



Общероссийский математический портал

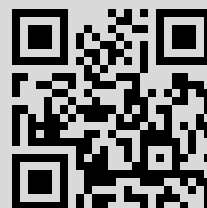
А. М. Агальцов, П. П. Горяев, В. С. Горелик, И. А. Раматуллаев, В. А. Щеглов,  
*Квантовая электроника*, 1996, том 23, номер 2, 181–184

Использование Общероссийского математического портала Math-Net.Ru подразумевает, что вы прочитали и согласны с пользовательским соглашением  
<http://www.mathnet.ru/rus/agreement>

Параметры загрузки:

IP: 178.121.15.117

2 мая 2021 г., 13:53:55



# Двухфотонно-возбуждаемая люминесценция в генетических структурах

А.М.Агальцов, П.П.Гаряев, В.С.Горелик, И.А.Раматуллаев, В.А.Щеглов

*Получены спектры двухфотонно-возбуждаемой люминесценции генетических структур, содержащих ароматическую и гетероциклические кольца. Предложен метод увеличения интенсивности люминесценции в ДНК и нуклеогистоне за счет введения в исследуемые образцы активатора. Показано, что в полинуклеотиде ДНК и дезоксирибонуклеопро-теиде нуклеогистона при наличии активатора создаются условия для реализации инверсной населенности при двух-фотонной лазерной накачке, приводящие к суперфлуоресценции.*

## Введение

Генетические структуры высших биосистем – это сложная иерархия молекулярных и надмолекулярных образований, ключевым функциональным элементом которых являются молекулы ДНК – основной компонент хромосом. Основное положение современной молекулярной биологии и генетики базируется на том, что хромосомный аппарат предназначен исключительно для генерации своих вещественных реплик в форме мРНК и белковых молекул.

В минувшее десятилетие появились новые результаты, объясняющие работу генома, которые уже не укладываются в казалось бы устоявшиеся взгляды на функции хромосом и требуют развития новых концепций. Появились такие понятия как «солитонная трансляция эпигеносигналов», «ассоциативная голографическая память генома высших биосистем», «лазерное поле хромосом» [1] и др. Последнее понятие непосредственно касается темы настоящего исследования, поскольку напрямую связано с полученными в данной работе результатами.

При «микроскопическом» подходе важной характеристикой генетических структур являются спектры электронных возбуждений, связанные с электронным строением ДНК и комплексов ДНК-белки. Как известно, в органических молекулах с ароматическими циклами (например, в белках, в которых присутствуют фенил- и индолсодержащие аминокислоты), первым возбужденным электронным термом является синглетное состояние, обусловленное возмущением  $\pi$ -электронов ароматического кольца. Такой терм оказывается дипольно-активным и проявляется как в спектрах поглощения, так и в процессах флуоресценции. Следует отметить, что вследствие сложного строения генетических молекул квантовый выход флуоресценции в них обычно очень мал и его оценка затруднена.

Применение импульсных лазерных источников света видимого диапазона позволило осуществить новый режим возбуждения люминесценции, основанный на одновременном поглощении двух квантов возбуждающего

излучения материальной средой. Как выяснилось в недавно выполненных нами исследованиях [2–4], такой режим возбуждения позволяет наблюдать вторичное излучение в органических соединениях, содержащих бензольные кольца и гетероциклы, в УФ и синем диапазонах спектра при возбуждении люминесценции источником света видимого диапазона. При этом удалось наблюдать люминесценцию в веществах, характеризующихся низким квантовым выходом при обычном (резонансном) фотозвозбуждении. Выяснилось, что одним из наиболее эффективных лазерных источников света для двухфотонного возбуждения люминесценции (ДВЛ) является лазер на парах меди. Применение такого лазера в качестве источника возбуждения люминесценции оказалось весьма эффективным для получения спектров электронно-колебательных переходов в макромолекулах белков, ДНК, нуклеогистона и их компонентов (пурины, пиримидины, аминокислоты) [2–4].

