

Ящук В. М., Кутовий С. Ю., Пащенко В. Г.,
Башимакова Н. В., Дудко О. В., Заїка Л. А.

ПРОЯВ У СПЕКТРАХ ФОТОЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ ТА КРС ВПЛИВУ ПРЕПАРАТУ БЕРБЕРИНУ НА ДНК

У статті досліджується взаємодія молекул ДНК з берберином - одним з алкалоїдів амітозину — нового протипухлинного та імуномодуючого препарату, створеного в Україні. Отримано спектри оптичного поглинання, фотолюмінесценції (флюоресценції та фосфоресценції) та комбінаційного розсіяння світла (КРС) молекул ДНК та берберину окремо і у сполученні. За результатами незалежних експериментів (ФЛ та КРС) встановлено факт зв'язування молекули берберину з макромолекулою ДНК. Зроблено висновок про перенесення енергії триплетних збуджень з ДНК на берберин. Отримано спектри КРС розчину у воді суміші ДНК і берберину. Зафіксовано значне зростання інтенсивності спектру КРС ДНК в області перекриття спектрів ($1000-1700\text{ см}^{-1}$) за збереження низької інтенсивності ліній ДНК в області, де коливання молекул берберину відсутні, тобто має місце резонансна взаємодія коливальних мод берберину і ДНК. Висловлюються припущення щодо можливих механізмів зв'язування молекул берберину з ДНК.

1. Вступ

Останнім часом все важливішими є дослідження біологічних об'єктів фізичними методами, зокрема, методами оптичної спектроскопії - фотолюмінесценції (ФЛ) та комбінаційного розсіяння світла (КРС). Особливе місце серед них посідає вивчення властивостей молекул ДНК - носія генетичної інформації. Не менш актуальним

є вивчення фізичних механізмів взаємодії ДНК з іншими сполуками і серед них з препаратами, відомими у медицині, як протипухлинні. Зрозуміти механізм терапевтичної дії ліків досить важко без вивчення взаємодії цих сполук на молекулярному рівні. У роботі проведено дослідження, спрямовані на встановлення сутності явищ, що відбуваються під час взаємодії макромолекул

ДНК з одним з алкалоїдів амітозину – берберином. Амітозин – новий протипухлинний та імуномодуючий препарат, отриманий шляхом алкілювання суми алкалоїдів чистотілу тиотетом. Препарат створено в Україні групою О. І. Потопальського (ІМБГ).

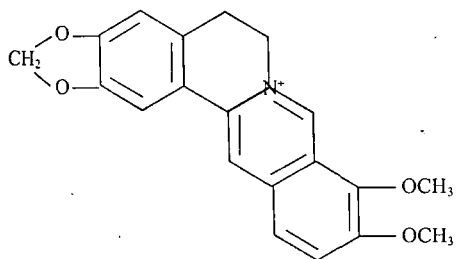


Рис. 1. Структурна схема молекули берберину

Берберин являє собою четвертинну основу, що утворює циклічну систему, в основі якої лежить хінолізоване кільце, конденсоване з двома бензольними ядрами. Структурна формула берберину відома, проте питання про форми молекули берберину є суперечним і остаточно не вирішеним. У медицині берберин здавна досить успішно застосовується для лікування широкого спектру захворювань, проте останнім часом препарати берберину (зокрема, трибетамід, амітозин) стали викликати підвищений інтерес дослідників, як препарати ефективної протипухлинної дії на механізми метаболізму пухлинних клітин з необоротним їх руйнуванням. При цьому загальна токсичність препаратів відносно низька, а у лікуваного організму виробляється імунітет проти повторного захворювання [1]. Спектральні властивості складного препарату зумовлені спектральними властивостями алкалоїдів, що у нього входять, і це також додає актуальності нашим дослідженням.

Відповідно вивчалися спектри оптичного поглинання, ФЛ та КРС молекул ДНК та берберину окремо і у сполученні. Актуальність таких досліджень теж зумовлена наявністю попередньої інформації про можливість зв'язування вказаних сполук з ДНК та РНК, проте механізми взаємодії залишаються поки що нез'ясованими. Використовувалась ДНК еритроцитів курчат, з якої готувалися водні розчини відповідної концентрації.

