

ОСОБЛИВОСТІ ФОТОЛЮМІНЕСЦЕНЦІЙ ВОДНОГО РОЗЧИНУ ЦИТОЗИНУ

В. Ю. Шпеник^{ORCID}, М. І. Шафраньош^{ORCID}, Ш. Б. Молнар^{ORCID}, О. О. Шпеник^{ORCID}, М. І. Суховія^{ORCID}, І. І. Шафраньош^{ORCID}
*Ужгородський національний університет,
пл. Народна, 3, Ужгород, 88000, Україна,
e-mail: shpenik@hotmail.com*

(Отримано 13 червня 2022 р.; в остаточному вигляді — 24 вересня 2022 р.; прийнято до друку — 26 вересня 2022 р.; опубліковано онлайн — 28 листопада 2022 р.)

Наведено результати досліджень ініційованої випромінюванням ксенонової лампи з довжиною хвилі 280 нм фотолюмінесценції молекул азотистої основи нуклеїнових кислот цитозину в нейтральному водному середовищі. Виявлено, що люмінесценція представлена широкою смугою з нечітко вираженим порогом з довжиною хвилі 340 нм та розмитим максимумом у спектральній ділянці 365–380 нм. Показано, що ця крива люмінесценції відображає флуоресценцію. Уперше проведено експерименти зі збудженням люмінесценції нейтрального водного розчину молекул цитозину за одночасної дії випромінювання ксенонової лампи та лазерного променя неперервної генерації з довжиною хвилі 530 нм та потужністю 0.25 Вт. Установлено, що за даних експериментальних умов крива люмінесценції набуває якісно нової форми — поріг люмінесценції зміщується в короткохвильову ділянку, а на кривій люмінесценції виникає додатковий максимум з довжиною хвилі 410 нм. Пояснено фізичну природу цього незвичайного феномену.

Ключові слова: цитозин, люмінесценція, лазерний промінь, збудження, молекулярна смуга, повільні електрони.

DOI: <https://doi.org/10.30970/jps.26.4802>

I. ВСТУП

Життя на Землі залежить як прямо, так і опосередковано від впливу видимого та ультрафіолетового випромінювання Сонця, яке сприяє процесам, що не тільки забезпечують подальше існування життя на планеті, але й є ключем до еволюції у вигляді мутацій. Тому на сьогодні фотофізичні характеристики азотистих основ нуклеїнових кислот є предметом активних досліджень [1–4]. Причинами цього є вивчення механізмів фотоіндукованого пошкодження біологічних структур, а також потреби з боку новітніх біотехнологій. За рахунок токсичного впливу ультрафіолетового випромінювання (УФ) на живі організми важливо зрозуміти їхній ефект на молекулярному рівні — руйнування структури ДНК, РНК та їхніх складників. УФ-випромінювання, поглинене нуклеїновими кислотами, може викликати каскад небезпечних фотохімічних подій і потенційно призвести до пошкодження генетичного коду. Руйнування клітин та біологічних структур під дією ультрафіолетового випромінювання — актуальне питання не лише фізики, але й біології та медицини. Оскільки насамперед руйнуються азотисті основи цих складників, необхідно дізнатися, як взаємодіють випромінювання та нуклеїнова кислота та які наслідки можуть бути викликані ультрафіолетовим випромінюванням. Першою стадією його впливу на молекулярному рівні є утворення збуджених електронно-коливних станів молекул. Надалі збуджені стани беруть участь у фотоіндукованих, а також у термічно активованих реакціях, навіть у випадках, коли вважається, що беруть участь лише основні стани молекул. Особлива роль відводиться метастабільним триплетним станам, які внаслідок своїх фізичних особливостей сприяють першопричинній реакції

складних біологічних процесів, зокрема фотосинтезу, ферментативного каталізу, а також деструктивним реакціям.

У цій статті описано вивчення люмінесценції молекул цитозину під впливом електромагнітного випромінювання ультрафіолетового та видимого діапазонів.

