

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ФОТОДИНАМІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРИРОДНИХ БАРВНИКІВ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ РОСЛИН РОДУ *HERACLEUM*

О.В. Павлючок -Гогерчак, В.В. Стецович, М.І. Суховія

Ужгородський національний університет, фізичний факультет,
88000 Україна, м. Ужгород, вул. Волошина, 54.

УДК 577.346: 543.556

*Спектральними методами досліджено природу і активність речовин, виділених із *Heracleum sosnowskyi* Manden. Вивчення кінетики взаємодії природних барвників із нуклеїновими кислотами виявило зміни структури ДНК.*

Ключові слова: лазерне випромінювання, фотодинамічний ефект, *Heracleum sosnowskyi*, кумарини.

Вступ

Дослідження фотобіологічних явищ, в основі яких лежить регуляція світлом процесів життєдіяльності організмів, є одним із актуальних напрямків сучасної біології і медицини. Інтерес до даної проблеми викликаний, насамперед, тим, що пізнання молекулярних основ фотовпливу сприяє з'ясуванню механізмів, які зумовлюють в біологічних системах підсилення зовнішнього сигналу і його наступну реалізацію у вигляді певної фізіологічної відповіді. З іншого боку, вивчення природи фотодії необхідне для вирішення низки практичних завдань, включаючи регуляцію світлом росту і розвитку організмів, а також пошук шляхів ефективного використання випромінювання в медичній практиці. Впровадження у фотобіологічні дослідження джерел лазерного випромінювання призводить до необхідності врахування нелінійних ефектів [7,8]. Унікальні властивості лазерного випромінювання дозволяють реалізувати багатофотонні фотобіологічні процеси, в основі яких лежить поглинання молекулою фотосенсибілізатора квантів світла і збудження її у вищі енергетичні стани. Енергія цих станів, будучи передана молекулам біологічного субстрату, здатна викликати в них серйозні зміни, в тому числі й розриви ковалентних зв'язків. Ініціювання селективних фізико-хімічних процесів з участю цих станів при двоквантовому збудженні широко використовується на практиці, наприклад у фотодинамічній терапії [2, 4], генній та клітинній інженерії [1, 3, 5].

На сьогодні відомо багато барвників, які з'єднуються з різними клітинними структурами і, поглинаючи світло, можуть сенсibiliзувати їх фотопшкодження [4, 6].

Актуальним є вивчення фотосенсибілізуючої активності природних барвників рослин, розповсюджених на території України, зокрема в Карпатському регіоні. Серед них особливе місце посідають борщівники, насамперед борщівник Сосновського (*Heracleum sosnowskyi* Manden.). Відомо, що контакти з цими рослинами спричиняють опіки в людини, які посилюються під дією сонячних променів [9]. Це дає підстави вважати, що ураження відбувається внаслідок фотодинамічного ефекту. Зрозуміло, що для ефективного застосування лазерів в біології та медицині необхідна інформація про механізми і особливості дії їх випромінювання на генетичний апарат організму, в першу чергу, на нуклеїнові кислоти. Тому метою даної роботи є дослідження спектральними методами фотодинамічної активності природних барвників, виділених із *Heracleum sosnowskyi*, а також їх взаємодії з нуклеїновими кислотами.

Матеріали та методи

У роботі досліджувався спиртовий екстракт речовин, виділених із листків, стебел і коріння борщівника Сосновського з околиць міста Ужгорода (рис. 1).

Борщівник Сосновського (*Heracleum sosnowskyi* Manden) родини Зонтичні (*Umbelliferaeae*) – багаторічна рослина, до 3–5 м висоти, товщина стебла – до 10 см. Основними місцями його зростання є потічки, береги річок, узбіччя доріг, деградовані пасовища. Рослина багата на фотоактивні сполуки, тому навіть одноразове торкання до борщівника призводить до опіків. Через 1–2 дні пошкоджена поверхня тіла досягає декількох сантиметрів, важко

гоїться, загострює появу інших шкірних захворювань.