2. Експериментальні результати та їх аналіз

2.1. Поглинання та фотолюмінесценція

Для всіх досліджуваних речовин готувалися водні розчини. Концентрації речовин для вимірювань фотолюмінесценції становили ~200 мкМ/л, для поглинання ~50 мкМ/л. Концентрації досить

низькі, тому перепоглинання чи концентраційні ефекти були несуттєвими. Змішані розчини з ДНК готувалися з відносними концентраціями: одна молекула берберину на 10 або 20 пар основ ДНК. Тобто концентрація ДНК у воді залишалася сталою, а концентрація берберину зменшувалась. Це робилося для того, щоб оцінити довжину перенесення збудження вздовж макромолекули ДНК.

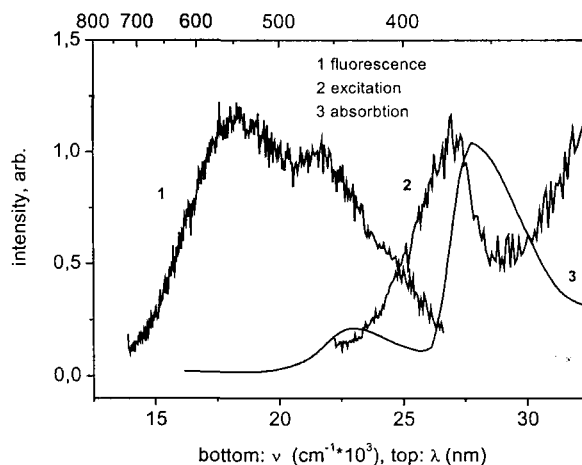


Рис. 2. Спектри поглинання, збудження флюоресценції та флюоресценції берберину при 300 К

Реєстрація спектрів поглинання проводилася на спектрофотометрі Specord UV VIS. Дослідження флюоресценції та фосфоресценції проводились на установці на базі спектрографа ІСП-28, а також за допомогою флюориметра Cary Eclipse. Спектри коригувалися на спектральну чутливість. Для збудження люмінесценції застосовувалась ртутна лампа ДРТ-1000. Необхідна спектральна область збудження виділялась фільтрами. Для реєстрації фосфоресценції застосовувався механічний фосфороскоп із селсинною системою з двома переривниками, що давало змогу виділяти випромінювання з часом затухання $\geq 0,1$ мс.

На рис. 2 зображено спектри поглинання, збудження флюоресценції та флюоресценції водного розчину берберину при 300 К. Спектр поглинання міститься в області до 500 нм, його перший довгохвильовий максимум – при 440 нм, головний максимум – при 360 нм. Спектр флюоресценції зміщений в довгохвильову область (370–700 нм, максимум при 535 нм) порівняно зі спектром поглинання, хоча вони частково перекриваються. Такий значний зсув стоксів може свідчити про суттєву трансформацію молекули берберину у разі поглинання фотона, тобто перебудову електронної структури. Водночас спектри збудження флюоресценції та поглинання близькі, і це свідчить про спільну природу центрів поглинання та випромінювання.

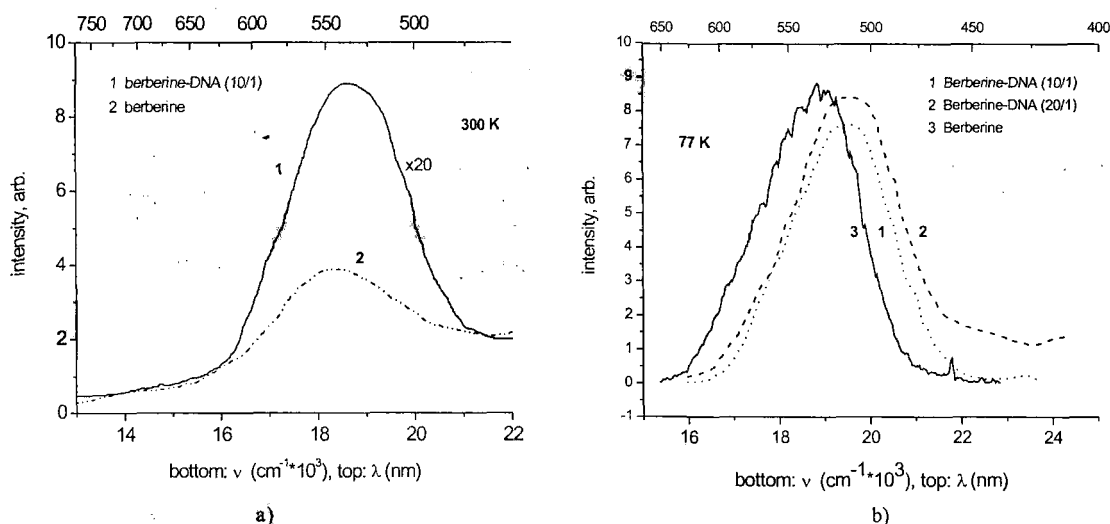


Рис. 3. Спектри флюоресценції берберину та суміші берберину з ДНК при 300 та 77 К