В настоящей работе была поставлена задача получения спектров ДВЛ в геле-жидкокристаллических нуклеогистоне (тотальная фракция хромосом, в которой обеднены все кариобелки, кроме гистонов) и ДНК. Обычные методы возбуждения фотолюминесценции в таких веществах дают очень низкие квантовые выходы, не позволяющие судить о структуре электронных спектров генетических субстратов. Актуальность этой проблемы состоит в необходимости получения новых квантовых характеристик информационных биомолекул и условий перехода их в возбужденное электронное состояние *in vitro* как возможного аналога такового *in vivo*. Достижение такой цели находится в рамках нового направления в молекулярной генетике, связанного с волновым кодированием генетической информации [1].

## 1. Методы эксперимента

Лазер на парах меди, используемый для получения ДВЛ, работал в импульсно-периодическом режиме с частотой следования импульсов генерации  $10^4$  Гц, средней мощностью 1–3 Вт, пиковой мощностью  $10^6$  Вт, длинами волн генерации  $\lambda = 510.5$  и  $578.2$  нм. Лазерное излучение фокусировалось на исследуемый образец в пятно размером 2–3 мм (рис.1). Вещество в форме монодисперсной воздушно-сухой или геле-жидкокристалличес-

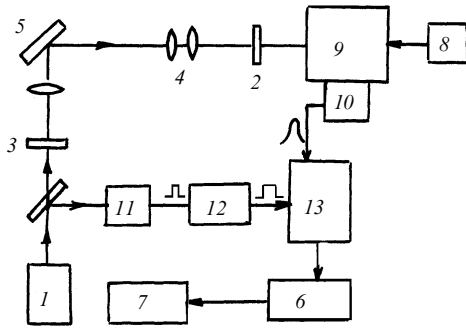


Рис.1. Схема эксперимента для наблюдения двухфотонного возбуждения люминесценции:

1 – лазер на парах меди; 2, 3 – светофильтры; 4 – конденсор; 5 – кювета с исследуемым веществом; 6 – интенсивметр; 7 – самописец; 8 – блок управления МДР-2; 9 – монохроматор МДР-2; 10 – ФЭУ-130; 11 – измеритель; 12 – линия задержки; 13 – амплитудно-временной селектор.

кой структуры помещалось в кювету 5 с плоскопараллельными кварцевыми окнами. Фильтр 3 служил для монохроматизации возбуждаемого излучения, выделяя желтую ( $\lambda = 572.2$  нм) или зеленую ( $\lambda = 510.5$  нм) линию генерации; фильтр 2 выделял излучение люминесценции в УФ или фиолетовом диапазоне, подавляя при этом излучение лазера. Монохроматор 9 типа МДР-2 позволял осуществлять сканирование спектра в широком интервале, включая УФ и видимую области. Спектры записывались на двухкоординатном самописце 7. Измеритель 11 служил для контроля опорного сигнала и позволял определить эффективность наблюдаемого сигнала люминесценции. Для уменьшения тепловых шумов использовался строб-импульс (рис.1), синхронизованный с импульсом возбуждения. Длительность импульсов генерации лазеров составляла 15–20 нс, а длительность строб-импульса – 25–30 нс. Регистрация сигнала вторичного излучения осуществлялась с помощью ФЭУ-130.

Изучались геле-жидкокристаллические препараты ДНК из селезенки крупного рогатого скота и нуклеогистон (хроматин) из зубной железы телят (фирма-производитель «Сигма»).

## 2. Результаты исследования

Ранее [2–4] мы исследовали ДВЛ кристаллических форм триптофана (компонент белков) и азотистых оснований гуанина и тимина (компоненты ДНК), воздушно-сухих препаратов белков (соинсулина, лизоцима), а также ДНК в форме жестких гелей. Эти данные необходимы для трактовки результатов, полученных нами в данном исследовании. В работах [2–4] было обнаружено, что длины волн максимумов наблюдаемых полос для триптофана и белков в спектре ДВЛ близки и расположены в области 350 нм, однако интенсивность полос в триптофане более чем на два порядка выше интенсивности ДВЛ в белках. Вследствие высокой эффективности люминесценции триптофана можно полагать, что основной вклад в ДВЛ белков в области 300–400 нм обусловлен наличием в них триптофана, а его малое процентное содержание по сравнению с другими аминокислотами определяет низкий квантовый выход ДВЛ белков.

