–100 нг/мкл), червоним на графіку позначені зразки з “умовно невідомою” концентрацією, NTC – негативний контроль: а – графіки ампліфікації фрагмента гену *PMP22*, NTC – негативний контроль; б – стандартна крива титрування

Побудована стандартна крива характеризувалася високою лінійністю ( $R^2 = 0.986$ ) та ефективністю ампліфікації 102.5%, що відповідає типовим значенням для оптимізованих кПЛР-реакцій. Рівняння лінійної регресії стандартної кривої мало вигляд:

$$C_t = -3.264 \log_{10}(C) + 27.306$$

Відтворюваність  $C_t$ -значень для стандартних зразків була високою: стандартні відхилення становили 0.019–0.102 циклу, що свідчить про добру стабільність ампліфікації у досліджуваному діапазоні концентрацій.

Для додаткової перевірки точності кількісного визначення було проаналізовано три зразки з відомою (“умовно невідомою”) концентрацією ДНК. Порівняння експериментальних  $C_t$ -значень із теоретичними значеннями, розрахованими за рівнянням стандартної кривої, показало лише незначні відхилення ( $\Delta C_t$  від  $-0.08$  до  $0.05$  циклу). Відповідні  $Z$ -показники ( $|Z| \leq 1.36$ ) та  $p$ -значення ( $p > 0.05$ ) свідчать про відсутність статистично значущих відмінностей між експериментальними та очікуваними  $C_t$ -значеннями (табл. 3.9). Варто зазначити, що концентрації контрольних зразків були правильно визначені за допомогою стандартних кривих на основі **fb128**, незважаючи на те, що ці зразки були ампліфіковані в незалежних реакціях із використанням комерційних реагентів для детекції. Зокрема, зразок з концентрацією  $50$  нг/мкл тестувався набором EvaGreen, а з концентрацією ДНК  $6,25$  нг/мкл – набором SYBR Green I, що демонструє міжплатформну сумісність **fb128** для кількісного аналізу.

Таблиця 3.9

Оцінка точності кількісного визначення ДНК за стандартною кривою кПЛР для фрагмента гену *PMP22* у присутності барвника **fb128**

Зразок	Реальна концентрація (нг/мкл)	Визначена концентрація (нг/мкл)	Відносна похибка (%)	$C_{t\text{ obs}}$	$C_{t\text{ calc}}$	$\Delta C_t$	Z	p-value
Unkn-1	50	52,5	5,0	21,69	21,77	-0,08	-1,36	0,17
Unkn-2	6,2	6,16	1,4	24,73	24,71	0,02	0,34	0,73
Unkn-3	6,2	6,02	3,7	24,76	24,71	0,05	0,85	0,4

\* -  $C_{t\text{ obs}}$  - експериментальні  $C_t$ -значення,  $C_{t\text{ calc}}$  – розраховані  $C_t$ -значення

Крім того, визначені концентрації ДНК добре узгоджувалися з реальними значеннями. Відносна похибка кількісного визначення становила лише 1.4–5.0%, що знаходиться значно нижче типової похибки для кПЛР-аналізу. Отримані результати підтверджують високу точність і відтворюваність

кількісного визначення ДНК при використанні барвника **fb128** у досліджених умовах.

Щоб оцінити вплив барвника **fb128** на ефективність ампліфікації фрагмента гена *SMN*, довжина амплікона якого є достатньо великою, було проведено аналіз 1,5-кратних серійних розведень геномної ДНК людини методом кількісної ПЛР у реальному часі з використанням 1  $\mu$ M **fb128**. На рис. 3.31 наведено криві ампліфікації фрагмента *SMN* у серії розведень (а) та відповідну стандартну криву (б).

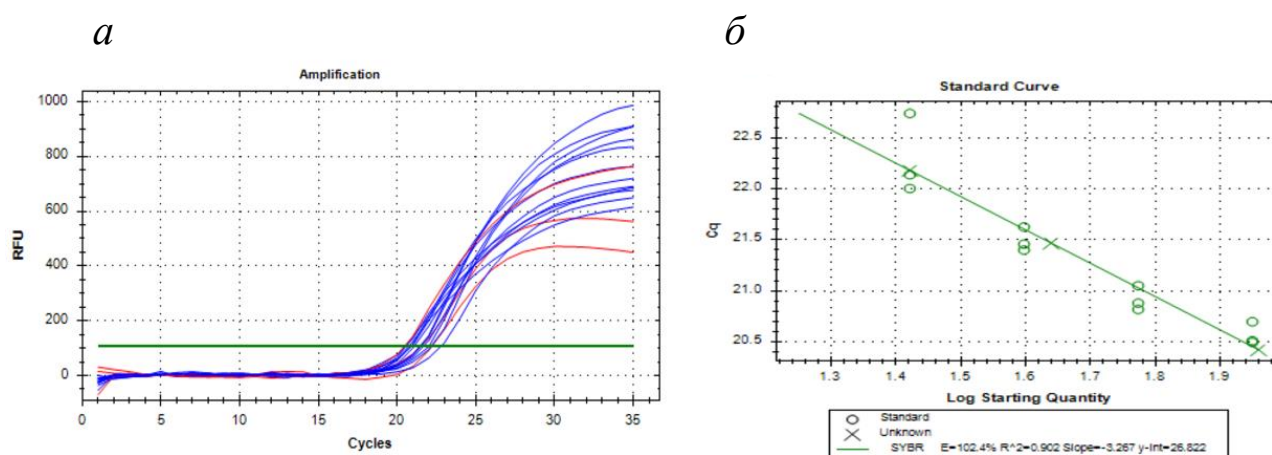


Рис. 3.31. Ампліфікація фрагмента гену *SMN* в різних серійних розведеннях геномної ДНК людини в діапазоні (26,4–89 нг/мкл): а – графіки ампліфікації, червоним на графіку позначені зразки з “умовно невідомою” концентрацією; б – стандартна крива титрування

Отримана стандартна крива характеризувалася ефективністю ампліфікації 102,4% та рівнянням лінійної регресії:

$$Ct = -3.267 \log_{10}(C) + 27.822$$

Коефіцієнт детермінації становив  $R^2 = 0.902$ , що відображає задовільну лінійність залежності  $Ct$  від логарифма початкової концентрації ДНК у

досліджуваному діапазоні розведень. Стандартні відхилення  $C_t$  для контрольних точок становили 0.112–0.120 циклу, тоді як для найнижчої концентрації (26.4 нг/мкл) спостерігалось дещо більше варіювання ( $SD = 0.392$ ), що, ймовірно, пов'язано з більшим стохастичним впливом на ранніх стадіях ампліфікації при нижчих концентраціях матриці.

Для оцінки точності кількісного визначення було проаналізовано три зразки з відомою (“умовно невідомою”) концентрацією ДНК також із використанням комерційного набору SYBR Green I. Порівняння експериментальних  $C_t$ -значень із теоретичними значеннями, розрахованими на основі рівняння стандартної кривої, показало невеликі відхилення ( $\Delta C_t$  від  $-0.14$  до  $-0.01$  циклу). Розраховані  $Z$ -показники ( $|Z| \leq 0.63$ ) та відповідні  $p$ -значення ( $p > 0.05$ ) свідчать про відсутність статистично значущих відмінностей між експериментальними та очікуваними  $C_t$ -значеннями (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

Оцінка точності кількісного визначення ДНК за стандартною кривою кПЛР для фрагмента *SMN1* у присутності барвника **fb128**

Зразок	Реальна к-ть ДНК (ng)	Визначена к-ть ДНК (ng)	Відносна похибка (%)	$C_{t\text{ obs}}$	$C_{t\text{ exp}}$	$\Delta C_t$	Z	p-value
Unkn-1	39,6	43,6	10,1	21,47	21,61	-0,14	-0,63	0,53
Unkn-2	26,4	26,38	0,1	22,18	22,19	-0,01	-0,05	0,96
Unkn-3	89	91	2,5	20,42	20,46	-0,04	-0,18	0,86

\* -  $C_{t\text{ obs}}$  - експериментальні  $C_t$ -значення,  $C_{t\text{ exp}}$  - теоретичні  $C_t$ -значення

Визначені концентрації ДНК добре узгоджувалися з їх реальними значеннями: відносна похибка становила 0.1–10.1%. Найбільше відхилення спостерігалось для зразка з концентрацією 39.6 нг/мкл, однак і воно залишалось в межах прийнятної точності для кількісної ПЛР. У цілому отримані результати підтверджують, що використання **fb128** забезпечує високу ефективність

ампліфікації та достатню точність кількісного визначення ДНК також і для амплікону *SMN1*.

