

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА  
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ГУРЗАДЯН ГАГИК ГРИГОРЬЕВИЧ

ЛАЗЕРНАЯ ФОТОИОНИЗАЦИЯ ДНК

9.00.02 - биофизика

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора физико-математических наук  
в виде научного доклада

ЕРЕВАН 1996

Работа выполнена в НПО Лазерная Техника при Ереванском государственном университете и в Институте Макса Планка радиационной химии, Германия (Max-Planck-Institut für Strahlenchemie, Mülheim an der Ruhr)

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,  
профессор Бабян Ю.С.

доктор физико-математических наук,  
профессор Меликян А.О.

доктор химических наук,  
профессор Чибисов А.К.

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии НАН  
Республики Армения

Защита состоится " 20 " сентября 1996 г. в " 14 " часов на заседании Специализированного Совета 051 при Ереванском государственном университете (375049, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, Ереванский госуниверситет, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке университета.

Диссертация разослана " 1 " августа 1996 г.

Ученый секретарь Специализированного  
Совета, кандидат биологических наук

*Сайин*

Гонян С.А.

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Воздействие УФ излучения на одну из самых важных биомолекул, дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), привлекает внимание исследователей несколько десятилетий (Wang S.-Y., 1976). Подавляющее большинство работ посвящено исследованию фотохимии и фотобиологии нуклеиновых кислот при облучении ртутной лампой низкого давления. Длина волны УФ излучения при этом (254 нм) попадает на первую электронную полосу поглощения, что приводит к возбуждению первого электронного синглетного уровня  $S_1$  (Fisher G.J. and Johns H.E., 1976, Patrick M.H. and Rahn R.O., 1976, Patrick M.J., 1976, Jagger J., 1976, Harm W., 1980, Mitchell D.L. and Nairn R.S., 1989, Helene C., 1987, Sage E., 1993). Появление мощных нано- и пикосекундных лазеров генерирующих в УФ диапазоне позволило значительно расширить спектр исследуемых эффектов (Nikogosyan D.N., 1990, Cadet J. ea, 1987, Schulte-Frohlinde D. ea, 1990, Angelov D.A. ea, 1991). В частности, при высоких интенсивностях лазерного УФ излучения (длина волны 248-266 нм) происходит двухступенчатое поглощение излучения с возбуждением высоколежащих электронных уровней  $S_N$  молекул оснований нуклеиновых кислот и последующей ионизацией (Angelov D.A. ea, 1980, Gurzadyan G.G. ea, 1981, 1982, Zavilgelsky G.B. ea, 1984, Nikogosyan D.N., 1982, 1990). Использование эксимерного ArF лазера (длина волны 193 нм) позволяет одноквантово ионизовать ДНК и ее компоненты (Candeias L.P. ea, 1992, Görner ea, 1992, Gurzadyan G.G. and Görner H., 1992). Таким образом, с помощью лазерного излучения появляется возможность реализовывать химические и биологические процессы, свойственные ионизирующей радиации. Следует заметить, что в случае  $\gamma$ -облучения падающая энергия поглощается как биомолекулами, так и водой; более того, эффект косвенного действия (за счет ионизации и диссоциации воды и участия образующихся реакционноспособных радикалов в химических превращениях) в случае нуклеиновых кислот является главным. При лазерном же облучении происходит избирательное возбуждение хромофоров нуклеиновых кислот - азотистых оснований, с последующей ионизацией. Принципиальным отличием лазерного возбуждения (одноквантового с 193 нм и двухквантового с 248-270 нм) является возможность направленного воздействия в клетке на

нуклеиновые кислоты, не затрагивая при этом других компонент (белки, липиды).