**Рис. 1. Борщівник Сосновського
(*Heracleum sosnowskyi* Manden)**

Джерелом лазерного випромінювання був азотний лазер ЛГИ-21, довжина хвилі генерації якого становить 337 нм. Лазер працює в імпульсному режимі, частота 100 Гц. Тривалість імпульсу – 7 нс. Імпульсна і середня потужності – 1,6 кВт і 3 мВт відповідно. Як некогерентне джерело світла використано водневу лампу, живлення якої забезпечувалось стабілізатором струму, що входить до комплексу спектрофотометра СФ-46. Інтенсивність випромінювання лазера становила 120 Вт/м², лампи – 20 Вт/м². Досліди проводились при різних світлових умовах: розсіяне денне світло, ультрафіолетове випромінювання (некогерентне і лазерне).

В роботі також використовувались препарати ДНК і РНК, а також 7-диетиламіно-4-метилкумарин («Sigma-Aldrich»), очищення 99%.

Спектри поглинання розчинів молекул нуклеїнових кислот, барвників і екстрактів борщівника досліджувались за допомогою спектрофотометра СФ-46. Люмінесценція речовин вивчалась на спеціальній лабораторній установці, основними блоками якої були: джерело збуджуючого світла, кювета для досліджуваних препаратів і комп'ютеризована система для спектрального ана-

лізу світіння. Похибки у визначенні спектральних характеристик становили 2-5%.

Результати та їх обговорення

Для поглиблення знань про механізми первинних стадій фотохімічних і фотобіологічних реакцій актуальною є інформація про властивості молекул у збуджених станах. Відомо, що після елементарного акту поглинання світла в молекулі починаються процеси дисипації частини енергії електронного збудження. В свою чергу це призводить до зміни параметрів певних зв'язків (довжини, амплітуди і частоти коливання, електронної густини), що в кінцевому рахунку, очевидно, і визначає як загальну реакційну здатність молекули, так і фізичний механізм найбільш ранніх стадій фотохімічних реакцій. Детальну інформацію про електронну структуру молекул в основному і збудженому стані дозволяють отримати абсорбційна і флуоресцентна спектроскопії.

В роботі вивчались спектри поглинання і люмінесценції біопрепаратів в ультрафіолетовій та видимій областях спектру. Аналізувались особливості комплексоутворення цих речовин з важливими біомолекулами – нуклеїновими кислотами та їх компонентами. Для порівняння досліджувались комерційні препарати барвників.

На рис. 2 (а, б) зображені спектри поглинання екстракту *Heracleum sosnowskyi* і розчину барвника 7-диетиламіно-4-метилкумарину. Як видно, спектр поглинання екстракту складний, містить багато смуг поглинання у різних діапазонах довжин хвиль. Очевидно, поглинання в області 450-650 нм зумовлене наявністю в екстракті порфіринів та різних форм хлорофілу. Смуга в діапазоні 350-400 нм зумовлена поглинанням кумаринових похідних, які у значних кількостях присутні у складі борщівника Сосновського і є причиною його фотодинамічної активності. Підтвердженням цього є те, що максимуми спектрів поглинання 7-диетиламіно-4-метилкумарину і короткохвильової смуги екстракту співпадають.

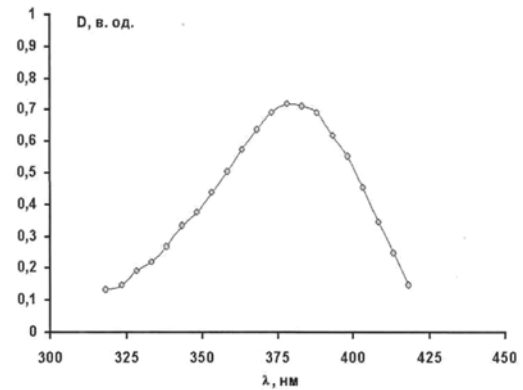
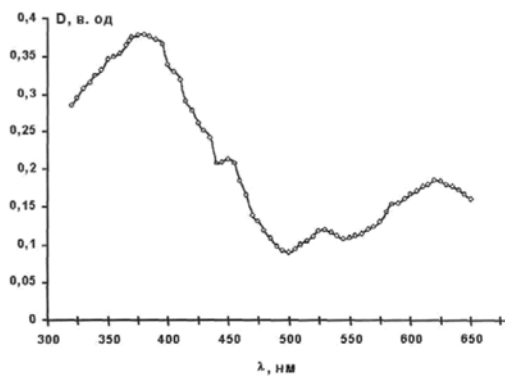


Рис. 2. Спектри поглинання екстракту *Heracleum sosnowskyi* (а) і розчину барвника 7-диетиламіно-4-метилкумарину (б)

На рис. 3 і 4 приведено спектри поглинання нуклеїнових кислот у комплексах з кумарином та екстрактом *Heracleum sosnowskyi* після опромінення їх світлом азотного лазера ($\lambda = 337$ нм) протягом 20 хвилин.