На рис. 3, а зображено спектри флюоресценції берберину та суміші берберину з ДНК при кімнатній температурі. Виявилось, що при додаванні у розчин берберину ДНК інтенсивність флюоресценції зросла приблизно у 60 разів. Це свідчить про зв'язування молекул берберину з макромолекулою ДНК. Існує дві моделі зв'язування порівняно невеликих молекул з ДНК, які проявляються спектрально. Це борозенкова модель (молекула розміщується в борозенці ДНК) і інтеркаляція (молекула проникає у простір між ланцюгами ДНК). Зростання інтенсивності флюоресценції зумовлене тим, що під час зв'язування зменшується кількість ступенів вільності і шляхів безвипромінювальної релаксації збудження – відповідно збільшується квантовий вихід флюоресценції [2, 3]. Спектри флюоресценції при 77 К зображено на рис. 3, б. Видно, що спектр флюоресценції суміші берберину з ДНК схожий за формою на спектр флюоресценції берберину, але дещо зміщений у короткохвильовий бік. Наявність зсуву флюоресценції також свідчить про взаємодію берберину з ДНК. Таким чином, можна досить упевнено стверджувати, що берберин зв'язується з макромолекулою ДНК, але для з'ясування природи взаємодії (інтеркаляція чи борозенкова модель) наявних спектральних даних недостатньо.

На рис. 4 зображено спектр фосфоресценції водного розчину берберину при 77 К (за кімнатної температури фосфоресценція берберину має дуже незначну інтенсивність). Він розміщений у діапазоні 380–630 нм з максимумом при 510 нм. Фосфоресценція берберину не є типовою: спектр фосфоресценції лежить у більш короткохвильовій області, ніж спектр флюоресценції (див. рис. 3, 4). Це нетиповий випадок, і можливі такі пояснення:

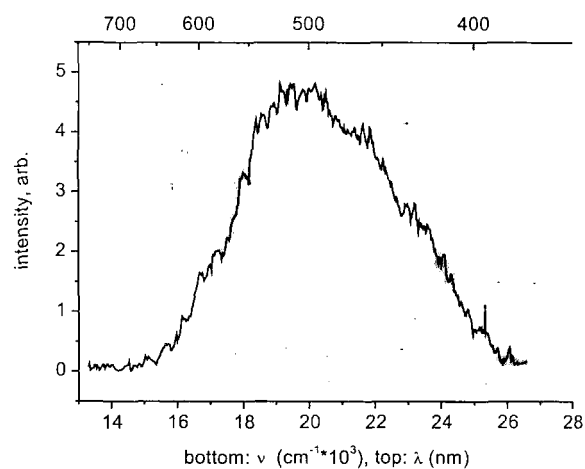
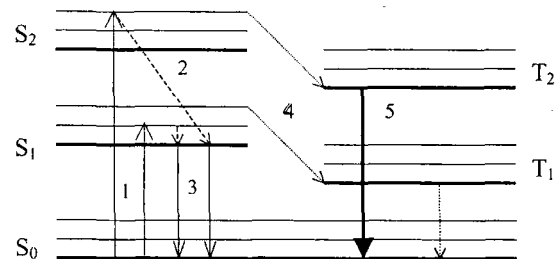


Рис. 4. Спектр фосфоресценції берберину при 77 К

– спостережувану фосфоресценцію обумовлено випромінювальним процесом $T_2 \rightarrow S_0$ (див. схему рівнів, де позначено переходи: 1 – збудження, 2 – внутрішня конверсія, 3 – флюоресценція, 4 – інтеркомбінаційна конверсія, 5 – спостережувана фосфоресценція; S, T – системи синглетних та триплетних рівнів молекули, відповідно);



– фосфоресценція виникає, якщо збуджений другий синглетний рівень. Протягом часу життя цього збудженого рівня π -електронна система берберину трансформується у два практично незв'язані хромофори, і спостерігається фосфоресценція цих двох нових утворень.

