

МЕТОДИ

УДК 539.211

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФК В ПРИСУТСТВИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПО ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПОРИСТОГО КРЕМНИЯ

В. Б. ШЕВЧЕНКО¹, А. И. ДАЦЕНКО¹, О. В. ШАБЛЫКИН², Т. В. ОСАДЧУК²,
А. М. ЛЯХОВ², Ю. В. ПИВОВАРЕНКО³, В. А. МАКАРА^{1,3}

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: shevchenko@univ.kiev.ua;

²Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев;

³ННЦ «Физико-химическое материаловедение» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко и НАН Украины

Получены спектры флуоресценции пористого кремния, модифицированного водными растворами биологически активных веществ, а также спектры флуоресценции пористого кремния, модифицированного монослоями из лецитина, сформированными на поверхности водных растворов биологически активных веществ. На основании анализа полученных спектров сделаны выводы о влиянии исследованных веществ на содержание АФК в водных растворах и лецитиновых монослоях.

Ключевые слова: пористый кремний, фотолюминесценция, ДНК, РНК, фурин, димедрол, изадрин.

Пористый кремний (ПК) – слой нанокристаллического кремния, сформированный на поверхности монокристалла кремния [1–3].

При освещении светом с длиной волны 337 нм ПК люминесцирует в красной области спектра, причем интенсивность его фотолюминесценции (ФЛ) коррелирует со степенью модификации ПК активными формами кислорода (АФК) [1–6]. Существование такой корреляции позволяет использовать ПК для определения АФК в растворах и пленках.

Цель нашей работы – определение АФК в водных растворах биологически активных веществ, а также в монослоях из лецитина, сформированных на поверхности водных растворов биологически активных веществ.

Материалы и методы

ПК получали методом электрохимического травления пластин монокристаллического кремния р-типа проводимости (удельное сопротивление 10 Ом·см). Травление пластин монокристаллического кремния осуществляли в электролизере, заполненном смесью из равных объемов 48%-го раствора HF и 96%-го этанола, в который погружали анод, изготовленный из пластины монокристаллического кремния. После пропускания в течение 5 мин тока с

плотностью 20 мА/см² поверхность кремния приобретала характерную для ПК способность люминесцировать в видимой области [1–4]. Увеличенное изображение ПК, полученного нами методом электрохимического травления, приведено на рис. 1.

Для возбуждения ФЛ ПК использовали азотный импульсный лазер ИЛГИ-503 (Россия), излучающий монохроматический свет с длиной волны 337 нм.

Для регистрации ФЛ ПК использовали фотоэлектронный умножитель ФЭУ-22 с фотокатодом Ag-O-Cs, чувствительным к свету с длинами волн 400 – 1000 нм.

Следует отметить, что из-за взаимодействия с АФК воздуха ФЛ немодифицированного ПК при длительном хранении может изменяться. По этой причине в каждом эксперименте ФЛ модифицированного фрагмента ПК сравнивали исключительно с ФЛ немодифицированного фрагмента этого же образца ПК.

В проведенных экспериментах изучали ФЛ ПК, модифицированного водными растворами нуклеиновых кислот, dAMP, ингибиторов фурина: 5-амино-4-ациламино-1H-пиразолов, седативных анестетиков: димедрола и изадрина, а также ФЛ ПК, модифицированного монослоями из лецитина, сформированными на