Спектр ДВЛ высокоочищенного твердотельного препарата ДНК (жесткий гель), полученный впервые в ра-

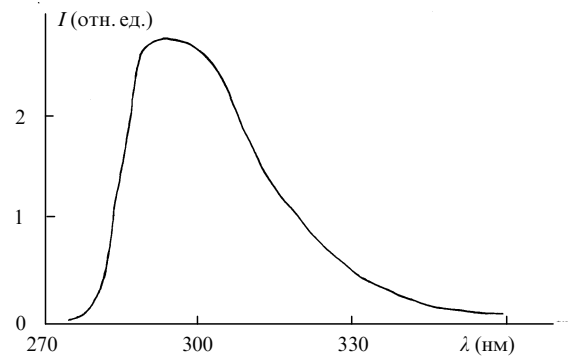


Рис.2. Спектр ДВЛ поликристаллического димедрола.

боте [2], находится в диапазоне 330–420 нм и сдвинут в длинноволновую область относительно соответствующих спектров гуанина и тимина. Характерно, что интенсивность ДВЛ в ДНК существенно слабее, чем в азотистых основаниях полинуклеотида, что, по-видимому, связано с сильным тушением люминесценции, свойственным полимерным структурам.

Для увеличения интенсивности ДВЛ ДНК и нуклеогистона мы предлагаем активировать люминесценцию за счет введения в исследуемые образцы определенных органических молекул – активаторов ДВЛ. Спектр таких молекул характеризуется большой интенсивностью излучения и расположен в области собственного поглощения ДНК. В качестве активатора был использован димедрол, для которого характерно присутствие в его молекулярной структуре связанных бензольных колец. Это обеспечивает интенсивный спектр ДВЛ, имеющий вид широкой асимметричной полосы в диапазоне 280–350 нм (рис.2).

На рис.3 показаны спектры геле-жидкокристаллических фаз ДНК с димедролом (кривая 1) и нуклеогистона с димедролом (кривая 2). Из рис.3 видно, что спектр ДВЛ смеси ДНК с димедролом лишь на порядок менее интенсивен, чем спектр ДВЛ димедрола (пунктир). Это обеспечивает существенное увеличение ДВЛ смеси ДНК – димедрол по сравнению с чистым препаратом ДНК в форме жесткого геля [2].

На приведенном спектре (рис.3) имеется ряд особенностей изучаемых смесей активатора с ДНК и нуклеогистоном. Как оказалось, квантовый выход ДВЛ нуклеогистон – димедрол ниже такового для смеси ДНК – димедрол. Другая характерная черта – разгорание или тушение ДВЛ во времени. Для смеси нуклеогистон – димедрол наблюдается нарастание ДВЛ во времени (рис.4): кривая 1 зарегистрирована в начале эксперимента, кривые 2 и 3 с

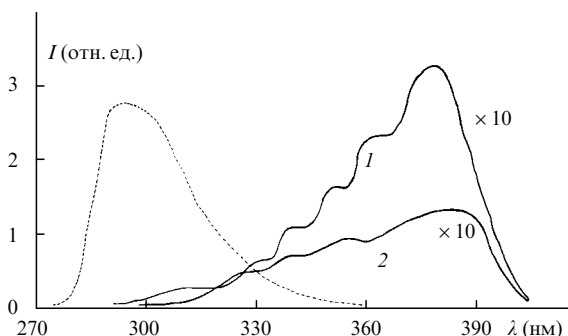


Рис.3. Нормированные спектры ДВЛ димедрола (пунктир), смеси ДНК – димедрол (1) и смеси нуклеогистон – димедрол (2).