Треба зауважити, що під час аналізу цих припущень виникає багато інших запитань, відповіді на які можуть бути отримані лише після додаткових досліджень.

На рис. 5 зображено спектри фосфоресценції берберину, ДНК та їх суміші (значення відношення *кількість пар основ ДНК/кількість молекул берберину* від 10/1 до 20/1) при 77 К. Ефективність гасіння фосфоресценції ДНК молекулами берберину практично не зменшується у разі зміни відношення *берберин/пари основ ДНК* від 10/1 до 20/1. Це є важливим результатом, який вказує, що берберин перехоплює триплетні збудження молекули ДНК і триплетне збудження у ДНК може поширитися принаймні на відстань, що відповідає 20 парам основ ДНК (~7 нм). Таким чином, молекули берберину діють, як пастки, для рухливих триплетних електронних збуджень в ДНК. Зокрема, це означає, що берберин може бути індикатором (флюоресцентним зондом) наявності ДНК у розчині.

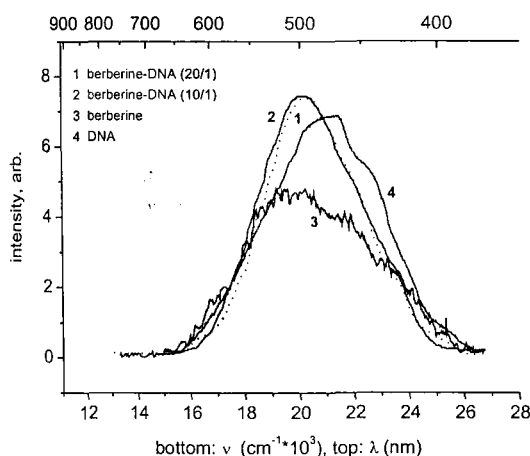


Рис. 5. Спектр фосфоресценції водного розчину ДНК, берберину та суміші ДНК–берберин при 77 К

2.2. Комбінаційне розсіяння світла

Зразки, методика. Зразки збуджувалися випромінюванням аргонного ($\lambda = 4880, 5145 \text{ \AA}$) та гелій-неонового ($\lambda = 6328 \text{ \AA}$) лазерів. Реальна потужність на зразку ~10 мВт для червоної лінії 6328 Å і ~60–80 мВт для зелених ліній Аг-лазера. Для дослідження спектрів розчинів використовувалась 90°-геометрія КРС, промінь лазера заводився у кварцову кювету зі зразком вертикально – для паралельності треку променя і вхідної щілини монохроматора (ДФС-24). Спектри берберину (порошок жовтого кольору) реєструвались у 45°-геометрії на відбивання під час збудження червоною лінією 6328 Å (у разі збудження Аг-лазером спостерігалось сильне поглинання).

Під час спектрального дослідження розчинів ДНК у воді методом КРС, як виявилось, суттєву

роль відіграє концентрація. Дослідним шляхом було знайдено, що оптимальна концентрація ДНК для наших експериментів становить 40–50 мг/мл (використовувалась суха ДНК еритроцитів курчат). Крім того, виявилось, що у разі збудження лінією 4880 Å має місце сильне релєйське розсіяння, розчин надто перегрівається. Не виключено, що тут має місце досить інтенсивна фонова люмінесценція нез'ясованого походження (відомо, що ДНК поглинає в області до 320 нм). Надалі зразок збуджувався лінією $\lambda = 5145 \text{ \AA}$ Аг-лазера, при цьому розсіяння було значно меншим. Досліджувані спектри КРС ДНК та суміші ДНК з берберином мали дуже малу інтенсивність, тому для покращення співвідношення сигнал/шум доводилося збільшувати час накопичення у точці до ~4–8 сек. Далі проводилась детальна математична обробка спектрів засобами програми *PeakFit*. У результаті за даних умов збудження, реєстрації та обробки спектрів вдалося надійно зареєструвати спектр ДНК КРС в усьому досліджуваному діапазоні (500–1800 cm^{-1}).