Загалом, аналіз стандартних кривих, отриманих для двох незалежних ампліконів (*PMP22* та *SMN1*), продемонстрував, що монометиновий ціаніновий барвник **fb128** забезпечує ефективну та відтворювану ампліфікацію методом ПЛР у реальному часі. Для обох локусів ефективність ампліфікації була близькою до теоретичного оптимуму (~102%), а спостережувані значення  $S_t$  точно відповідали значенням, передбаченим за регресійними моделями, що свідчить про хорошу узгодженість між експериментальними та очікуваними результатами. Примітно, що нахил стандартних кривих ( $\approx -3,26$ ) був дуже близьким до теоретичного значення  $-3,32$ , яке відповідає 100% ефективності ПЛР, що вказує на перебіг ампліфікації за майже оптимальних умов [106]. Важливо, що концентрації контрольних зразків, визначені за допомогою стандартних кривих, отриманих з використанням **fb128**, добре узгоджувалися з їхніми справжніми значеннями, навіть попри те, що ці контрольні зразки були ампліфіковані в незалежних реакціях з використанням комерційних хімічних реагентів для детекції (SYBR Green I для *SMN1* та EvaGreen і SYBR Green I для *PMP22*). Ця перехресна узгодженість вказує на те, що кількісне калібрування, отримане за допомогою **fb128**, залишається придатним для різних систем флуоресцентного детектування. У сукупності ці результати демонструють, що **fb128** забезпечує кількісну ефективність, порівнянну з широко використовуваними барвниками, такими як SYBR Green I та EvaGreen, що підтверджує його придатність як надійного флуоресцентного репортера для ПЛР у реальному часі та аналізів на основі кривої плавлення.

**3.4.5 Висновки до підрозділу 3.4.** Узагальнюючи отримані результати, можна зробити висновок, що монометиновий барвник **fb128** демонструє сукупність властивостей, необхідних для ефективного використання у ПЛР у

реальному часі. Було встановлено, що оптимальний робочий діапазон його концентрацій становить 0,2–2  $\mu\text{M}$ , у межах якого забезпечується достатня інтенсивність флуоресцентного сигналу без помітного інгібування ампліфікації.

Дослідження впливу концентрації барвника на параметри аналізу кривих плавлення показало, що в межах робочого діапазону **fb128** практично не впливає на температуру плавлення ампліконів, спричиняючи лише незначне підвищення  $T_m$  ( $\approx 0,5^\circ\text{C}$ ) при максимальній дослідженій концентрації. Це свідчить про стабільну взаємодію барвника з дволанцюговою ДНК без істотного спотворення термодинамічних характеристик ампліконів. Аналіз кривих плавлення також показав, що **fb128** дозволяє ефективно виявляти неспецифічні продукти ампліфікації, Таким чином, використання цього барвника забезпечує високу інформативність аналізу кривих плавлення та дозволяє надійно контролювати специфічність ПЛР.

Оцінка ефективності ампліфікації за допомогою стандартних кривих для двох геномних локусів людини (*PMP22* та *SMN1*) показала високу ефективність ПЛР ( $\approx 102\%$ ), причому нахил стандартних кривих ( $\approx -3,26$ ) був дуже близьким до теоретичного значення  $-3,32$ , що відповідає 100% ефективності реакції. Додатковий аналіз «умовно невідомих» зразків продемонстрував високу точність визначення концентрації ДНК із статистично незначущими відхиленнями між експериментальними і розрахунковими значеннями  $C_t$ . Важливо, що концентрації «умовно невідомих» зразків, визначені за допомогою стандартних кривих, побудованих із використанням **fb128**, добре узгоджувалися з даними, отриманими з використанням комерційних SYBR Green та EvaGreen, що свідчить про сумісність та коректність кількісної детекції з використанням **fb128**

Сукупність цих характеристик свідчить про те, що **fb128** є перспективним флуоресцентним інтеркалюючим барвником для застосування у кількісній ПЛР та інших методах аналізу ДНК у реальному часі.

За результатами досліджень опубліковані наступні наукові праці:

Kazakov-Kravchenko O. S., Kravchenko S. A., Yarmoluk S. M. “Evaluation of the monomethine cyanine dye FB128 for real-time PCR applications” *Biopolymers and Cell*, 2025, 41(4), 300; DOI:10.7124/bc.000B2C

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Флуоресцентні ціанінові барвники широко застосовуються як репортерні молекули для детекції біомакромолекул завдяки їх високій молярній екстинкції, чутливості до мікрооточення та здатності до значного підсилення флуоресценції при зв'язуванні з біополімерами [81, 107, 108, 109]. Особливої актуальності ці сполуки набули у методах аналізу нуклеїнових кислот, зокрема у ПЛР у реальному часі, де інтеркаляційні барвники, такі як SYBR Green та EvaGreen, є стандартними інструментами флуоресцентної детекції [110, 111]. У зв'язку з цим актуальним є пошук нових вітчизняних флуоресцентних барвників із оптимізованими фотофізичними та біофізичними властивостями, що потребує встановлення закономірностей взаємозв'язку між структурою молекули, її спектральними характеристиками. Ці дослідження проводилися на першому етапі роботи [112, 113].

На прикладі симетричних триметинових ціанінових барвників продемонстровано вплив природи замісників на спектрально-люмінесцентні характеристики. Відсутність замісника у  $\beta$ -положенні поліметинового ланцюга барвника забезпечує високу інтенсивність флуоресценції як у вільному, так і у зв'язаному з нуклеїновими кислотами стані, однак для досягнення необхідного для детекції приросту інтенсивності флуоресценції при взаємодії з нуклеїновими кислотами – алкільна група  $\beta$ -положенні є необхідним структурним елементом, який знижує інтенсивність власної флуоресценції барвника.

Гідроксильні групи у бензольних фрагментах бензоліазолових ядер надають барвникам перевагу в інтенсивності флуоресценції при взаємодії з нуклеїновими кислотами в порівняно з метоксильними замісниками в аналогічних положеннях, ймовірно за рахунок утворення водневих зв'язків. Довгі N-алкільні замісники можуть підвищувати афінність до білків, селективне зростання флуоресценції таких барвників відбувалось в присутності альбумінів. Показано, що діоксабороновий фрагмент вірогідно збільшує структурну жорсткість хромофора і зменшує безвипромінювальні втрати енергії збудження, однак, водночас не сприяє ефективній взаємодії з нуклеїновими кислотами. Барвники цієї серії демонструють переважно зростання флуоресценції у присутності білків, тоді як у випадку ДНК спостерігається слабка або навіть негативна відповідь, ймовірно через агрегаційні процеси. Таким чином, встановлено їх низьку придатність як флуоресцентних репортерів для детекції нуклеїнових кислот. Натомість, спектрально-люмінесцентні властивості монометинціанінових барвників відзначаються оптимальним балансом між планарністю  $\pi$ -системи та внутрішньомолекулярною рухливістю, що відбивається на спектрально-люмінесцентних характеристиках барвників у вільному стані та в присутності нуклеїнових кислот – вони демонструють як найвищі прирости флуоресценції, так і найвищі абсолютні її значення.

Таким чином, проаналізувавши спектрально-люмінесцентні характеристики низки барвників різноманітної структури – ми зупинились на монометинціанінах з четвертинними амонійним групами в складі N-алкільних замісників і на наступному етапі роботи дослідили функціональну придатність визначених монометинціанінових барвників як флуоресцентних репортерів для ПЛР у реальному часі. [114]. Було показано, що інтеркаляційні барвники впливають на ефективність ПЛР залежно від їх концентрації. Збільшення концентрації призводить до зростання значень  $S_t$  та зниження ефективності ампліфікації, що пов'язано зі стабілізацією ДНК-дуплексу та можливою

взаємодією з ДНК-полімеразою, що узгоджується з літературними даними [93]. Встановлено, що для барвника **fb128**, який проявляв найбільшу інтенсивність в присутності нуклеїнових кислот, оптимальний діапазон концентрацій становить 0,2–2  $\mu\text{M}$ , у якому забезпечується високий рівень флуоресцентного сигналу без суттєвого інгібування. Такі результати узгоджуються з характеристиками комерційних, для яких було описано концентраційно-залежний інгібуючий ефект, а робоча концентрація для барвника **fb128** мала значно ширший оптимальний діапазон в порівнянні з іншими барвниками [91].

Показано, що барвник **fb128** має мінімальний вплив на температуру плавлення ампліконів (до  $\sim 0,5^\circ\text{C}$ ), що свідчить про відсутність суттєвої стабілізації ДНК-дуплексу. Водночас встановлено, що аналіз кривих плавлення дозволяє ефективно виявляти неспецифічні продукти ампліфікації, що проявляється у появі додаткових піків. Такі виявлені характеристики відповідають умовам для проведення аналізу методом плавлення з високою роздільною здатністю (HRM), який широко використовується для виявлення генетичних відмінностей та контролю специфічності ПЛР [115-117].