II. ЕКСПЕРИМЕНТ

Спектри люмінесценції досліджено за допомогою високочутливого, сучасного спектрофлуориметра RF-6000 компанії Shimadzu [8], блок-схема якого показана на рис. 1. Джерелом випромінювання є ксенонова лампа з енергією квантів від 6.2 до 1.38 eV (довжини хвиль від 200 нм до 900 нм). У комплектації приладу передбачено кварцову кювету для розчинів, спеціальний тримач кювет, який забезпечує стабільну геометрію експерименту з кутами опромінення та спостереження люмінесценції — 45°. Крім того, у цьому експерименті прилад RF-6000 був доповнений джерелом лазерного випромінювання, промінь якого встановлено під кутом 45° до кута опромінення від ксенонової лампи. Параметри лазера такі: режим — неперервний, довжина хвилі 530 нм, потужність 0.25 Вт. Нейтральний розчин цитозину приготовлено на основі дистильованої води та препарату цієї азотистої основи фірми Sigma-Aldrich (чистота 99%). Випромінювання люмінесценції спрямовували на вхідну щільну дифракційного монохроматора й реєстрували детектором. Керування експериментом здійснювалося персональним комп'ютером із вбудованим програмним забезпеченням. Спектрофлуориметр "Shimadzu RF-6000" має високу чутливість та широкий спектральний діапазон і дає змогу досліджувати флуоресценцію, біоломі-



несценцію, хемілюмінесценцію та електролюмінесценцію зразків у різних агрегатних станах і модифікаціях: рідин, порошоків, пластин, плівок. Поєднання автоматичного режиму пошуку оптимальної довжини хвилі збудження/емісії зразка й високої швидкості сканування спектрів дає змогу швидко виконати вимірювання, що забезпечує високу точність і хорошу відтворюваність одержуваних результатів.

Для виділення потрібного діапазону спектра передбачена установка спеціальних світлофільтрів, які розташовують на вихідній щілині ксенонової лампи та перед вхідною щілиною монохроматора.

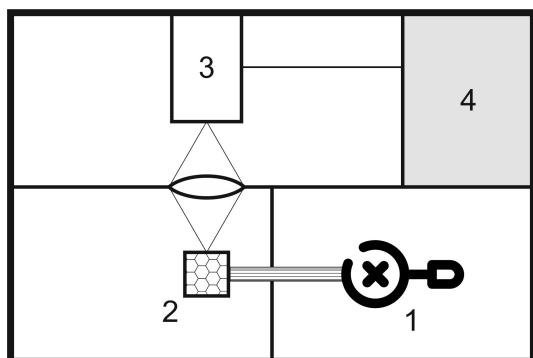


Рис. 1. Блок-схема експерименту з дослідження люмінесценції водного розчину молекул цитозину: 1 — ксенонова лампа; 2 — кювета з розчином цитозину; 3 — дифракційний монохроматор; 4 — вихід на ПК

Fig. 1. Experimental setup for studying the luminescence of a liquid solution of cytosine molecules: 1 — xenon lamp; 2 — reservoir with cytosine solution; 3 — diffraction monochromator; 4 — output to PC

III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У цій роботі отримані нові дані з фотолюмінесценції нейтральних водних розчинів цитозину. В дослідженнях, які відомі нам з літератури, як розчинник ніколи не виступала чиста, дистильована вода. На рис. 2 показана фотолюмінесценція водного розчину цитозину за кімнатної температури, яка ініційована випромінюванням ксенонової лампи з довжиною хвилі 280 нм. Видно, що крива люмінесценції має нечітко виражений поріг за довжини хвилі 340 нм та розмитого максимуму в спектральній ділянці 365–380 нм. На нашу думку, наведена крива є проявом лише флуоресценції, а фосфоресценція відсутня взагалі. Її відсутність можна пояснити впливом рН-розчинників.

Люмінесценцію цитозину в розчині води з дієтиловим ефіром за кімнатної температури, спричинену ультрафіолетовим випромінюванням, досліджували в роботах [5, 6]. У праці [7] люмінесценцію вивчали під час УФ-опромінювання розчину цитозину, який заморожували до температури рідкого азоту. Розчинниками слугували пропіленгліколь та/або пропіленгліколь з водою у співвідношенні 1:1 для підвищення інтенсивності спектрів люмінесценції. Порівняння результатів роботи [5] з результатами праць [6, 7] показа-

ло їхню істотну розбіжність. Зокрема, це стосується значень довжин хвиль для максимумів люмінесценції. Така розбіжність може бути пов'язана з труднощами реєстрації слабкої інтенсивності випромінювання люмінесценції, недостатнім ступенем чистоти препаратів та впливом рН-розчинника. Результати роботи [5] (див. рис. 3) відрізняються і від наших даних. Зокрема, не збігаються розташування максимумів кривих люмінесценції та поведінки кривих у порозі та їх спаду.