ДНК. Коливальні спектри ДНК досліджуються вже не один десяток років; є багато літератури з цього питання. Проте, внаслідок труднощів реєстрації повідомлення про якісні спектри КРС та ІЧ-поглинання, ДНК і їх досить надійна інтерпретація стали з'являтися лише в останні роки (зокрема праці [4–7], на результати яких ми спирались і у нашій роботі). У діапазоні 600–1800 cm^{-1} проявляється більше 40 коливальних мод молекули ДНК. Деякі лінії є практично незмінними за частотою та інтенсивністю для всіх типів ДНК – це т. зв. лінії-«маркери» (наприклад, 1092 cm^{-1} – одне з коливань фосфатних груп). Інші маркери є характеристичними лініями певної основи, за ними можна визначити наявність основи і навіть її відносний вміст у ДНК даного типу. Крім того, у спектрі наявні лінії, частоти й інтенсивність яких змінюється залежно від типу ДНК. Слід відмітити, що у різних роботах частоти й інтенсивності ліній спектра навіть одного типу ДНК можуть досить сильно відрізнятися, що утруднює можливість їх однозначної інтерпретації. Ряд коливань молекул ДНК проявляється і в низькочастотній (до 200 cm^{-1}) області.

На рис. 6, а, б наведено отримані нами оброблені спектри КРС ДНК. Існує добра кореляція між нашими даними і даними [7], як щодо збіжності частот ліній-«маркерів», так і загальної відповідності частот і інтенсивностей ліній. Проте повної відповідності не спостерігалось, і це природно, оскільки, крім похибок експерименту, спектри різних типів ДНК мають деякою мірою

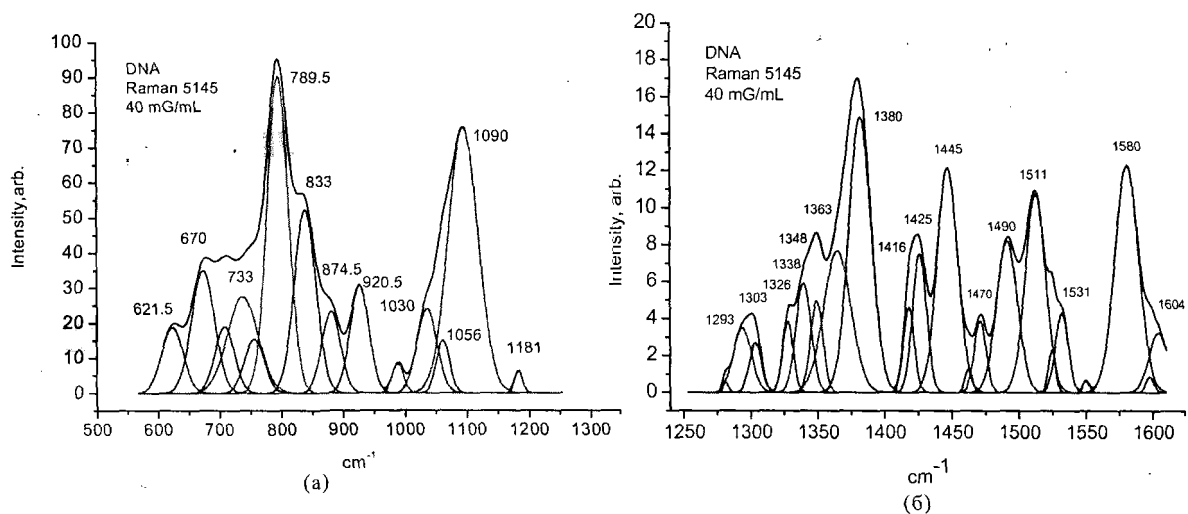


Рис. 6. Спектри КРС В-ДНК, діапазон 550–1250 cm^{-1} (а) та 1250–1650 cm^{-1} (б), збудження 5145 Å

відрізнятись, а ми не знайшли у літературі посилань на якісні коливальні спектри досліджуваного нами типу ДНК (еритроцитів крові курчат). Спектри КРС ДНК при збудженні лінією 6328 Å (He-Ne лазер) ідентифікувати не вдалося, крім деяких інтенсивних ліній, через низьку потужність лазера.

Берберин. Берберин погано розчиняється у воді за кімнатної температури, тому навіть за максимально досягнутих концентрацій водного розчину берберину й математичної обробки отриманих спектрів надійно спектр КРС водного розчину берберину не реєструється. На рис. 7 наведено необроблений спектр КРС берберину (порошок) при збудженні лінією 6328 Å. Зареєстровано близько двох десятків коливальних мод в області 1100–1650 cm^{-1} , спостерігається добра відповідність між нашими даними і даними [8], єдиним знайденим нами повідомленням про спектр КРС берберину; на жаль, інтерпретація коливальних мод у роботі відсутня.