Показано, що використання **fb128** забезпечує високу ефективність ПЛР ( $\approx 102\text{--}103\%$ ) та лінійну залежність  $C_t$  від логарифма концентрації ДНК. Нахил стандартних кривих ( $\approx -3,26$ ) є близьким до теоретичного значення  $-3,32$ , що відповідає 100% ефективності ампліфікації [10]. Аналіз «умовно невідомих» зразків продемонстрував високу точність визначення концентрації ДНК та відсутність статистично значущих відхилень між експериментальними і розрахунковими значеннями  $C_t$ . Важливо, що отримані результати добре узгоджуються з даними, отриманими із застосуванням комерційних систем SYBR Green та EvaGreen, що свідчить про валідність та відтворюваність кількісної детекції.

Таким чином, встановлено, що спектрально-люмінесцентні властивості ціанінових барвників, їх взаємодія з біомакромолекулами та ефективність у ПЛР у реальному часі визначаються структурною організацією молекули та характером її взаємодії з ДНК. Показано, що монометинціанінові барвники з оптимізованою структурою, зокрема **fb128**, поєднують високу флуоресцентну чутливість, низький інгібуючий ефект та стабільні ампліфікаційні характеристики. Отримані результати узгоджуються з сучасними літературними даними та розширюють уявлення про механізми функціонування ціанінових барвників, формуючи наукове підґрунтя для їх раціонального дизайну як флуоресцентних репортерів у методах молекулярної діагностики.

## ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі досліджено спектрально-люмінесцентні властивості серії ціанінових барвників у вільному стані та в присутності нуклеїнових кислот та білків. Показано, що барвник **fb128** є ефективним флуоресцентним репортером і забезпечує високу чутливість і точність кількісної детекції ДНК за допомогою ПЛР у реальному часі.

1. Показано, як хімічна структура барвників визначає їхні спектрально-люмінесцентні властивості в присутності нуклеїнових кислот та білків. Встановлено, що введення алкільних груп у  $\beta$ -положення поліметинового ланцюга триметинціанінових барвників знижує власну флуоресценцію сполук, водночас забезпечуючи зростання приросту флуоресценції ( $\Delta Q$ ) у присутності нуклеїнових кислот майже на порядок. Показано також, що наявність гідроксильних груп у бензенових фрагментах, порівняно з метоксильними замісниками, суттєво підвищує флуоресцентну відповідь при взаємодії з нуклеїновими кислотами ( $\Delta Q \approx 280$  проти  $\Delta Q \approx 71$ ). Натомість довгі N-алкільні замісники сприяють збільшенню інтенсивності флуоресценції у присутності білків ( $\Delta Q \approx 34\text{--}78$ ), що, ймовірно, зумовлено гідрофобними взаємодіями. Водночас діоксаборонові аддукти мероціанінів, попри високий рівень власної флуоресценції, виявилися малоприслужними для детекції нуклеїнових кислот через незначний приріст інтенсивності флуоресценції ( $\Delta Q \approx 0,8\text{--}3,2$ ) проте інтенсивність флуоресценції в присутності білків значно зростала ( $\Delta Q \leq 62$ ).

2. Встановлено, що найбільші прирости інтенсивності флуоресценції в присутності нуклеїнових кислот продемонстрували монометинціанінові барвники. Серед них виявлено барвник **fb128** як найбільш придатний флуоресцентний репортер для використання у реакціях ПЛР у реальному часі ( $\Delta Q \approx 160$ ,  $I \approx 2000$  в.о.). Оптимальний робочий діапазон концентрацій цього

барвника становить 0,2–2  $\mu\text{M}$ , що забезпечує достатній рівень флуоресцентного сигналу без суттєвого інгібування ампліфікації.

3. Показано, що у робочому діапазоні концентрацій (0,2–2  $\mu\text{M}$ ) **fb128** практично не впливав на температуру плавлення ампліконів. При максимальній концентрації (2  $\mu\text{M}$ ) найбільше підвищення температури плавлення становило близько 0,5°C, що може свідчити про мінімальний вплив барвника на термодинамічні властивості ДНК-дуплексу.

4. Оцінка ефективності ампліфікації за допомогою стандартних кривих для різних ампліконів показала високу ефективність ПЛР ( $\approx 102\text{--}103\%$ ) та хорошу лінійність залежності  $C_t$  від концентрації ДНК, з негативним нахилом стандартних кривих ( $\approx -3,26$ ), що відповідає майже ідеальній ефективності ампліфікації.

5. Аналіз «умовно невідомих» зразків продемонстрував високу точність визначення концентрації ДНК, із статистично незначущими відхиленнями між експериментальними і розрахунковими значеннями  $C_t$ . Важливо, що концентрації «умовно невідомих» зразків, визначені за допомогою стандартних кривих, побудованих із використанням **fb128**, добре узгоджувалися з даними, отриманими на комерційних системах SYBR Green та EvaGreen, що свідчить про коректність кількісної детекції з використанням **fb128**.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mishra, A.; Behera, R.K.; Behera, P.K.; Mishra, B.K.; Behera, G.B. Cyanines during the 1990s: A review. *Chem. Rev.* 2000, 100, 1973–2011.
2. Pronkin, P.G.; Tatikolov, A.S. Photonics of trimethine cyanine dyes as probes for biomolecules. *Molecules* 2022, 27, 6367.
3. Tatikolov, A.S. Polymethine dyes as spectral-fluorescent probes for biomacromolecules. *J. Photochem. Photobiol. C* 2012, 13, 55–90.
4. Soriano, E.; Holder, C.; Levitz, A.; Henary, M. Benzc,d.indolium-containing monomethine cyanine dyes: Synthesis and photophysical properties. *Molecules* 2015, 21, 23.
5. Tredwell, C.J.; Keary, C.M. Picosecond time resolved fluorescence lifetimes of the polymethine and related dyes. *Chem. Phys.* 1979, 43, 307–316.
6. Åberg, U.; Åkesson, E.; Sundström, V. Excited state dynamics of barrierless isomerization in solution. *Chem. Phys. Lett.* 1993, 215, 388–394.
7. Åberg, U.; Åkesson, E.; Alvarez, J.-L.; Fedchenia, I.; Sundström, V. Femtosecond spectral evolution monitoring the bond-twisting event in barrierless isomerization in solution. *Chem. Phys.* 1994, 183, 269–288.
8. Sahyun, M.R.V.; Blair, J.T. Photophysics of a "simple" cyanide dye. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 1997, 104, 179–187.
9. Dietzek, B.; Yartsev, A.; Tarnovsky, A.N. Watching ultrafast barrierless excited-state isomerization of pseudocyanine in real time. *J. Phys. Chem. B* 2007, 111, 4520–4526.
10. Weigel, A.; Pfaffe, M.; Sajadi, M.; Mahrwald, R.; Improta, R.; Barone, V.; Polli, D.; Cerullo, G.; Ernsting, N.P.; Santoro, F. Barrierless photoisomerisation of the "simplest cyanine": Joining computational and femtosecond optical spectroscopies to trace the full reaction path. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012, 14, 13350–13364.
11. Piontkowski, Z.; Mark, D.J.; Bedics, M.A.; Sabatini, R.P.; Mark, M.F.; Detty, M.R.; McCamant, D.W. Excited state torsional processes in chalcogenopyrylium monomethine dyes. *J. Phys. Chem. A* 2019, 123, 8807–8822.

12. Olsen, S.; McKenzie, R.H. Conical intersections, charge localization, and photoisomerization pathway selection in a minimal model of a degenerate monomethine dye. *J. Chem. Phys.* 2009, 131, 234306.
13. Furstenberg, A.; Vauthey, E. Ultrafast excited-state dynamics of oxazole yellow DNA intercalators. *J. Phys. Chem. B* 2007, 111, 12610–12620.
14. Karunakaran, V.; Lustres, J.L.P.; Zhao, L.; Ernsting, N.P.; Seitz, O. Large dynamic Stokes shift of DNA intercalation dye thiazole orange has contribution from a high-frequency mode. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 2954–2962.
15. Zhao, Z.; Cao, S.; Li, H.; Li, D.; He, Y.; Wang, X.; Chen, J.; Zhang, S.; Xu, J.; Knutson, J.R. Ultrafast excited-state dynamics of thiazole orange. *Chem. Phys.* 2022, 553, 111392.
16. Herz, A.H. Aggregation of sensitizing dyes in solution and their adsorption onto silver halides. *Adv. Coll. Interf. Sci.* 1997, 8, 237–298.
17. Shindy, H.A.; El-Maghraby, M.A.; Eissa, F.M. Solvatochromism and halochromism of some furo/pyrazole cyanine dyes. *Chem. Int.* 2021, 7, 39–52.
18. Norden, B.; Tjerneld, F. Optical studies on complexes between DNA and pseudoisocyanine. *Biophys. Chem.* 1977, 6, 31–45.
19. Kaloyanova, S.; Trusova, V.M.; Gorbenko, G.P.; Deligeorgiev, T. Synthesis and fluorescence characteristics of novel asymmetric cyanine dyes for DNA detection. *J. Photochem. Photobiol. A* 2011, 217, 147–156.
20. Silva, G.L.; Ediz, V.; Yaron, D.; Armitage, B.A. Experimental and computational investigation of unsymmetrical cyanine dyes: Understanding torsionally responsive fluorogenic dyes. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 5710–5718.
21. Nygren, J.; Svanvik, N.; Kubista, M. The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. *Biopolymers* 1998, 46, 39–51.
22. Kurutos, A.; Gadjev, N.; Deligeorgiev, T. Synthesis of novel asymmetric monomethine cyanine dyes containing benzoselenazolyl moiety. Fluorescent dsDNA probes. *Acta Sci. Nat.* 2015, 2, 90–98.