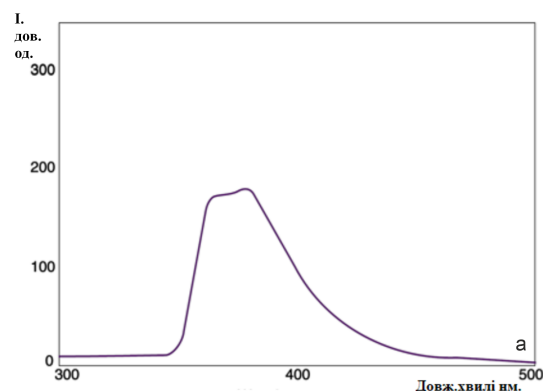


Рис. 2. Фотолюмінесценція цитозину, ініційована випромінюванням ксенонової лампи з довжиною хвилі 280 нм
Fig. 2. Cytosine photoluminescence initiated by xenon lamp radiation with a wavelength of 280 nm

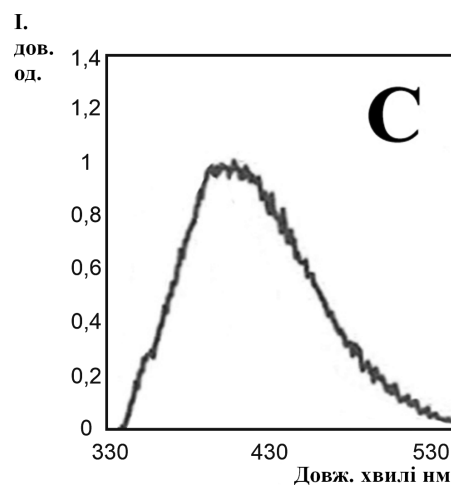


Рис. 3. Фотолюмінесценція цитозину, яка ініційована випромінюванням із довжиною хвилі 280 нм [5]
Fig. 3. Cytosine photoluminescence initiated by radiation with a wavelength of 280 nm [5]

Фотофосфоресценцію нейтральних водних розчинів цитозину, а також його плівок не спостерігали й у більш ранніх дослідженнях, зокрема [5–7, 9]. Водночас зі зростанням рН-розчину фосфоресценція стає помітною [7]. Так, якщо рН = 11.5, то квантовий вихід фосфоресценції вже становить третину квантового виходу флуоресценції [7]. Для появи фосфоресценції необхідна достатня заселеність першого збудженого триплетного цитозину T_1 , радіаційний розпад якого й зумовлює фосфоресценцію. На сьогодні вважається,

що основним механізмом заселення стану T_1 під час фотозбудження є так звана інтеркомбінаційна конверсія (міжсистемний кросінг), коли внаслідок розпаду першого збудженого синглетного стану S_1 відбувається заселення триплетного стану T_1 . Перший триплетний стан енергетично розташований нижче від першого синглетного стану (див. рис. 4). Тому спектр фосфоресценції буде зміщений відносно спектра флуоресценції в ділянку довших хвиль. На сьогодні вважають, що основним механізмом утворення стану T_1 під час фотозбудження є так звана інтеркомбінаційна конверсія (міжсистемний кросінг), коли внаслідок розпаду першого збудженого синглетного стану S_1 відбувається заселення триплетного стану T_1 (див. рис. 4).

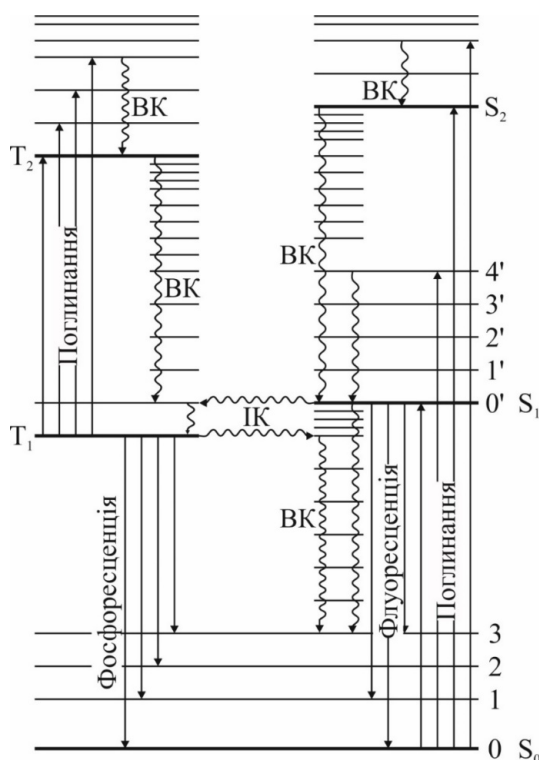


Рис. 4. Електронно-коливні переходи в молекулі: S_0 — основний стан; S_1 , S_2 і T_1 , T_2 — збуджені синглетні й триплетні стани відповідно; 0, 1, 2... або 0', 1', 2'... електронні та коливні стани; ВК — внутрішня конверсія (переходи електрона без зміни спіну); ІК — інтеркомбінаційна конверсія (переходи електрона зі зміною спіну)