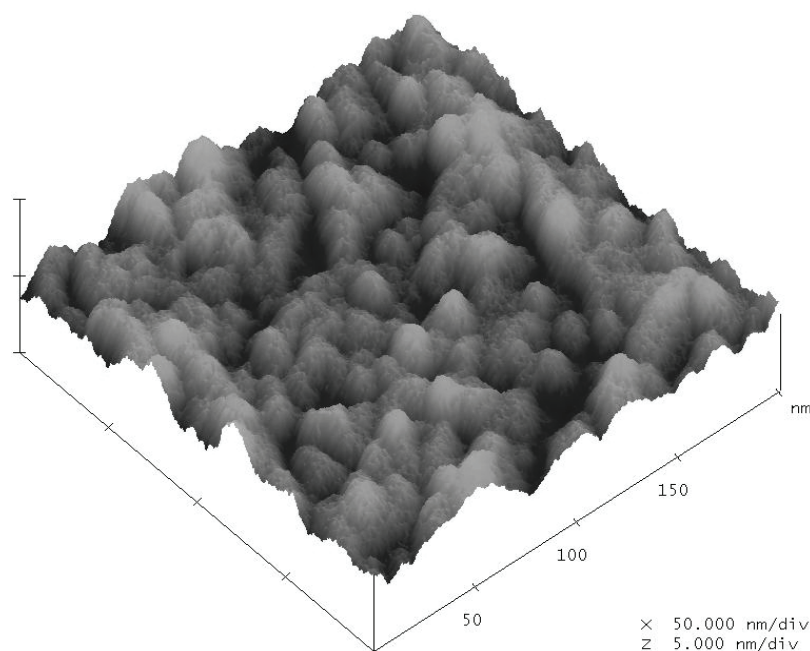


Рис. 1. Изображение пористого кремния, полученное с помощью атомно-силового микроскопа Nanoscope IIIA Scanning Probe Microscope (Digital Instruments, США)

поверхности водных растворов димедрола и изадрина. Выбор объектов исследования определялся интересами его участников.

Модифицированный ПК получали нанесением на его поверхность ~ 1 мкл исследуемого раствора или фрагмента лецитинового монослоя, сформированного на поверхности водного раствора исследуемого седативного препарата, и последующей сушкой ПК при комнатной температуре [5, 6].

В работе использовали: тимусную ДНК, дрожжевую РНК и dAMP (Fluska, Швейцария), димедрол (Serva, Германия), изадрин и лецитин (Sigma, США) и ингибиторы фурина – 5-амино-4-ациламино-1H-пиразолы.

Синтез 5-амино-4-ациламино-1H-пиразолов (3.4.21.75) осуществляли в соответствии с [7].

Ингибирующее действие 5-амино-4-ациламино-1H-пиразолов определяли по их влиянию на протеолитическую активность фурина в соответствии с [8].

Результаты и обсуждение

АФК в водных растворах нуклеотидов. При изучении спектров ФЛ ПК, модифицированного водными растворами нуклеиновых кислот, было установлено, что интенсивность ФЛ ПК, модифицированного водными растворами ДНК (рис. 2, спектр 2), всегда превышает

интенсивность ФЛ ПК, модифицированного водными растворами РНК (рис. 2, спектр 3).

Полученный результат свидетельствует о том, что в водных растворах ДНК концентрация АФК всегда выше, чем в водных растворах РНК. Такое соотношение концентраций АФК мы объясняем тем, что АФК, присутствующие в водных растворах ДНК, окисляют только ПК, а АФК, присутствующие в водных растворах РНК, окисляют как ПК, так и РНК. Давая такое объяснение, мы исходим из того, что окислению кислородом более подвержены основания одноцепочечных НК, не задействованные на образование водородных связей [9, 10].

Изучение спектров ФЛ ПК, модифицированного водными растворами dAMP (рис. 2, спектр 4), позволяет установить, что АФК в таких растворах отсутствуют. Полученный результат мы объясняем тем, что все АФК, содержащиеся в использованных нами водных растворах dAMP прореагировали с основаниями dAMP. При этом мы учитываем условия, при которых аденин окисляется растворенным кислородом (рН 7, t = 0–20 °С [9]).