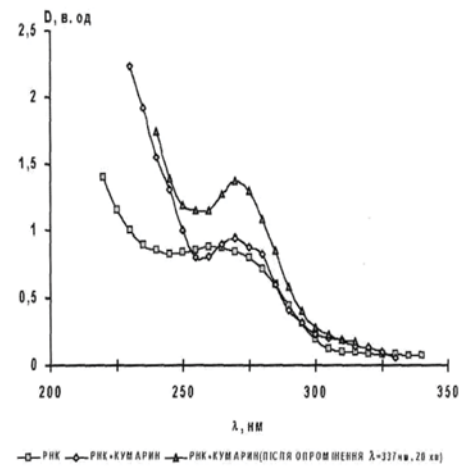
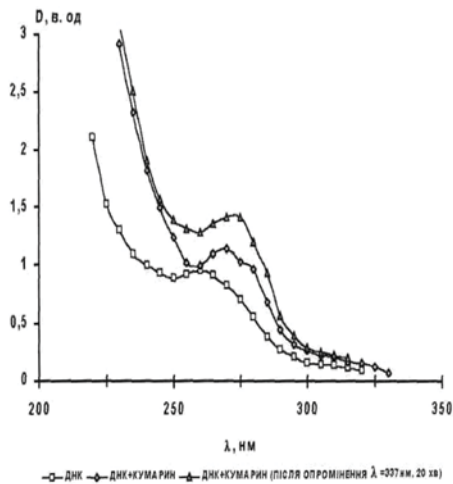


Рис. 3. Спектри поглинання ДНК (а) і РНК (б) у комплексі з кумарином до та після опромінення світлом азотного лазера ($\lambda=337$ нм)

Як видно, у спектрах поглинання відповідних комплексів наявні як кількісні (збільшення оптичних густин комплексів), так і якісні зміни (зміна форми смуги поглинання). Аналогічні спектральні особливості проявляються і в спектрах люмінесценції. Опромінення нуклеїнових кислот без барвників при аналогічних умовах не приводило до появи спектральних змін.

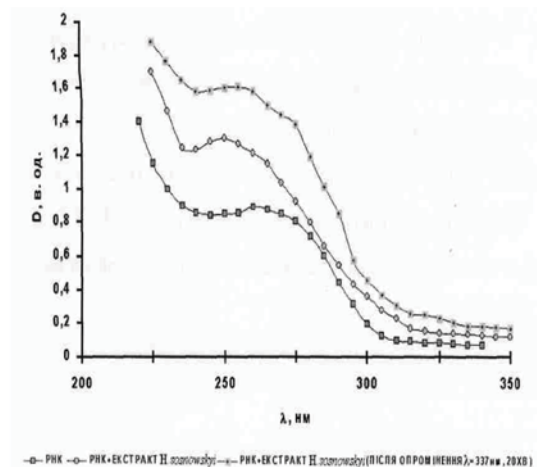
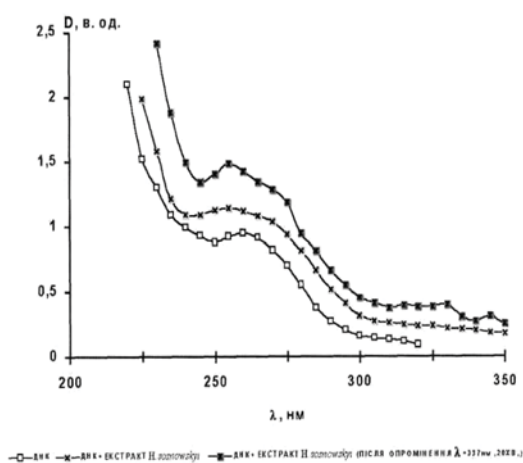


Рис. 4. Спектри поглинання ДНК (а) і РНК (б) у комплексах з екстрактом *H. sosnowskyi* до та після опромінення світлом азотного лазера ($\lambda=337$ нм)

Приведені результати свідчать про певну дестабілізацію структури молекул нуклеїнових кислот у комплексах з барвниками під променем лазера. Для з'ясування питання про те, в якому саме місці складної структури макромолекули локалізуються ці зміни, були поставлені прямі експерименти для оцінки стабільності водневих зв'язків між комплементарними основами. На рис. 5 приведені кінетичні криві і їх лінійні анаморфози для ДНК і її комплексів з природними барвниками. Як видно із графіків, профіль кінетичних кривих ДНК з барвниками як для контрольних, так і для опроміненних препаратів змінюється – стає крутішим. Збільшується також початкова швидкість деспіралізації молекул, що свідчить про появу дефектів в системі водневих зв'язків біополімеру.