Fig. 4. Electron-vibrational transitions in the molecule: S_0 is the ground state; S_1 , S_2 and T_1 , T_2 are excited singlet and triplet states, respectively; 0, 1, 2... or 0', 1', 2'... are the electronic and vibrational states; ВК is the internal conversion (transitions of an electron without a change in spin); ІК is the intercombination conversion (transitions of an electron with a change in spin)

Проведений у роботі [10] квантово-механічний розрахунок показав помітну ймовірність заселення триплетного стану T_1 цитозину за рахунок міжсистемного кросінгу методом надшвидкої внутрішньої конверсії електронно-збуджених синглетних станів. Той факт, що в експериментах із нейтральними розчинами цитозину фосфоресценція не спостерігається, мо-

жна пояснити так: а) квантовий вихід фосфоресценції дуже малий, а тому її реєстрація поза можливостями експерименту; б) у нейтральному водному розчині цитозину відбувається ефективна дезактивація триплетних станів T_1 . У літературі на підставі чисельних експериментальних досліджень зазначено, що фосфоресценція (триплет-синглетне випромінювання) повністю гаситься в нейтральному водному розчині за кімнатної температури [5].

Водночас описана вище фізична картина люмінесценції нейтрального водного розчину цитозину може змінитися за наявності інтенсивного електромагнітного поля (ЕМП).

Для створення ЕМП ми провели експерименти зі збудження водного розчину цитозину одночасною дією випромінювання ксенонової лампи та лазерного променя. Отриманий результат показано на рис. 5, з якого видно якісну зміну в спектрі люмінесценції. Зокрема, поріг люмінесценції зміщується в короткохвильову ділянку, а на кривій люмінесценції виникає додатковий максимум за довжини хвилі 410 нм.

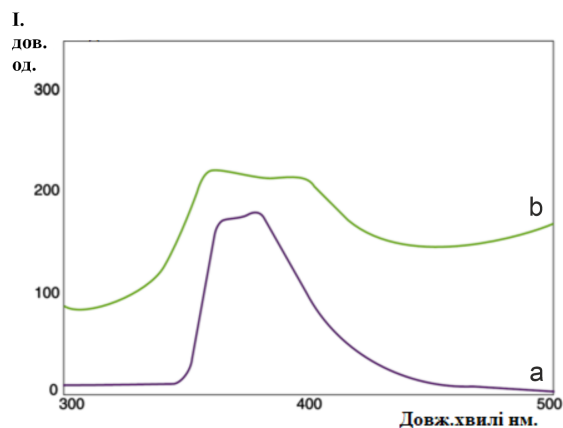


Рис. 5. Фотоліумінесценція цитозину: а — ініційована випромінюванням ксенонової лампи з довжиною хвилі 280 нм; б — ініційована одночасною дією випромінювання ксенонової лампи з довжиною хвилі 280 нм та лазера з довжиною хвилі 530 нм

Fig. 5. Photoluminescence of cytosine: a — initiated by the radiation of a xenon lamp with a wavelength of 280 nm; b — initiated by the simultaneous action of the radiation from a xenon lamp with a wavelength of 280 nm and a laser with a wavelength of 530 nm

Постає питання щодо фізичної природи цього феномену. Напрошується думка про включення невідомого механізму фосфоресценції за наявності інтенсивного ЕМП. На наш погляд, механізм появи другого максимуму (див. рис. 5) такий. Дія випромінювання ксенонової лампи з довжиною хвилі 280 нм приводить до збудження синглетних станів S_1 , а лазерне випромінювання їх переводить у більш збуджені стани S_n . У теоретичному дослідженні [2] щодо розуміння флуоресценції ДНК було передбачено механізм утворення синглетних ексимерів цитозину (фотодимерів). Ми прогнозуємо, що утворене лазером інтенсивне ЕМП сприяє утворенню фотодимерів цитозину. Ці димери внаслідок інтеркомбінаційної конвер-

сії (міжсистемний кросинг), коли в результаті розпаду першого збудженого синглетного стану S_1 відбувається заселення триплетного стану T_1 , своїм розпадом помітно збільшують заселеність триплетних станів T_1 . Своєю чергою ці стани, внаслідок явища інтеркомбінаційної конверсії, спричиняють заселення триплетних станів T_i . Радіаційний розпад триплетних станів викликає фосфоресценцію, яка і є причиною появи другого максимуму в ділянці довжин хвиль 410 нм. Поряд із цим є ймовірність утворення ексимерних станів молекул цитозину, що релаксують до триплетних станів мономерів цитозину, які випромінюють на довжині 410 нм. Бажаним тут є проведення відповідних теоретичних розрахунків.