АФК в водных растворах 5-амино-4-ациламино-1H-пиразолов – ингибиторов фурина. При изучении спектров ФЛ ПК, модифицированного водными растворами 5-амино-4-

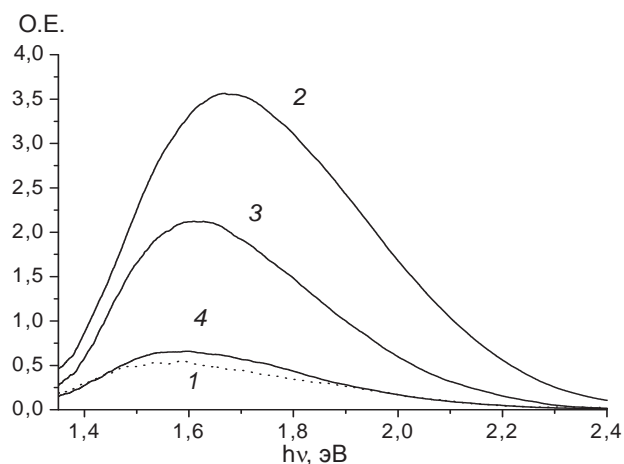


Рис. 2. Спектры ФЛ ПК: 1 – немодифицированный ПК; 2 – ПК, модифицированный водным раствором ДНК; 3 – ПК, модифицированный водным раствором РНК; 4 – ПК, модифицированный водным раствором dAMP. Спектры ФЛ регистрировали через 2 часа после нанесения растворов

ацетиламино-1Н-пиразолов, установлено, что интенсивность ФЛ ПК, модифицированного растворами 5-амино-4-бензоиламино-3-(4-метилфениламино)-1Н-пиразола и 5-амино-4-ацетиламино-3-(4-метилфениламино)-1Н-пиразола (рис. 3), хорошо коррелирует с их ингибирующим действием на фурин: 5-амино-4-бензоиламино-3-(4-метилфениламино)-1Н-пиразол ингибирует протеолитическую активность фурина на 73%, а 5-амино-4-ацетиламино-3-(4-метилфениламино)-1Н-пиразол – на 98% [8].

Обнаруженная корреляция позволяет нам предположить, что ингибирующее действие 5-амино-4-бензоиламино-3-(4-метилфениламино)-1Н-пиразол и 5-амино-4-ацетиламино-3-(4-метилфениламино)-1Н-пиразола на фурин может быть обусловлено окислением фурина АФК. Следует отметить, что такой механизм взаимодействия фурина с ингибиторами его протеолитической активности ранее не рассматривался [8].

АФК в водных растворах димедрола и изадрина. При изучении спектров ФЛ ПК, модифицированного водными растворами димедрола и изадрина было установлено, что и димедрол, и изадрин стимулируют пролонгированное окисление ПК (рис. 4).

Изучение спектров ФЛ ПК, модифицированного лецитиновыми монослоями, сформированными на поверхности водных растворов димедрола и изадрина, позволило установить,

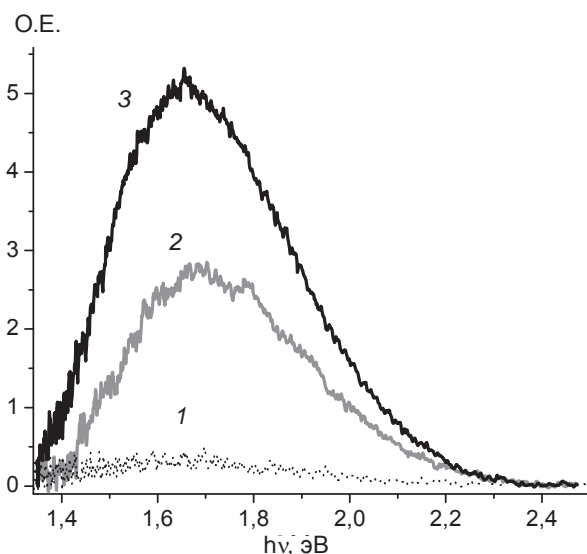


Рис. 3. Спектры ФЛ ПК: 1 – немодифицированного; 2 – модифицированного водным раствором 5-амино-4-бензоиламино-3-(4-метилфениламино)-1Н-пиразола; 3 – модифицированного водным раствором 5-амино-4-ацетиламино-3-(4-метилфениламино)-1Н-пиразола. Спектры ФЛ регистрировали через 2 часа после нанесения растворов