23. Fabijanić, I.; Kurutos, A.; Tomašić Paić, A.; Tadić, V.; Kamounah, F.S.; Horvat, L.; Brozovic, A.; Crnolatac, I.; Radić Stojković, M. Selenium-substituted monomethine cyanine dyes as selective G-quadruplex spectroscopic probes with theranostic potential. *Biomolecules* 2023, 13, 128.
24. Šmidlehner, T.; Koščak, M.; Božinović, K.; Majhen, D.; Schmuck, C.; Piantanida, I. Fluorimetric and CD recognition between various ds-DNA/RNA depends on a cyanine connectivity in cyanine-guanidiniocarbonyl-pyrrole conjugate. *Molecules* 2020, 25, 4470.
25. Timtcheva, I.; Maximova, V.; Deligeorgiev, T.; Zaneva, D.; Ivanov, I. New asymmetric monomethine cyanine dyes for nucleic-acid labeling: Absorption and fluorescence spectral characteristics. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2000, 130, 7–11.
26. Eriksson, M.; Härdelin, M.; Larsson, A.; Bergenholtz, J.; Akerman, B. Binding of intercalating and groove-binding cyanine dyes to bacteriophage T5. *J. Phys. Chem. B* 2007, 111, 1139–1148.
27. Carlsson, C.; Larsson, A.; Jonsson, M.; Albinsson, B.; Norden, B. Optical and photophysical properties of the oxazole yellow DNA probes YO and YOYO. *J. Phys. Chem.* 1994, 98, 10313–10321.
28. Larsson, A.; Carlsson, C.; Jonsson, M.; Albinsson, B. Characterization of the binding of the fluorescent dyes YO and YOYO to DNA by polarized light spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 8459–8465.
29. Netzel, T.L.; Nafisi, K.; Zhao, M.; Lenhard, J.R.; Johnson, I. Base-content dependence of emission enhancements, quantum yields, and lifetimes for cyanine dyes bound to double-strand DNA: Photophysical properties of monomeric and bichromophoric DNA stains. *J. Phys. Chem.* 1995, 99, 17936–17947.
30. Mahmood, T.; Paul, A.; Ladame, S. Synthesis and spectroscopic and DNA-binding properties of fluorogenic acridine-containing cyanine dyes. *J. Org. Chem.* 2010, 75, 204–207.

31. Yarmoluk, S.M.; Kovalska, V.B.; Kryvorotenko, D.V.; Balanda, A.O.; Ogul'chansky, T.Y. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XXV. Influence of affinity-modifying groups in the structure of benzothiazol-4-2,6-dimethylpyridinium dyes on the spectral properties of the dyes in the presence of nucleic acids. *Spectrochim. Acta Part A* 2001, 57, 1533–1540.
32. Biver, T.; De Biasi, A.; Secco, F.; Venturini, M.; Yarmoluk, S. Cyanine dyes as intercalating agents: Kinetic and thermodynamic studies on the DNA/Cyan40 and DNA/CCyan2 systems. *Biophys. J.* 2005, 89, 374–383.
33. Biver, T.; Pulzonetti, M.; Secco, F.; Venturini, M.; Yarmoluk, S. A kinetic analysis of cyanine selectivity: CCyan2 and Cyan40 intercalation into poly(dA-dT) x poly(dA-dT) and poly(dG-dC) x poly(dG-dC). *Arch. Biochem. Biophys.* 2006, 451, 103–111.
34. Yarmoluk, S.M.; Lukashov, S.S.; Ogul'chansky, T.Y.; Losytsky, M.Y.; Korniyushyna, O.S. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XXI. Arguments for half-intercalation model of interaction. *Biopolymers (Biospectroscopy)* 2001, 62, 219–227.
35. Glavas-Obrovac, L.; Piantanida, I.; Marazi, S.; MaSić, L.; Timcheva, I.I.; Deligeorgiev, T.G. Minor structural differences of monomethine cyanine derivatives yield strong variation in their interactions with DNA, RNA as well as on their in vitro antiproliferative activity. *Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17, 4747–4755.
36. Zipper, H.; Brunner, H.; Bernhagen, J.; Vitzthum, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32, e103.
37. Schweitzer, C.; Scaiano, J.C. Selective binding and local photophysics of the fluorescent cyanine dye PicoGreen in double-stranded and single-stranded DNA. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2003, 5, 4911–4917.
38. Koba, M.; Szostek, A.; Konopa, J. Limitation of usage of PicoGreen dye in quantitative assays of double-stranded DNA in the presence of intercalating compounds. *Acta Biochim. Pol.* 2007, 54, 883–886.

39. Rengarajan, K.; Cristol, S.M.; Mehta, M.; Nickerson, J.M. Quantifying DNA concentrations using fluorometry: A comparison of fluorophores. *Mol. Vis.* 2002, 8, 416–421.
40. Kolbeck, P.J.; Vanderlinden, W.; Gemmecker, G.; Gebhardt, C.; Lehmann, M.; Lak, A.; Nicolaus, T.; Cordes, T.; Lipfert, J. Molecular structure, DNA binding mode, photophysical properties and recommendations for use of SYBR Gold. *Nucleic Acids Res.* 2021, 49, 5143–5158.
41. Uno, K.; Sugimoto, N.; Sato, Y. N-aryl pyrido cyanine derivatives are nuclear and organelle DNA markers for two-photon and super-resolution imaging. *Nat. Commun.* 2021, 12, 2650.
42. Cosa, G.; Focsaneanu, K.-S.; McLean, J.R.N.; McNamee, J.P.; Scaiano, J.C. Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution. *Photochem. Photobiol.* 2001, 73, 585–599.
43. Rye, H.S.; Glazer, A.N. Interaction of dimeric intercalating dyes with single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23, 1215–1222.
44. Hansen, L.F.; Jensen, L.K.; Jacobsen, J.P. Bis-intercalation of a homodimeric thiazole orange dye in DNA in symmetrical pyrimidine–pyrimidine–purine–purine oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24, 859–867.
45. Spielmann, H.P.; Wemmer, D.E.; Jacobsen, J.P. Solution structure of a DNA complex with the fluorescent bis-intercalator TOTO determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 1995, 34, 8542–8553.
46. Johansen, F.; Jacobsen, J.P. <sup>1</sup>H NMR studies of the bis-intercalation of a homodimeric oxazole yellow dye in DNA oligonucleotides. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 1998, 16, 205–222.
47. Jacobsen, J.P.; Pedersen, J.B.; Hansen, L.F.; Wemmer, D.E. Site selective bis-intercalation of a homodimeric thiazole orange dye in DNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23, 753–760.

48. Timtcheva, I.; Maximov, V.; Deligeorgiev, T.; Gadjev, N.; Drexhage, K.H.; Petkova, I. Homodimeric monomethine cyanine dyes as fluorescent probes of biopolymers. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2000, 58, 130–135.
49. Rye, H.S.; Dabora, J.M.; Quesada, M.A.; Mathies, R.A.; Glazer, A.N. Fluorometric assay using dimeric dyes for double- and single-stranded DNA and RNA with picogram sensitivity. *Anal. Biochem.* 1993, 208, 144–150.
50. Rye, H.S.; Yue, S.; Wemmer, D.E.; Quesada, M.A.; Haugland, R.P.; Mathies, R.A.; Glazer, A.N. Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: Properties and applications. *Nucleic Acids Res.* 1992, 20, 2803–2812.
51. Murade, C.U.; Subramaniam, V.; Otto, C.; Bennink, M.L. Interaction of oxazole yellow dyes with DNA studied with hybrid optical tweezers and fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 2009, 97, 835–843.
52. Reuter, M.; Dryden, D.T.F. The kinetics of YOYO-1 intercalation into single molecules of double-stranded DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, 403, 225–229.
53. Furstenberg, A.; Deligeorgiev, T.G.; Gadjev, N.I.; Vasilev, A.A.; Vauthey, E. Structure–Fluorescence contrast relationship in cyanine DNA intercalators: Towards rational dye design. *Chem. Eur. J.* 2007, 13, 8600–8609.
54. Mikulin, I.; Ljubić, I.; Piantanida, I.; Vasilev, A.; Mondeshki, M.; Kandinska, M.; Uzelac, L.; Martin-Kleiner, I.; Kralj, M.; Tumir, L.-M. Polycationic monomeric and homodimeric asymmetric monomethine cyanine dyes with hydroxypropyl functionality – Strong affinity nucleic acids binders. *Biomolecules* 2021, 11, 1075.
55. Asanuma, H.; Shirasuka, K.; Takarada, T.; Kashida, H.; Komiyama, M. DNA-Dye Conjugates for Controllable H- and J-Aggregation of Cyanine Dyes. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 2217–2223.
56. Norden, B. Linear and circular dichroism of polymeric pseudoisocyanine. *J. Phys. Chem.* 1977, 81, 151–159.