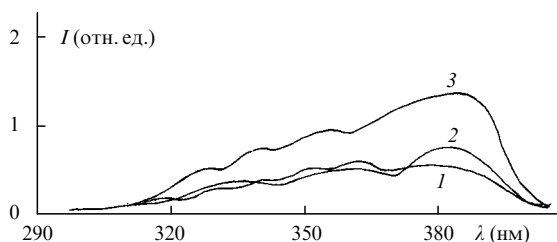


Рис.4. Динамика нарастания ДВЛ смеси нуклеогистон – димедрол во времени: в начале эксперимента (1), через 30 мин (2) и через 50 мин (3).

нарастанием люминесценции – через 30 и 50 мин. Обратный эффект наблюдается для смеси ДНК – димедрол (рис.5): кривая 1 зарегистрирована в начале эксперимента, кривые 2 и 3 с тушением ДВЛ – через 30 и 50 мин. Представляет интерес присутствие вибронной структуры спектров ДВЛ в виде отдельных перекрывающихся полос в области 310–370 нм, особенно для смеси ДНК – димедрол (рис.5). Такая структура близка к структуре ранее наблюдавшихся спектров ДВЛ для нуклеозидтрифосфатов [3].

### 3. Обсуждение полученных результатов

Наблюдаемые при ДВЛ полосы вторичного излучения в исследованных веществах могут быть интерпретированы как флуоресценция, связанная с девозбуждением синглетного электронного терма  $S_1$ , характерного для молекул, содержащих бензольные ядра. При этом коротковолновая граница полосы излучения (300 нм) соответствует синглет-синглетному переходу  $S_1 - S_0$  из возбужденного электронного  $\pi$ -состояния в основное состояние органической молекулы. В твердых ароматических структурах возбужденное электронное состояние носит экситонный характер (экситоны Френкеля) и характеризуется конечной шириной экситонной зоны. В наблюдаемых спектрах флуоресценции резонансное излучение перехода  $S_1 - S_0$  сильно ослабляется из-за сильной реабсорбции. В то же время излучение, соответствующее переходом на возбужденные колебательные термы основного состояния, попадает в полосу прозрачности, поэтому можно утверждать, что наблюдаемые полосы (рис.2–5) отвечают электронно-колебательным переходам исследуемых молекулярных и надмолекулярных структур.

В случае простых органических молекул в кристаллическом или аморфном состояниях ширина полосы флуоресценции характеризует ширину соответствующей экс-

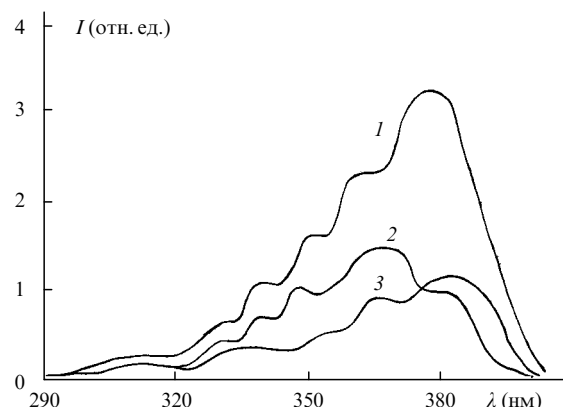


Рис.5. Динамика тушения ДВЛ смеси ДНК – димедрол во времени: в начале эксперимента (1), через 30 мин (2) и через 50 мин (3).

тонной зоны электронного терма  $S_1$  молекулы в кристалле. В белках флуоресценция обусловлена главным образом триптофаном, кроме того, определенный вклад в спектр излучения вносят фенилаланин, тирозин и гистидин. При этом интенсивность флуоресценции в белках на два порядка меньше, чем в кристаллическом триптофане, что связано с дополнительными каналами тушения и малой долей триптофана в белках.