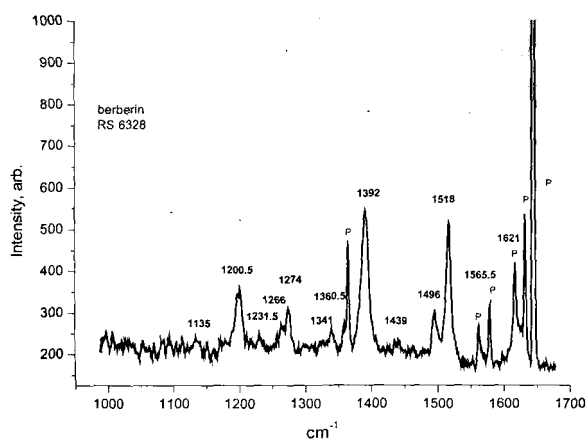


Рис. 7. Спектр КРС берберину, збудження 6328 Å. Лінії випромінювання He-Ne плазми позначені як Р

Вплив берберину на спектри КРС ДНК.

У кювету з розчином ДНК, концентрацією у межах 80–100 мг/мл додавався насичений розчин берберину в такій кількості, що сумарна концентрація ДНК становила 40–50 мг/мл, тобто була типовою для наших експериментів. Збудження зразків проводилось лінією 6328 He-Ne лазера. З аналізу спектрів, оброблених за описаною методикою, випливає, що має місце значне зростання інтенсивності ліній, що відповідають колюванням як ДНК, так і берберину (табл., рис. 8). Тобто це виглядає як прояв резонансної взаємодії молекул ДНК і берберину, причому саме у діапазоні перекриття спектрів цих молекул (1100–1700 cm^{-1}). Частина спектра ДНК, де немає ліній колювання берберину, дає невисоку надійність ідентифікації – таку, як при записі спектрів ДНК без берберину при збудженні He-Ne лазером. У присутності берберину спектр КРС молекул ДНК в області перекриття реєструється надійно – як і у разі збудження чистої ДНК лінією 5145 Å аргонного лазера.

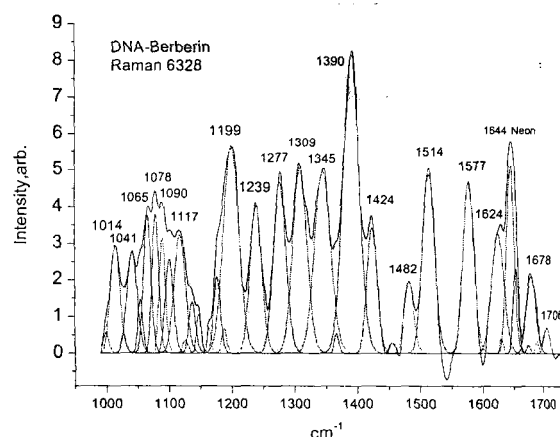


Рис. 8. Спектри КРС водної суміші ДНК та берберину, діапазон 1000–1750 cm^{-1} , збудження 6328 Å

Механізм цієї «резонансної» взаємодії поки що не з'ясовано; це є предметом подальших досліджень. Припускають, що берберин зв'язується з фосфатною групою ДНК – відомо [1], що берберин досить активно взаємодіє зі сполуками, які містять фосфатні групи. Інший можливий варіант зв'язування – берберин втягується у велику борозенку спіралі ДНК. Це є найімовірнішим варіантом взаємодії, на що вказують попередні результати, отримані методами математичного моделювання.

3. Висновки

У роботі досліджувалась взаємодія молекул ДНК з берберином – одним із алкалоїдів амітозину. Отримано спектри оптичного поглинання,

фотолюмінесценції (флюоресценції та фосфоресценції) та КРС молекул ДНК і берберину окремо й у сполученні. Встановлено факт зв'язування молекули берберину з макромолекулою ДНК.

Із аналізу спектрів ФЛ зроблено припущення про перенесення енергії триплетних збуджень з ДНК на берберин.

Зафіксовано значне зростання інтенсивності спектру КРС ДНК в області перекриття спектрів (1000–1700 cm^{-1}) ДНК та берберину за збереження низької інтенсивності ліній ДНК в області, де коливань молекул берберину немає. Проводяться дослідження можливого механізму такої «резонансної» взаємодії. Припускається, що берберин втягується у велику борозенку спіралі ДНК.