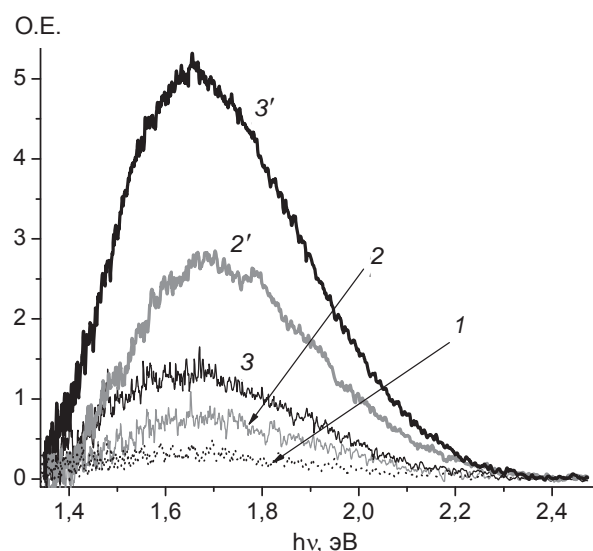


Рис. 4. Спектры фотолуминесценции ПК: 1 – немодифицированного; 2, 2' – модифицированного раствором димедрола; 3, 3' – модифицированного раствором изадрина. Спектры ФЛ регистрировали через 1 сутки (2, 3) и через 14 суток (2', 3') после нанесения растворов

что в присутствии димедрола и изадрина также происходит пролонгированное окисление лецитиновых монослоев (рис. 5).

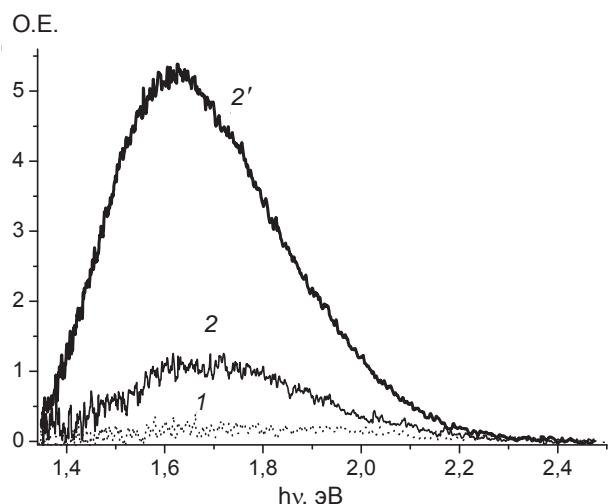


Рис. 5. Спектры фотолюминесценции ПК: 1 – немодифицированного; 2 – модифицированного монослоем лецитина; через 1 сутки после нанесения; 2' – модифицированного монослоем лецитина; через 14 суток после нанесения

Полученные результаты позволяют нам предположить, что в основе седативного действия димедрола и изадрина лежит окисление липидов мембран нейронов АФК [11,12]. Выдвигая такое предположение, мы исходим из того, что электропроводность БЛМ, сформированных из окисленных липидов, на порядок выше, чем электропроводность БЛМ, сформированных из неокисленных липидов [13]. По нашему мнению, увеличение электропроводности мембран нейронов может сопровождаться падением мембранных потенциалов и как следствие – седативным действием димедрола и изадрина.

Следует отметить, что традиционно анестезирующее действие димедрола объясняется увеличением толщины липидного слоя биологических мембран [14], а действие изадрина – активацией аденилатциклазной сигнальной системы клетки [15].

Полученные результаты позволяют, по нашему мнению, сделать следующие выводы:

- биологически активные вещества могут влиять на содержание АФК в водных растворах и в монослоях из лецитина, сформированных на поверхности водных растворов биологически активных веществ;

- свойства веществ биологического происхождения и биологически активных веществ, в частности регистрируемые *in vitro*, могут быть опосредованы через АФК.