Вид спектров ДВЛ в твердотельных структурах гуанина, тимина и ДНК известен; они располагаются в области 320–390 нм. Интенсивность излучения азотистых оснований ДНК на порядок выше ДВЛ самой ДНК, кроме того, у ДНК ДВЛ сдвинута в длинноволновую область. Резкое увеличение квантового выхода ДВЛ ДНК и нуклеогистона с помощью димедрола может быть следствием резонансной передачи энергии от возбужденных молекул димедрола к двойной спирали ДНК. Наблюдаемая при этом тонкая многополосчатая структура спектров ДВЛ коррелирует с характером вибронных полос, наблюдаемых нами ранее для ряда ароматических и гетероциклических соединений, включая чистые нуклеозидтрифосфаты ДНК [2–4].

Возникновение такого рода дискретизации спектров можно объяснить переходом молекул на возбужденные колебательные уровни основного состояния. Специфической чертой двухфотонного возбуждения в конденсированной среде является возможность создания импульсного заселения возбужденного электронного терма  $S_1$  в достаточно большом объеме среды. В связи с этим может быть реализована инверсная населенность и между состоянием  $S_1$  и колебательным подуровнем основного состояния. Это открывает возможность достижения режима генерации лазерного излучения в ДНК и хромосомах *in vitro*. Коэффициент усиления на единицу длины для перехода  $S_1 - S_0$  вблизи порога генерации может быть представлен в виде

$$k(\lambda) = \frac{\lambda^2 A_{1v}}{4\Delta\omega} \left( N_1 - N_v \frac{G_1}{G_v} \right), \quad (1)$$

где  $\lambda$  – длина волны, соответствующая рабочему переходу;  $A_{1v}$  – соответствующий коэффициент Эйнштейна;  $\Delta\omega$  – ширина линии;  $G_1$  и  $G_v$  – соответствующие статистические веса;  $N_1$  – населенность уровня  $S_1$ , возникающая в результате двухфотонной накачки;  $N_v$  – основная населенность  $v$ -го колебательного уровня основного электронного состояния.

Населенность  $N_1$ , соответствующая населенности состояния  $S_1$ , может быть оценена из соотношения

$$N_1 G_v = \frac{P_1 N_v G_1}{U_1}, \quad (2)$$

где  $P_1$  – скорость заселения уровня  $S_1$  в результате двухфотонной накачки;  $U_1$  – скорость распада этого уровня в результате излучательной и безызлучательной реакции. Скорость  $P_1$  оценивается следующим образом:

$$P_1 = \frac{W}{2h\nu\tau V_{ef}N_0}, \quad (3)$$

где  $W$  и  $\tau$  – энергия и длительность лазерного импульса соответственно;  $N_0$  – плотность биомакромолекул;  $V_{ef} = S/\beta I_0$  – эффективный объем среды, в которой происходит двухфотонное поглощение;  $I_0$  – интенсивность возбуждающего излучения;  $S$  – площадь поперечного сечения пучка, падающего на образец. С учетом соотно-

шений (3) и (2) получаем, что условие достижения лазерной населенности принимает вид

$$I_0 > N_0 2h\nu S U_1 \tau W^{-1} \beta^{-1}. \quad (4)$$

Используя типичные значения –  $N_0 \simeq \frac{1}{3} 10^{26} \text{ м}^{-3}$ ,  $h\nu = 5 \cdot 10^{-19} \text{ Дж}$ ,  $\tau \simeq 10 \text{ нс}$ ,  $W = 0.2 \text{ Дж}$ ,  $S = 10^{-5} \text{ м}^2$ ,  $\beta \simeq 5 \cdot (10^{-9} - 10^{-10}) \text{ м/Вт}$  – получаем, что вынужденное излучение возникает при интенсивностях  $I_0 \gtrsim 3 \cdot (10^{11} - 10^{12}) \text{ Вт/м}^2$ , что близко к интенсивностям, полученным в наших экспериментах.