Таблиця. Частоти спектра КРС суміші ДНК і берберину (частоти нижче 1000 cm^{-1} – поза областю коливань берберину)

Частоти суміші ДНК-берберин, cm^{-1}	Відповідні частоти ДНК и берберину, cm^{-1}	Частоти суміші ДНК-берберин, cm^{-1}	Відповідні частоти ДНК и берберину, cm^{-1}
1014	1012-16 ДНК	1309	1301-04 ДНК 1311 берберин
1041	–	1345	1342-48 ДНК 1343 берберин
1055	1056 ДНК	–	1361 берберин
1065	1060 берберин	1391	1386-87 ДНК 1394 берберин
1078	–	1424	1424 ДНК 1424 берберин
1090	1090 ДНК	1455	1449 берберин
1100	1101 берберин	1482	1486-89 ДНК 1488 берберин
1117	1119 берберин	–	1501 берберин
1137	1140 берберин	1514	1511 ДНК 1519 берберин
1147	1141-43 ДНК 1145 берберин	1578	1578-80 ДНК
1163	–	1624	1624 берберин
1177	1181 ДНК 1180 берберин	1653	1654 берберин
1188	1187-92 ДНК	1674	1672 ДНК
1199	1202 берберин	1679	1682 ДНК
1239	1237-39 ДНК 1235 берберин	1688	1694 ДНК
–	1265 берберин	1706	1708 ДНК
1277	1276 берберин		

1. Потопальский А. И., Петличная Л. И., Ивасивка С. В. Барбарис и его составляющие в биологии и медицине. – К.: «Наук. думка», 1989.
2. M. Yu. Losytskyy, V. M. Yashchuk, S. M. Yarmoluk, Molecular Crystals and Liquid Crystals. – 2002. – 385. – P. 27–32.

3. M. Y. Losytskyy, V. M. Yashchuk, S. S. Lukashov, S. M. Yarmoluk // Journal of Fluorescence. – 2002. – 12. – № 1. – P. 109–112.
4. J.-F. Neuault and H.-A. Tajmir-Riahi. J. Biol. Chem. – 1996. – 271. – P. 8140–8143.

5. H. A. Tajmir-Riahi, M. Langlais and R. Savoie. *Nucleic Acids Research*.- 1988.- 16.- P. 751-762.
6. A. Szabo, R. A. Flowers, B. J. Carter, and S. A. Lee. *Phys. Rev. E*.- 1998.- 58.- P. 7754-7760.
7. H. Deng, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides and G. J. Thomas Jr. *Biopolymers*.- 1999.- 50.- P. 656-666.
8. I. M. Bell, R. J. H. Clark and P. J. Gibbs. *Raman Spectroscopic Library of Natural and Synthetic Pigments*, <http://www.chem.ucl.ac.uk/resources/raman/specplib.html>

V. Yashchuk, S. Kutovyi, V. Pashchenko,
N. Bashmakova, O. Dudko, L. Zaika

THE MANIFESTATION IN RAMAN AND PHOTOLUMINESCENCE SPECTRA OF THE DNA-BERBERIN INTERACTIONS

The problem of elucidating of the mechanisms of interaction the DNA molecules with other macromolecules, in particular, of the antitumour agents, is very actual now. We report about the manifestation of the influence of berberine on DNA molecules in Raman and photoluminescence (PL) spectra. Berberine is a component of amitozine which is the new Ukrainian antitumour and immunomodulating drug. The absorption, photoluminescence (fluorescence and phosphorescence) and Raman spectra of DNA, berberine and DNA-berberine water solutions were studied. From the results of independent experiments (PL and Raman) it follows that berberine binds with the DNA macromolecules. The fact of the triplet-triplet excitation energy transfer from DNA to berberine molecules was established (by estimate the low limit of the excitation transfer distance is 7 nm). The Raman spectra of the DNA water solution, berberine and mixture solution of the DNA and berberine were obtained. It was found that the intensity of the DNA and berberine lines increased greatly over the whole area of overlapping of regions of the DNA and berberine vibration modes (1000-1700 cm^{-1}), out of the range of berberine vibrations the DNA Raman lines remain very weak. That is some resonance interaction of the DNA and berberine vibration modes takes place. Preliminary calculations by the computing modeling methods show that the berberine molecule draws in the big groove of the DNA double helix.