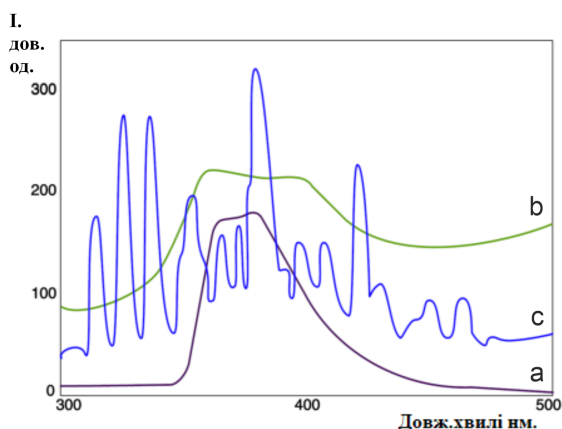


Рис. 6. Спектр люмінесценції цитозину: а — під час збудження випромінюванням ксенонової лампи з довжиною хвилі 280 нм; б — за одночасної дії випромінювань ксенонової лампи з довжиною хвилі 280 нм та лазера з довжиною хвилі 530 нм; с — під час збудження пучком електронів енергією в 100 еВ [11]

Fig. 6. The luminescence spectrum of cytosine: a — when excited by the radiation from a xenon lamp with a wavelength of 280 nm; b — with the simultaneous action of the radiation from a xenon lamp with a wavelength of 280 nm and a laser with a wavelength of 530 nm; c — when excited by an electron beam with an energy of 100 eV [11]

Цікавим є також порівняння наших даних (див. рис. 5) зі спектром люмінесценції газової фази цитозину, ініційованої пучком електронів (див. рис. 6), який одержано в роботі [11]. Взаємодія повільних електронів із молекулами цитозину в газовому стані супроводжується виникненням у діапазоні 300–500 нм спектра люмінесценції складної форми, що свідчить про інтенсивну фрагментацію молекул. Спектр випромінювання цитозину формують процеси дисоціативного збудження молекул, дисоціативного збудження з йо-

нізацією, збудження електронних рівнів вихідної молекули та молекулярного йона. При цьому зазначимо, що в умовах газової фази цитозину дезактивація метастабільних триплетних станів практично відсутня. Автори роботи [11], внаслідок ідентифікації спектра люмінесценції, дійшли висновку, що максимум у ділянці довжин хвиль 370 нм відповідає флуоресценції, а максимум у ділянці довжин хвиль 410 нм — фосфоресценції.

Таким чином, виходячи з вищевказаного можна вважати, що перший максимум на кривій люмінесценції при її збудженні ксеноновою лампою та лазером (див. рис. 5) обумовлений за рахунок флуоресценції, а другий — за рахунок фосфоресценції. Таким чином в проведених експериментах звертається увага на високу ймовірність заселення метастабільних триплетних станів цитозину міжсистемним кросингом шляхом внутрішньої конверсії електронно-збуджених синглетних станів. Зазначимо, що метастабільні триплетні стани відіграють ключову роль у фотохімії азотистих основ нуклеїнових кислот [10] і прогнозовано мають великий вплив на розвиток нових біотехнологій.

IV. ВИСНОВКИ

За допомогою високочутливого, сучасного спектрофлуориметра RF-6000 компанії Shimadzu виконані дослідження фотолюмінесценції нейтрального водного розчину молекул цитозину. Встановлено, що люмінесценція представлена широкою смугою з нечітко вираженим порогом з довжиною хвилі 340 нм та розмитим максимумом в спектральній ділянці 365–380 нм. Показано, що крива люмінесценції відображає флуоресценцію, а фосфоресценція відсутня взагалі. Отримані результати порівнюються з даними відомих досліджень. Виявлено розбіжність отриманих результатів і даних інших авторів. Показано, що ці розбіжності насамперед зумовлені кислотністю водних середовищ молекул цитозину. Вперше виконано експерименти зі збудження нейтрального водного розчину цитозину за одночасної дії випромінювання ксенонової лампи та лазерного променя неперервної дії з довжиною хвилі 530 нм та потужністю 0.25 Вт. Установлено, що за даних експериментальних умов поріг люмінесценції зміщується в короткохвильову ділянку, а на кривій люмінесценції виникає додатковий максимум з довжиною хвилі 410 нм, який пояснюється фосфоресценцією.