57. Chiriboga, M.; Green, C.M.; Mathur, D.; Hastman, D.A.; Melinger, J.C.; Veneziano, R.; Medintz, I.L.; Díaz, S.A. Structural and optical variation of pseudoisocyanine aggregates nucleated on DNA substrates. *Methods Appl. Fluoresc.* 2023, 11, 014003.
58. Akimov, A.V.; Neukirch, A.J.; Prezhdo, O.V. Chemistry of Excitons in Molecular Aggregates. *Chem. Rev.* 2013, 113, 4496–4565.
59. Ogul'chansky, T.Y.; Losytskyy, M.Y.; Kovalska, V.B.; Yashchuk, V.M.; Yarmoluk, S.M. Interactions of cyanine dyes with nucleic acids. XXIV. Aggregation of monomethine cyanine dyes in presence of DNA and its manifestation in absorption and fluorescence spectra. *Spectrochim. Acta Part A* 2001, 57, 1525–1532.
60. Benvin, A.L.; Creeger, Y.; Fisher, G.W.; Ballou, B.; Waggoner, A.S.; Armitage, B.A. Fluorescent DNA Base-Pair Substitutes Based on Cyanine Dyes. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 2025–2034.
61. Spencer, A.P.; Matsika, S.; Wasielewski, M.R. Proximity-Induced H-Aggregation of Cyanine Dyes on DNA Duplexes. *J. Phys. Chem. A* 2017, 121, 395–404.
62. Zhou, X.; Mandal, S.; Jiang, S.; Lin, S.; Yang, J.; Liu, Y.; Whitten, D.G.; Woodbury, N.W.; Yan, H. Efficient long-range, directional energy transfer through DNA templated dye aggregates. *J. Am. Chem. Soc.* 2019, 141, 8473–8481.
63. Armitage, B.A. Cyanine Dye–DNA Interactions: Intercalation, Groove Binding, and Aggregation. *Top. Curr. Chem.* 2005, 253, 55–76.
64. Yarmoluk, S.M.; Kryvorotenko, D.V.; Balanda, A.O.; Losytskyy, M.Y.; Kovalska, V.B. Proteins and cyanine dyes. Part III. Synthesis and spectroscopic studies of benzothiazolo-4-1,2,6-trimethylpyridinium. monomethine cyanine dyes for fluorescent detection of bovine serum albumin in solutions. *Dye. Pigment.* 2001, 51, 41–49.
65. Berlepsch, H.; Brandenburg, E.; Koksche, B.; Bottcher, C. Peptide adsorption to cyanine dye aggregates revealed by cryotransmission electron microscopy. *Langmuir* 2010, 26, 11452–11460.

66. Slavnova, T.O.; Görner, H.; Chibisov, A.K. Cyanine-based J-aggregates as a chirality-sensing supramolecular system. *J. Phys. Chem. B.* 2011, 115, 3379–3384.
67. Volkova, K.D.; Kovalska, V.B.; Balanda, A.O.; Vermeij, R.J.; Subramaniam, V.; Slominskii, Y.L.; Yarmoluk, S.M. Cyanine dye– protein interactions: Looking for fluorescent probes for amyloid structures. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2007, 70, 727–733.
68. Volkova, K.D.; Kovalska, V.B.; Balanda, A.O.; Losytskyy, M.Y.; Golub, A.G.; Vermeij, R.J.; Subramaniam, V.; Tolmachev, O.I.; Yarmoluk, S.M. Specific fluorescent detection of fibrillar  $\beta$ -synuclein using mono- and trimethine cyanine dyes. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 1452–1459.
69. Volkova, K.D.; Kovalska, V.B.; Segers-Nolten, G.M.; Veldhuis, G.; Subramaniam, V.; Yarmoluk, S.M. Explorations of the application of cyanine dyes for quantitative  $\beta$ -synuclein detection. *Biotech Histochem.* 2009, 84, 55–61.
70. Volkova, K.D.; Kovalska, V.B.; Losytskyy, M.Y.; Veldhuis, G.; Segers-Nolten, G.M.J.; Tolmachev, O.I.; Subramaniam, V.; Yarmoluk, S.M. Studies of interaction between cyanine dye T-284 and fibrillar alpha-synuclein. *J. Fluor.* 2010, 20, 1267–1274.
71. Zhytniakivska, O.; Tarabara, U.; Kurutos, A.; Vus, K.; Trusova, V.; Gorbenko, G. Interaction of novel monomethine cyanine dyes with proteins in native and amyloid states. *East Eur. J. Phys.* 2022, 2, 124–132.
72. Vus, K.; Tarabara, U.; Balklava, Z.; Nerukh, D.; Stich, M.; Laguta, A.; Vodolazkaya, N.; Mchedlov-Petrossyan, N.O.; Farafonov, V.; Kriklya, N.; et al. Association of novel monomethine cyanine dyes with bacteriophage MS2: A fluorescence study. *J. Mol. Liq.* 2020, 302, 112569.
73. Mudliar, N.H.; Dongre, P.M.; Singh, P.K. An efficient J-aggregate based fluorescence turn-on and ratiometric sensor for heparin. *Sens. Actuators B Chem.* 2019, 301, 127089.
74. Zanotti, K. J.; Silva, G. L.; Creeger, Y.; Robertson, K. L.; Waggoner, A. S.; Berget, P. B.; Armitage, B. A. Blue fluorescent dye-protein complexes based on

fluorogenic cyanine dyes and single chain antibody fragments. *Org. Biomol. Chem.* 2011, 9, 1012–1020.

75. Özhalici-Ünal, H.; Pow, C. L.; Marks, S. A.; Jesper, L. D.; Silva, G. L.; Shank, N. I.; Jones, E. W.; Burnette, J. M.; Berget, P. B.; Armitage, B. A. A Rainbow of Fluoromodules: A Promiscuous scFv Protein Binds to and Activates a Diverse Set of Fluorogenic Cyanine Dyes. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 12620–12621.

76. Shank, N. I.; Zanotti, K. J.; Lanni, F.; Berget, P. B.; Armitage, B. A. Enhanced photostability of genetically encodable fluoromodules based on fluorogenic cyanine dyes and a promiscuous protein partner. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 12960–12969.

77. Bermingham N, Luettich K. Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology.* 2003; 9(3):159–64.

78. Maksymchuk O, Gerashchenko G, Rosohatska I, et al., and Kashuba V. Cytochrome P450 genes expression in human prostate cancer. *Mol Genet Metab Rep.* 2024; 38:101049.

79. Sun L, Wang L, Zhang C, et al., and Peng J. Rapid Detection of Predominant SARS-CoV-2 Variants Using Multiplex High-Resolution Melting Analysis. *Microbiol Spectr.* 2023; 11(3):e0005523.

80. Karelov AV, Borzykh OI, Kozub NO, et al., and Blume YaB. Current Approaches to Identification of Fusarium Fungi Infecting Wheat. *Cytol Genet.* 2021; 55:433–46.

81. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta.* 2015; 439:231–50.

82. Josefsen MH, Löfström C, Sommer HM, Hoorfar J. Diagnostic PCR: comparative sensitivity of four probe chemistries. *Mol Cell Probes.* 2009; 23(3–4):201–3.

83. Arikawa E, Sun Y, Wang J, et al., and Yang J. Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC Genomics.* 2008; 9:328.

84. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 1998; 24(6):954–62.
85. Bengtsson M, Karlsson HJ, Westman G, Kubista M. A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31(8):e45.
86. Gudnason H, Dufva M, Bang DD, Wolff A. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35(19):e127.
87. Mao F, Leung WY, Xin X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol*. 2007; 7:76.
88. Kulyk O, Krivoshey A, Kolosova O, et al., and Tatarets A. Nucleic acid-binding bis-acridine orange dyes with improved properties for bioimaging and PCR applications. *J Mater Chem B*. 2024; 12(46):11968–82.
89. Liew, M.; Pryor, R.; Palais, R.; Meadows, C.; Erali, M.; Lyon, E.; Wittwer, C.T. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin. Chem*. 2004, 50, 1156–1164.
90. Wittwer, C.T.; Reed, G.H.; Gundry, C.N.; Vandersteen, J.G.; Pryor, R.J. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin. Chem*. 2003, 49, 853–860.
91. Eischeid, A.C. SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Res. Notes* 2011, 4, 263.
92. Sidstedt, M.; Jansson, L.; Nilsson, E.; Noppa, L.; Forsman, M.; Rådström, P.; Hedman, J. Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time PCR. *Anal. Biochem*. 2015, 487, 30–37.
93. Sidstedt, M.; Rådström, P.; Hedman, J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Anal. Bioanal. Chem*. 2020, 412, 2009–2023.