В связи с приведенными оценками можно предположить, что при используемых режимах двухфотонного возбуждения в исследуемых генетических структурах происходит усиление люминесценции, т.е. наблюдаемое излучение ДНК и нуклеогистона носит характер суперлюминесценции. Для детализации условий и описания лазерной генерации в образцах необходим анализ энергетических и временных характеристик наблюдаемого флуоресцентного излучения.

Логично предположить, что хромосомный аппарат использует в роли димедролоподобных (по функции участия в лазерной накачке) эндогенные соединения, тропные к ДНК и хромосомам. В роли таковых могут выступать стероидные гормоны, например эстроген. Из веществ других классов ими могут быть такие биоактивные соединения как катехол- и индолалкиламины (адреналин, норадреналин, допамин, серотонин и мелатонин), свободные нуклеозидмоно-, ди- и трифосфаты, рибофлавин, никотинамиддинуклеотид, антибиотики и др.

Возникает вопрос о реализации условий инверсной электронной населенности, близкой к той, которая существует в режиме ДВЛ. Учитывая результаты лазерного излучения ДНК и хромосом в диапазоне 300–800 нм *in vivo* (так называемые сверхслабые поля, ultra weak fields) [5, 6] и конформационно-акустической модуляции такого излучения *in vivo - in vitro* [1, 5], можно допустить, что когерентные фотоны хромосом будут следовать сверхкороткими пико- или фемтосекундными цугами и поэтому будут обладать мощностью, достаточной, чтобы создать дополнительную генерацию, аналогичную ДВЛ. Не исключено создание инверсной электронной населенности в геноструктурах за счет энергии химической накачки, например в АТФ-азных реакциях, или за счет

ферментативного гидролиза других макроэргических связей энергонасыщенных субстратов биосистем.

Отметим, что определенные теоретические и экспериментальные наработки по поводу лазерно-активных сред в биосистемах приведены в работе [7], представляющей в основном исследования группы Ф.А.Поппа из Германии.

## Заключение

Таким образом, проведенные эксперименты открывают возможности для конструирования лазерно-активных сред на основе генетических молекул и их надмолекулярных производных, таких как хромосомы, рибосомы, полирибосомы и комплексы рибосом с мРНК и тРНК. Реально создание лазерно-активных высокоорганизованных клеточных структур, работающих в знаково-функциональном контакте с хромосомным аппаратом, например системы ядро-цитоскелет-рибосомы-внеклеточный матрикс. Это открывает перспективы для изучения новых путей миграции энергии и информации в биосистемах, что в первом приближении обосновано в работе [1].

1. Горяев П.П. *Волновой геном* (М., Изд. «Общест. польза», 1994).
2. Горяев П.П., Горелик В.С., Козулин Е.А., Щеглов В.А. *Квантовая электроника*, **21**, 603 (1994).
3. Агальцов А.М., Горяев П.П., Горелик В.С., Щеглов В.А. *Квантовая электроника*, **20**, 371 (1994).
4. Горелик В.С., Козулин Е.А. *Квантовая электроника*, **21**, 341 (1994).
5. Popp F.A. *Electromagnetic Bioinformation* (Munich - Baltimore, Urban und Schwarzenberg, 1979).
6. Popp F.A., Nagl W., Li K.H., Schol W., Weingartner O., Wolf R. *Cell Biophys.*, **6**, 33 (1984).
7. Popp F.A., Li K.H., Cu G. *Recent Advances in Biophoton Research and its Application* (Eds) (Kaiserslautern, Word Scientific, 1992).

**А.М.Агальцов, П.П.Гаряев, В.С.Горелик, И.А.Раматуллаев, В.А.Щеглов. Two-photon-excited luminescence of genetic structures.**

The spectra of two-photon-excited luminescence were determined for genetic structures containing aromatic and heterocyclic rings. A method was developed for increasing the intensity of the luminescence emitted by DNA and nucleohistone by introducing an activator. The presence of an activator in DNA polynucleotide and in nucleohistone desoxyribonucleoproteide created conditions favourable for population inversion by two-photon laser pumping, which resulted in superfluorescence.