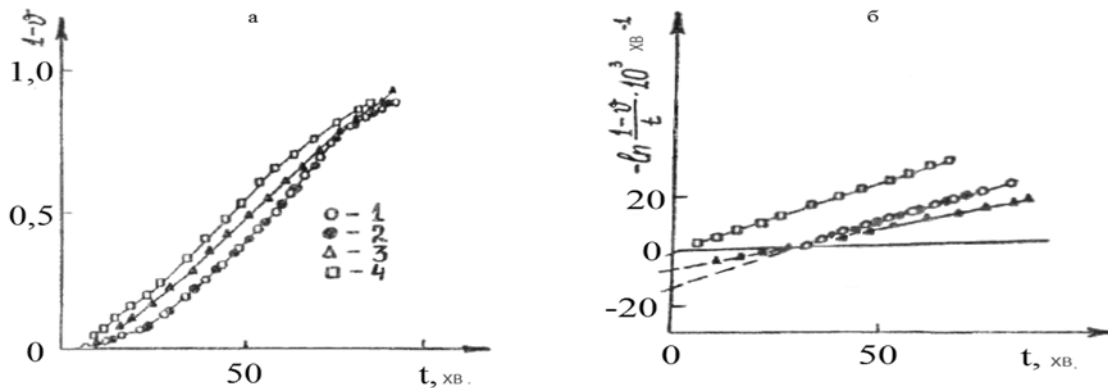


Рис. 5. Кінетичні криві деспіралізації ДНК (а) і їх лінійні анаморфози (б): 1 – ДНК, контроль; 2 – ДНК після дії лазерного випромінювання; 3 – ДНК + барвник, контроль; 4 – ДНК + барвник, після дії лазерного випромінювання

Були розраховані такі середні значення кількості дефектів на 1000 пар нерозплетених основ: 1,0 – в контрольному зафарбованому препараті і 1,8 – в зафарбованому і опроміненному препараті.

Спектральні дослідження показали, що комплекси біомолекул реагують на лазерне випромінювання більш динамічно, ніж на некогерентне. Характер індукованих лазерним світлом фотодинамічних процесів дозволяє зробити припущення про реалізацію в комплексі двофотонних реакцій. При поглинанні послідовно двох квантів світла енергією 3,7 еВ, яка відповідає $\lambda = 337$ нм, молекули барвника отримують енергію у 7,4 еВ і переходять у збуджений синглетний стан S_2 . Наявність комплексу між барвником та біополімером створює умови, сприятливі для міграції енергії і збудження молекул нуклеїнових кислот (рис. 6). Переданої молекулою кумарину енергії (7,4 еВ) досить для виникнення змін у вторинній та первинній структурах нуклеїнових кислот, а також для руйнування азотистих основ: відщеплення бічної групи $-CH_3$ в молекулі тиміну ($E = 3,22$ еВ) та $-NH_2$ групи в молекулі гуаніну ($E = 3,64$ еВ).

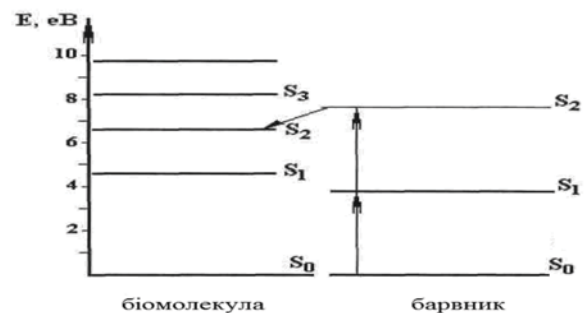


Рис. 6. Схема енергетичних процесів при двофотонному поглинанні барвниками лазерного випромінювання ($\lambda = 337$ нм)

Таким чином, природні барвники, які містяться в екстракті борщівника, взаємодіючи з нуклеїновими кислотами, сенсibilізують їх фотопшкодження. Реалізація в комплексі «кумарин-нуклеїнова кислота» фотодинамічних процесів за механізмом двофотонного поглинання барвником світла відкриває можливість впливати на структуру нуклеїнових кислот, використовуючи доступні джерела лазерного випромінювання, що може бути з успіхом використано в медицині та генній інженерії.