ВИЗНАЧЕННЯ АФК У ПРИСУТНОСТІ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЗА ФЛУОРЕСЦЕНЦІЄЮ ПОРИСТОГО КРЕМНІЮ

В. Б. Шевченко¹, О. І. Даценко¹,
О. В. Шабликін², Т. В. Осадчук²,
О. М. Ляхов², Ю. В. Пивоваренко³,
В. А. Макара^{1,3}

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: shevchenko@univ.kiev.ua;

²Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ;

³НУЦ «Фізико-хімічне матеріалознавство» Київського національного університету імені Тараса Шевченка і НАН України

Одержано спектри флуоресценції пористого кремнію, модифікованого водними розчинами біологічно активних речовин та речовин біологічного походження, а також спектри флуоресценції пористого кремнію, модифікованого моношарами лецитину, сформованими на поверхні водних розчинів біологічно активних речовин. На підставі аналізу одержаних спектрів зроблено висновки щодо впливу досліджених речовин на вміст АФК.

Ключові слова: пористий кремній, фотолюмінесценція, ДНК, РНК, фурін, димедрол, изадрин.

ESTIMATION OF THE ROS IN THE PRESENCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES BY POROUS SILICON FLUORESCENCE

V. B. Shevchenko¹, O. I. Dacenko¹,
O. V. Shablykin², T. V. Osadchuk²,
A. M. Lyakhov², Y. V. Pivovarenko³,
V. A. Makara^{1,3}

¹Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: shevchenko@univ.kiev.ua;

²Institute of Bioorganic Chemistry and Petroleum Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine;

³STC Physico-Chemical Center of Materials Science of Taras Shevchenko Kyiv National University and NAS of Ukraine

Summary

The fluorescence spectra of the porous silicon modified by water solutions of biologically active materials and materials of biological origin are recorded as well as the fluorescence spectra of the

porous silicon modified by lecithin monolayers grown on the surface of water solutions of the biologically active materials. The analysis of the obtained spectra made it possible to conclude on the effect of the studied materials on the content of ROS.

Key words: porous silicon, photoluminescence, DNA, RNA, furin, diphenylhydramine hydrochloride, isadrin.

1. *Cullis A. G., Canham I. T., Calcott P. D. J.* // *J. Appl. Phys.* – 1997. – **82**. – P. 909–965.
2. *Lopez H. A., Chen X. I., Jenekhe S. A., Fauchet Ph. M.* // *J. Luminescence.* – 1998. – **80**. – P. 115–118.
3. *Dacenko O. I., Makara V. A., Naumenko S. M. et al.* // *Ibid.* – 1999. – **81**. – P. 263–270.
4. *Gaburro Z., Pavesi I., Baratto C. et al.* // *Front. Multifunctional Nanosystems.* – 2002. – P. 399–412.
5. *Fenny P. Mathew, Evangelyn C. Alocilija.* // *Biosens. Bioelect.* – 2005. – **20**. – P. 1656–1661.
6. *Пивоваренко Ю. В., Шевченко В. Б., Ляхов А. М., Макара В. А.* // *Физика живого.* – 2009. – **17**, № 2. – С. 40–43.
7. *Козаченко А. П., Шаблыкин О. В., Василенко А. Н. и др.* // *ЖОХ.* – 2010. – **80**, № 1. – С. 133–138.
8. *Кибирев В. К., Осадчук Т. В., Радавский Ю. Л.* // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 6. – С. 5–18.
9. *Шабарова З. А., Богданов А. А.* / *Химия нуклеиновых кислот и их компонентов.* – М.: Химия, 1978. – 584 с.
10. *Кузнецова А. А., Кнорре Д. Г., Фёдорова О. С.* // *Усп. химии.* – 2009. – **78**, № 7. – С. 714–734.
11. *Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G.* // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – **39**. – P. 1265–1290.
12. *Владимиров Ю. А. Осипов А. Н., Клебанов Г. И.* // *Биохимия.* – 2004. – **69**, № 1. – С. 103–113.
13. *Антонов В. Ф.* / *Липиды и ионная проницаемость мембран.* – Москва: Наука, 1982. – 151 с.
14. *Eckenhoff R. G.* // *Mol. Interv.* – 2001. – **1**, N 5. – P. 258–268.
15. *Ляхов О. М., Прокопенко В. В., Прокопенко Р. А., Могилевич С. Є.* // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – **78**, № 6. – С. 64–69.

Получено 02.02.2012