94. *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11th Edition, Iain Johnson, Michelle T.Z. Spence Eds., 2010, Published by Life Technologies.
95. Ogul'chansky TYu, Yashchuk VM, Losytskyy MYu, et al., and Yarmoluk SM. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XVII. Towards an aggregation of cyanine dyes in solutions as a factor facilitating nucleic acid detection. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2000; 56(4):805—14.
96. Emerson ES, Conlin MA, Rosenoff AE, et al., and Bird GR. Geometrical Structure and Absorption Spectrum of a Cyanine Dye Aggregate. *J Phys Chem.* 1967; 71(8):2396—403.
97. West W, Pearce S. The Dimeric State of Cyanine Dyes. *J Phys Chem.* 1965; 69(6):1894—903.
98. Lee LG, Chen CH, Chiu LA. Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry.* 1986; 7(6):508—17.
99. Herz AH. Dye-Dye Interactions of Cyanines in Solution and at AgBr Surfaces. *Photogr Sci Eng.* 1974; 18(3):323—35.
100. Polishchuk V, Stanko M, Kulinich A, Shandura M. D- $\pi$ -A- $\pi$ -D Dyes with a 1,3,2 Dioxaborine Cycle in the Polymethine Chain: Efficient Long-Wavelength Fluorophores. *Eur J Org Chem.* 2018; 2018(2):240—6.
101. Polishchuk V, Kulinich A, Suikov S, et al., and Shandura M. 'Hybrid' mero-anionic polymethines with a 1,3,2-dioxaborine core. *New J Chem.* 2022; 46:1273—85.
102. Polishchuk V, Kulinich A, Rusanov E, Shandura M. Highly Fluorescent Dianionic Polymethines with a 1,3,2-Dioxaborine. *J Org Chem.* 2021; 86:5227—33.
103. S.M. Yarmoluk, V.B. Kovalska, M.Y. Losytskyy. Symmetric cyanine dyes for detecting nucleic acids // *Biotechnic and Histochemistry.* – 2008. – V.83, Iss.3-4. – P.131-145.

104. W. West, S. Pearce, F. Grum. Stereoisomerism in cyanine dyes--meso-substituted thiacyanines // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1967. – 71, 5. – P.1316-1326.
105. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al., and Wittwer CT. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 2009; 55(4):611–622.
106. Rutledge RG, Stewart D. A kinetic-based sigmoidal model for the polymerase chain reaction and its application to high-capacity absolute quantitative real-time PCR. Published. 8 May 2008.
107. Ahmad A.I., Ghasemi J.B. New unsymmetrical cyanine dyes for real-time thermal cycling. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007; 389:983–988.
108. Zhu, C.; Fang, H.; Ma, H.; Xue, J.; Li, Z.; Wu, X.; Luo, G. A novel method for high-sensitivity detection of SARS-CoV-2 using dual double-quenched fluorescence probes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2024, 88(8), 892–899.
109. Iungin, O.; Potters, G.; Kalinichenko, O.; Prekrasna-Kviatkovska, Y.; Moshynets, O.; Kazakov-Kravchenko, O.; Sidorenko, M.; Okhmat, O.; Mickevičius, S. Temperature-Dependent Biofilm Development in Antarctic Endophytic Microbial Communities. *Microorganisms* 2026, 14(3), 580.
110. Khan, S.A.; Sung, K.; Nawaz, M.S. Detection of *aacA-aphD*, *qacEd1*, *marA*, *floR*, and *tetA* genes from multidrug-resistant bacteria: Comparative analysis of real-time multiplex PCR assays using EvaGreen® and SYBR® Green I dyes. *Mol. Cell. Probes* 2011, 25, 78–86.
111. Li, H.; Fu, C.; Xie, P.; Gao, W.; Mu, Z.; Xu, L.; Han, Q.; Sha, S. Development and Comparison of Visual Colorimetric Endpoint LAMP and Real-Time LAMP-SYBR Green I Assays for *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl in European Plum. *J. Fungi* 2026, 12(1), 56.
112. Kazakov-Kravchenko, O.S.; Balanda, A.O.; Losytskyy, M.Yu.; Yarmoluk, S.M. Effect of DNA, RNA and HSA on the spectral-luminescent properties of several monomethine cyanine dyes. *Biopolymers and Cell* 2025, 41(2).

113. Kazakov-Kravchenko, O.S.; Losytskyy, M.Yu.; Polishchuk, V.M.; Kulinich, A.V.; Shandura, M.P.; Yarmoluk, S.M. Spectral-fluorescent response of dioxaborine dyes with varying chromophore charge in the presence of serum albumins. *Biopolymers and Cell* 2025, 41(3).
114. Kazakov-Kravchenko, O.S.; Kravchenko, S.A.; Yarmoluk, S.M. Evaluation of the monomethine cyanine dye FB128 in real-time PCR applications. *Biopolymers and Cell* 2025, 41(4).
115. Kim, N.; Kwon, J.-S.; Kang, W.-H.; Yeom, S.-I. High-Resolution Melting (HRM) Genotyping. *Methods Mol. Biol.* 2023, 2638.
116. Muneeswaran, K.; Branavan, U.; de Silva, V.A.; Dayabandara, M.; Hanwella, R.; Chandrasekharan, N.V. Genotyping SNPs and Indels: A method to improve the scope and sensitivity of High-Resolution Melt (HRM) analysis based applications. *Clin. Chim. Acta* 2024, 562, 119897.
117. Ahmadi, O.; Sharifi, Y.; Saeed, M.; Reihani, A.; Shamsian, S.A.; Moghaddas, E.; Mirahmadi, H.; Etemadi, S.; Fotouhi-Ardakani, R.; Zarean, M. Optimization of the real-time PCR platform method using high-resolution melting analysis and comparison with sequencing and phylogenetic analysis for developing optimal malaria diagnostic methods. *Sci. Rep.* 2025, 15, 34360.
118. Pfaffl, M.W. Quantification strategies in real-time polymerase chain reaction. *Quantitative Real-Time PCR: Applications in Microbiology*, 2012, 53–62.
119. Bustin, S.A.; van den Hoff, M.J.B.; Pfaffl, M.W.; Kubista, M.; Ruijter, J.M. Quantification Revisited: What qPCR Efficiency Models Reveal About Data Analysis Integrity. *Int. J. Mol. Sci.* 2026, 27(5), 2337.

## ДОДАТОК А

### ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Kazakov-Kravchenko O. S., Balanda A., Losytskyy M., Yarmoluk S. “Effect of DNA, RNA and HSA on the spectral-luminescent properties of several monomethine cyanine dyes” *Biopolymers and Cell*, 2025, 41(2), 121-129; <https://doi.org/10.7124/bc.000B16> .

2. Kazakov-Kravchenko O. S., Losytskyy M., Polishchuk V. M., Kulinich A. V., Shandura M.P., Yarmoluk S. “Spectral-fluorescent response of dioxaborine dyes with varying chromophore charge in the presence of serum albumins” *Biopolymers and Cell*, 2025; 41(3); 222-230; <https://doi.org/10.7124/bc.000B1A>

3. Kazakov-Kravchenko O. S., Kravchenko S. A., Yarmoluk S. M. “Evaluation of the monomethine cyanine dye FB128 for real-time PCR applications” *Biopolymers and Cell*, 2025, 41(4), 300 -308. <https://doi.org/10.7124/bc.000B2C>

4. Kazakov-Kravchenko O.S., Losytskyy M.Yu., Derevyanko N.A., Kulinich A.V., Shandura M.P., Yarmoluk S.M. (2026) Substituent effects in thiocarbocyanine dyes on their spectral-fluorescent response in the presence of nucleic acids and serum albumins. *Biopolymers & Cell*, 2(42), 139-149. <https://doi.org/10.7124/bc.000B39>

5. Kazakov-Kravchenko O. S., Yarmoluk S. M. Fluorescent properties of 1,3,2-dioxaborine polymethine dyes upon interaction with albumins. *Book of Abstracts of the VIII International (XVIII Ukrainian) Scientific Conference for Students and Young Scientists “Current Chemical Problems”*, March 25–27, 2025, Vinnytsia, Ukraine, P. 30.

6. Kazakov-Kravchenko O. S., Polishchuk V. M., Shandura M. P., Yarmoluk S. M. Spectral-luminescent properties of cyanine dyes for nucleic acid detection.