Висновки

У спектральній області 200-650 нм досліджено поглинання і люмінесценцію екстрактів із рослин *Heracleum sosnowskyi Manden.* Аналіз спектрів дозволив ідентифікувати природу барвників, які містяться в рослинних препаратах. Це кумарини (в т. ч. 7-диетиламіно-4-метилкумарин) та порфірини. Вивчення кінетики взаємодії природних барвників із нуклеїновими кислотами показало зміни структури ДНК, які посилюються під дією лазерного ультрафіолетового випромінювання.

Література

1. Бидненко В.Н. Модель и механизмы фотодинамической терапии злокачественных новообразований / В.Н. Бидненко, В.Л. Сигал // Доповіді НАНУ. – 1999. – № 1. – С. 170-176.
2. Ковальова А.М. Дослідження інгібуючої дії на ліпазу фурукумаринів і фурохромонів та порівняння з іншими видами біологічної активності / А.М. Ковальова, С.М. Комісаренко, А.М. Комісаренко // Фармацевтичний журнал. – 2001. – №2. – С. 89-93.
3. Коркушко А.О. Физические основы взаимодействия лазерного излучения с биоло-

гическими объектами // Врачебное дело. – 2001. – № 4. – С. 134-137.

4. Кузнецова Г.А. Природные кумарины и фурукумарини. – Л.: Наука. – 1967. – 249 с.

5. Механизмы действия лазерного излучения на молекулярном, клеточном, тканевом уровне и на организм в целом / В.Д. Попов, М.Ю. Доган, И.Е. Гойда, В.Ю. Хиль // Клиническая хирургия. – 1997. – № 3-4. – С. 92-96.

6. О механизме нелинейного лазерного разрезания ДНК / Л.З. Бенимецкая, А.Л. Козионов, С.Ю. Новожилов, М.И. Штокман // Биофизика. – 1997. – Т.42, № 3. – С. 607-610.

7. Рубин А.Б. Первичные молекулярные механизмы фотобиологических процессов и деструктивное действие оптического излучения / А.Б. Рубин, Г.Я. Фрайкин // Успехи современной биологии. – 1987. – Т.103, № 3. – С. 323-339.

8. Физико-химические механизмы биологического действия лазерного излучения / Н.Д. Девятков, С.М. Зубкова, Н.Б. Лапрун, Н.С. Макеева // Успехи современной биологии. – 1987. – Т. 103, №1. – С. 31-43.

9. Nielsen C. Guidelines for the management and control of an invasive weed in Europe / C. Nielsen, H.P. Ravn, W. Nentwig. – Forest and Landscape Denmark, Hoersholm, 2005. – 44 p.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ РОДА HERACLEUM

О.В. Павлючок-Гогерчак, В.В. Стецович, М.И. Суховия

*Ужгородский национальный университет, физический факультет,
88000 Украина, г. Ужгород, ул. Волошина, 54.*

*С помощью спектральных методов исследовано природу и активность веществ, выделенных из *Heracleum sosnowskyi Manden.* Изучение кинетики взаимодействия природных красителей с нуклеиновыми кислотами определило изменение структуры ДНК.*

Ключевые слова: *лазерное излучение, фотодинамический эффект, *Heracleum sosnowskyi*, кумарины.*

PHOTODYNAMIC ACTIVITY MOLECULAR MECHANISM OF THE NATURAL DYE OUT OF HERACLEUM PLANTS

O.V. Pavlyuchok-Gogertchak, V.V. Stecovych, M.I. Sukhovia

*Uzhgorod National University, Department of Physics,
88000 Ukraine, Uzhgorod, Voloshin Str., 54.*

*The experimental data on the photodynamic activity of natural dye out of *Heracleum* plants are discussed. The kinetics of the DNA-dye interaction are analyzed.*

Key words: *laser radiation, photodynamic effect, *Heracleum sosnowskyi*, coumarins.*