[1] C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen, P. M. Hare, B. Kohler, *Chem. Rev.* **104**, 4 (2004); <https://doi.org/10.1021/cr0206770>.

[2] G. Olaso-González, D. Roca-Sanjuán, L. Serrano-Andrés, M. Merchán, *J. Chem. Phys.* **125**, 231102 (2006); <https://doi.org/10.1063/1.2408411>.

- [3] I. I. Shafranyosh, M. I. Sukhoviya, *J. Chem. Phys.* **137**, 184303 (2012); <https://doi.org/10.1063/1.4765307>.
- [4] R. Improta, F. Santoro, L. Blancafort, *J. Chem. Rev.* **116**, 6 (2016); <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00444>.
- [5] H. Borresen, *Acta Chem. Scand.* **17**, 4 (1963); <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.17-0921>.
- [6] S. Udenfriend, P. Zaltzman, *A. Biochem.* **3**, 1 (1962); [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(62\)90043-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(62)90043-X).
- [7] J. W. Longworth, R. O. Rahn, R. G. Shulman, *J. Chem. Phys.* **45**, 2930 (1966); <https://doi.org/10.1063/1.1728048>.
- [8] *Shimadzu Spectrofluorophotometer RF-6000. Instruction Manual* (Shimadzu Corporation, Kyoto, 2015).
- [9] N. Ya. Dodonova, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **18**, 2 (1993); [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)80052-B](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)80052-B).
- [10] M. Merchán, L. Serrano-Andrés, M. A. Robb, L. Blancafort, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 6 (2005); <https://doi.org/10.1021/ja044371h>.
- [11] M. I. Sukhovija, V. N. Slavik, I. I. Shafranyosh, L. L. Shimon, *Biopolym. Cell.* **7**, 77 (1991); <https://doi.org/10.7124/bc.000302>.

SPECIFICS OF THE PHOTOLUMINESCENCE OF CYTOSINE IN WATER SOLUTION

V. Shpenyk, M. Shafranyosh, Sh. Molnar, O. Shpenyk, M. Sukhoviia, I. Shafranyosh
Uzhhorod National University, 54, Voloshyna St., Uzhhorod, UA-88000, Ukraine,
e-mail: shpenik@hotmail.com

The paper presents the results of the studies into the photoluminescence of cytosine molecules in a neutral liquid medium induced by the radiation of a xenon lamp with a wavelength of 280 nm. It was found that the luminescence is represented by a wide band with a vague threshold at a wavelength of 340 nm and a blurred maximum in the spectral region of 365–380 nm. It is shown that the presented luminescence curve reflects fluorescence, while phosphorescence is absent entirely. The lack of phosphorescence can be explained by the effect of the solvent. The obtained results are compared with the data of known studies. The discrepancies found may be primarily due to the pH of the solvents used in the previous studies. It is the first time that experiments with the excitation of luminescence of a neutral liquid solution of cytosine molecules under the simultaneous action of xenon lamp radiation with a wavelength of 280 nm and a continuous laser beam with a wavelength of 530 nm and a power of 0.25 W have been performed. It has been established that under these experimental conditions the luminescence curve acquires a qualitatively new form - the luminescence threshold is shifted to the short-wavelength region, and the luminescence curve has an additional maximum at a wavelength of 410 nm. An explanation of the physical nature of this phenomenon is given, which is that the intense electromagnetic field generated by the laser promotes the efficient formation of singlet excimers of cytosine (photodimers). In the process of their decay, cytosine photodimers form excited monomers in singlet states which, by intercombinational conversion (intersystem crossing), intensively populate metastable triplet states. The radiation decay of the formed metastable triplet states causes phosphorescence, which is the reason for the appearance of the second maximum in the wavelength range of 410 nm. Attention is drawn to the fact that metastable triplet states play a key role in the photochemistry of nucleic acid bases and presumably will have a major impact on the development of new biotechnologies.

Key words: cytosine, luminescence, laser beam, excitation, molecular band, slow electrons.