Abstracts of the IX International (XIX Ukrainian) Scientific Conference for Students, Postgraduates and Young Scientists “Current Chemical Problems” (CCP-2026), March 24–26, 2026, Vinnytsia, Ukraine, P. 1

## ДОДАТОК Б

Спектри флуоресценції барвників записані у буфері, ДМСО та з додаванням ДНК та ЛСА. Флуоресценцію збуджували при максимумі поглинання барвників

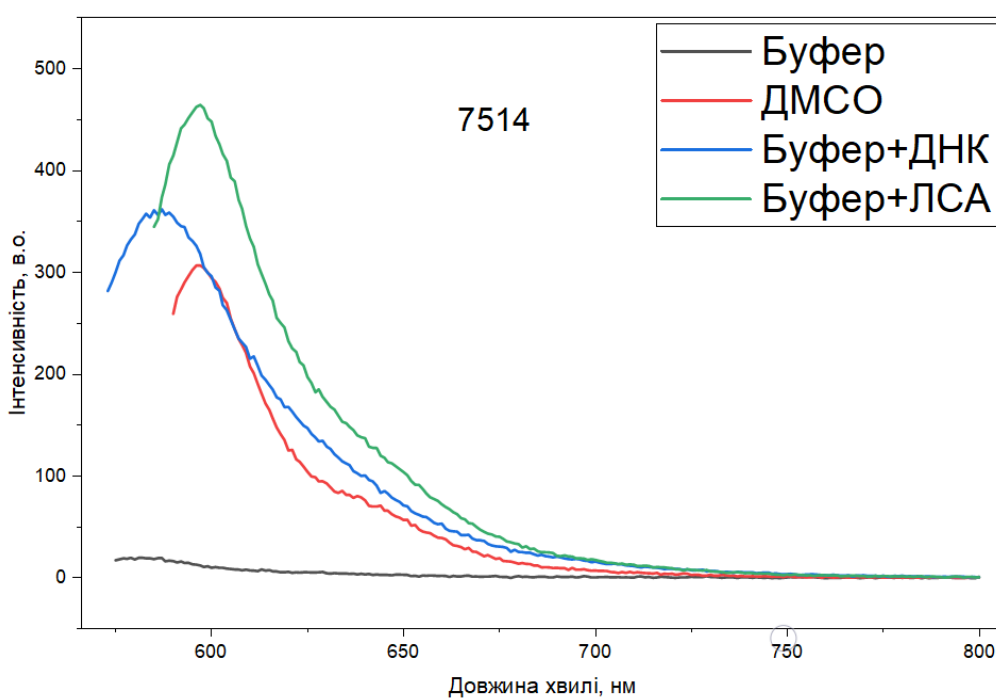


Рис. Б.1. Спектр флуоресценції барвника 7514

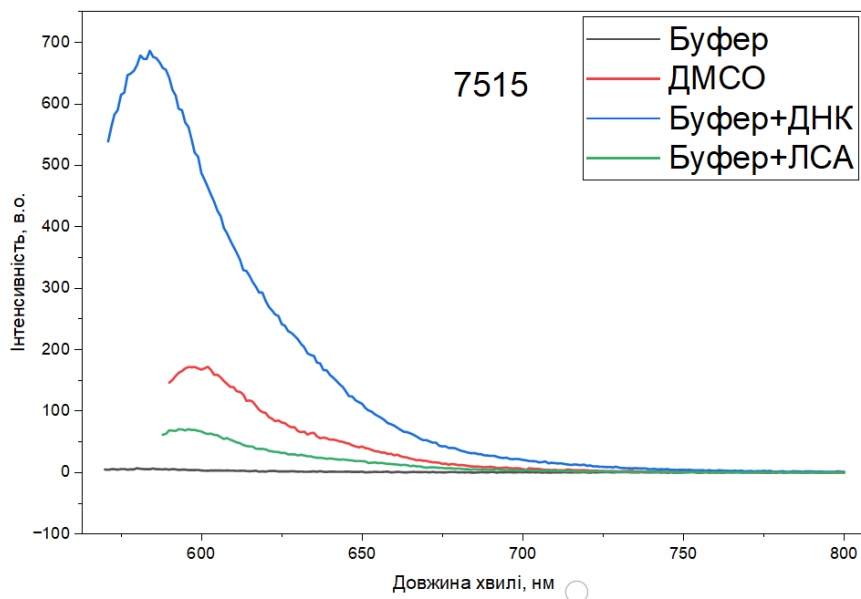


Рис. Б.2. Спектр флуоресценції барвника **7515**

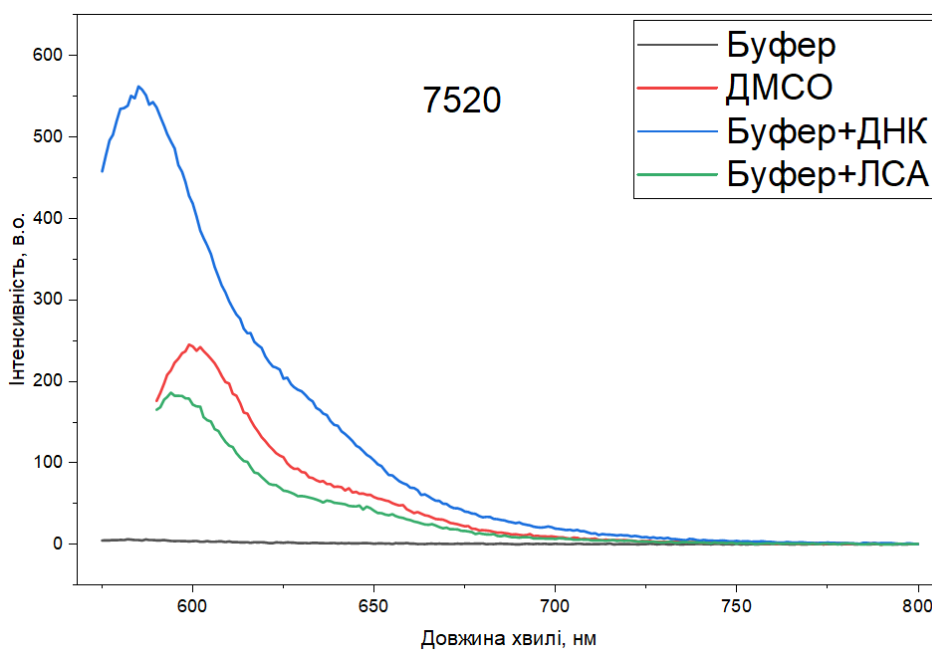
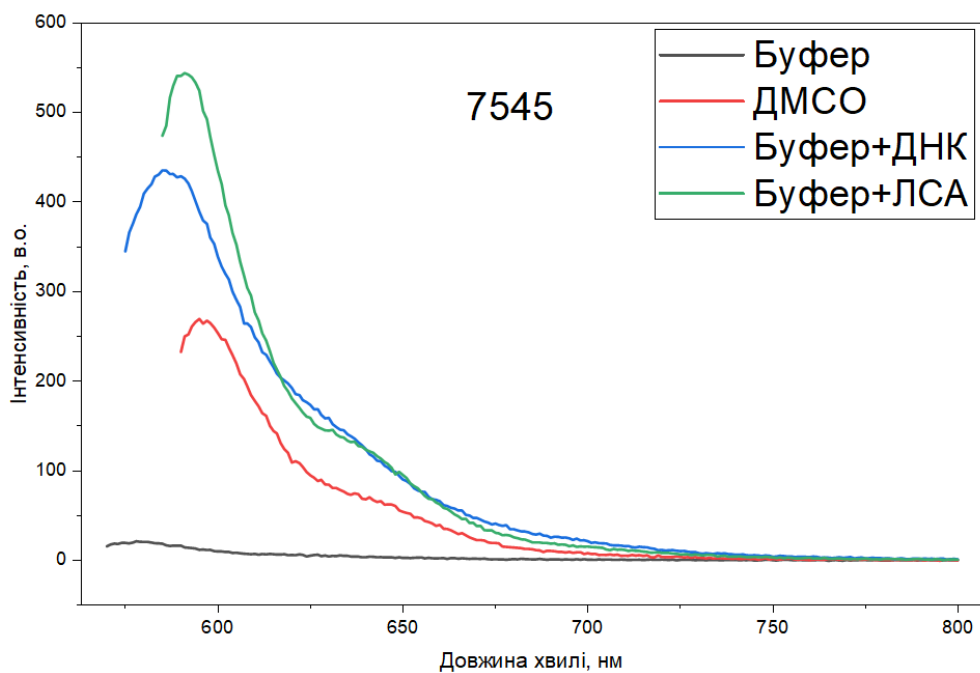
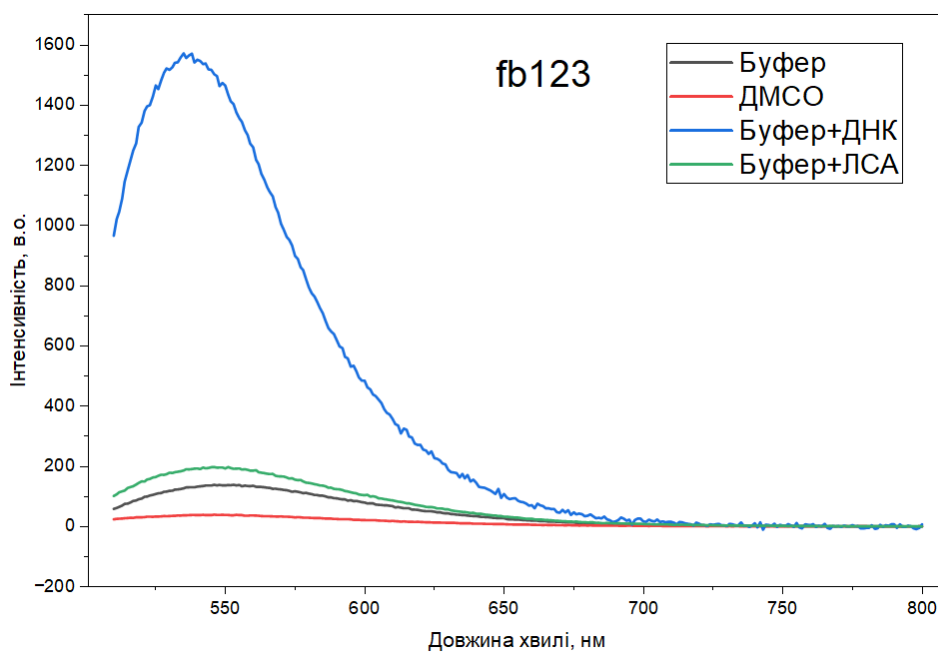


Рис. Б.3. Спектр флуоресценції барвника **7520**

Рис. Б.4. Спектр флуоресценції барвника **7545**Рис. Б.5. Спектр флуоресценції барвника **fb123**

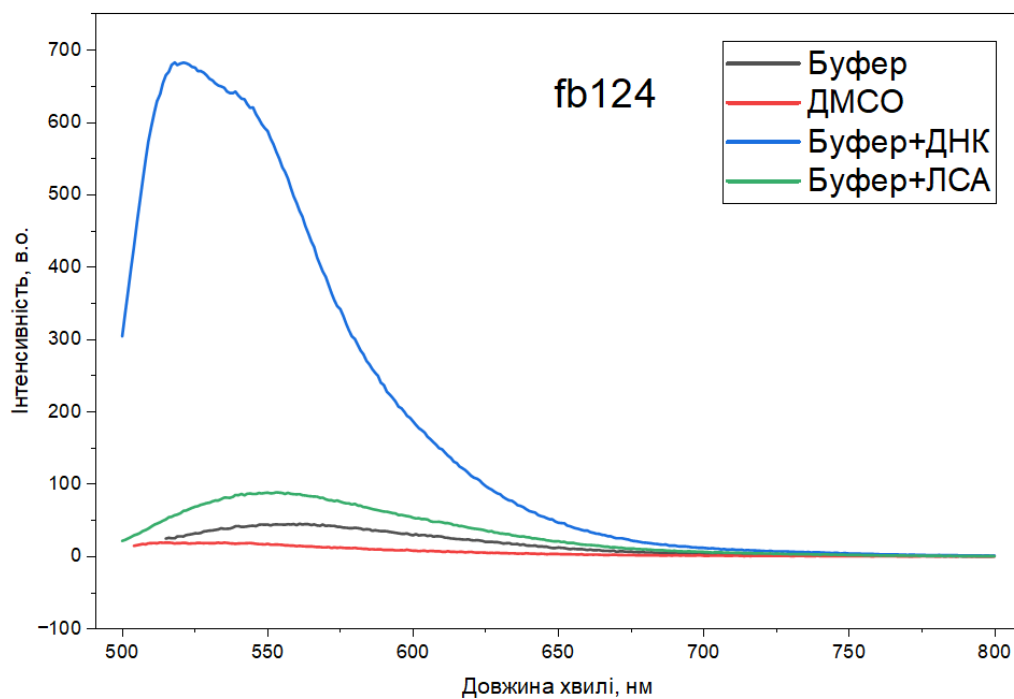


Рис. Б.6. Спектр флуоресценції барвника **fb124**

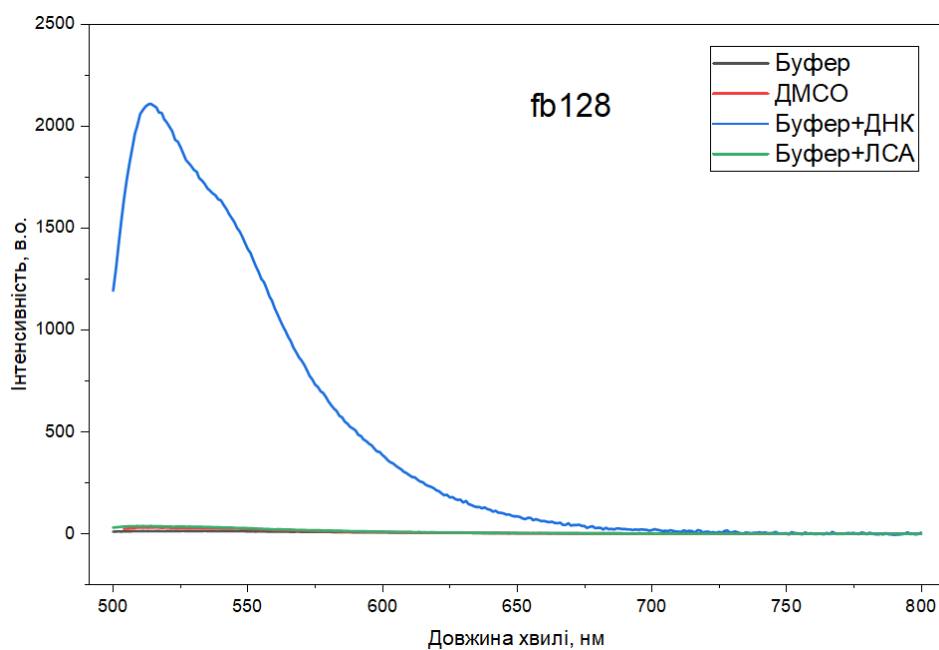


Рис. Б.7. Спектр флуоресценції барвника **fb128**

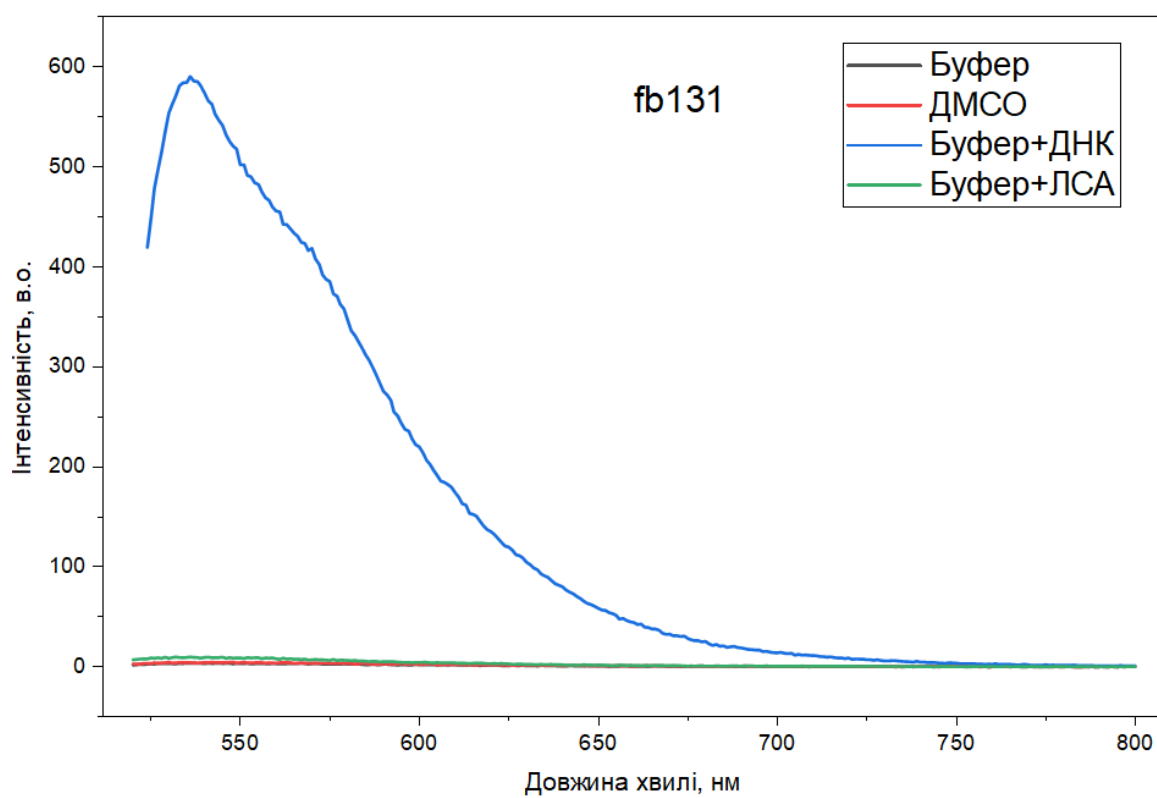


Рис. Б.8. Спектр флуоресценції барвника **fb131**