Как известно,  $\gamma$ -радиолиз ДНК приводит к образованию целого ряда повреждений вторичной структуры ДНК: одно- и двуниевых разрывов, разрывов N-гликозидной связи, межнитевых сшивок (von Sonntag C., 1987). Гидратированный электрон и катион радикал основания, возникающие при лазерном возбуждении ДНК, могут привести к аналогичным эффектам. В то же время, дезактивация высоколежащих электронных уровней после возбуждения с ВУФ (в случае 193 нм: S<sub>2</sub>) приведет к заселению первого возбужденного S<sub>1</sub> уровня с последующим образованием "классических" фотопродуктов, специфичных для возбуждения с 254 нм: пиримидиновых димеров циклобутанового типа (5,6-дипиримидинов), фотогидратов и пиримидин(6-4)пиримидон аддуктов ((6-4)фотопродуктов). Таким образом, при возбуждении с длиной волны 193 нм будут образовываться два класса фотопродуктов: специфичных для  $\gamma$ -радиолиза и классического УФ облучения. Широкое применение ArF лазеров в медицине и хирургии актуализировало изучение механизмов воздействия лазерного излучения с длиной волны 193 нм (6.4 эВ) на ДНК, плазмиды, бактерии (Johnson-Tompson M. ea, 1984, Winckler K. ea, 1988, Rasmussen R.E. ea, 1989, Kochevar ea, 1989, 1990, 1991).

Эта проблема находится на стыке квантовой электроники, лазерной спектроскопии, молекулярной биофизики, фотохимии и фотобиологии. Выяснение молекулярных механизмов воздействия ионизирующего лазерного излучения на ДНК открывает новое направление в лазерной биомедицине связанное с использованием "неклассических" источников ионизирующего излучения - УФ и ВУФ лазеров.

Следует также отметить, что длина волны 193 нм попадает на край поглощения как воды (все эффекты исследуются в нейтральном водном растворе), так и используемых оптических элементов (линзы, призмы, кристаллы). В то же время, под действием мощного лазерного излучения пикосекундной длительности с длиной волны 210-270 нм в прозрачных средах могут иметь место различные нелинейные эффекты (например, двухфотонное поглощение). Изучение указанных эффектов представляется чрезвычайно актуальным для корректной интерпретации полученных результатов с биомолекулами, в частности, с нуклеиновыми кислотами.

Цель исследований: всесторонне исследовать фотофизику и фотохимию нуклеиновых кислот и их составляющих в условиях ионизации под действием

лазерного УФ излучения с длинами волн в диапазоне 193-270 нм и провести сравнительный анализ полученных результатов с таковыми классического низкоинтенсивного УФ облучения (254 нм). Для этой цели:

- создать источник лазерного излучения пикосекундной длительности в ультрафиолетовом диапазоне спектра с контролируемыми параметрами генерируемого излучения;
- исследовать нелинейные эффекты в воде под действием мощного пикосекундного лазерного излучения;
- исследовать фотофизику воздействия лазерного излучения на нуклеиновые кислоты, измерить квантовые выходы ионизации при одно- и двухквантовом возбуждении;
- выявить и исследовать фотопродукты и фотоповреждения, образующиеся при ионизации ДНК; измерить квантовые выходы их формирования;
- методом фотолиза определить эффективность безызлучательной внутренней конверсии со второго на первый возбужденный синглетный уровень нуклеиновых кислот;
- определить промежуточные звенья в цепи образования летальных повреждений в плаزمидях;
- выявить механизм инактивации плазмид и бактерий при возбуждении с длиной волны 193 нм, определить биологическую роль разрывов цепей ДНК; выявить различие протекания репарационных процессов в плазмидях и бактериях;

#### Научная новизна.

- выведены новые приближенные формулы для расчета углов синхронизма в нелинейных кристаллах; их точность превышает точность других имеющихся в литературе аналогичных формул;
- обнаружен новый эффект нелинейной дефокусировки лазерного излучения в нелинейно поглощающих средах;
- выявлен одноквантовый механизм ионизации молекул нуклеиновых кислот при лазерном возбуждении с 193 нм;
- систематически исследована фотохимия и фотобиология нуклеиновых кислот при облучении с 193 нм; выявлено образование целого класса фотопродуктов/ фотоповреждений (разрывы цепей ДНК, межнитевые сшивки, разрывы N-гликозидной связи, локальные денатурированные участки) с высоким квантовым выходом; выявлен ионизационный механизм формирования этих фотопродуктов;

впервые исследована инактивация четырех штаммов бактерий *E. coli* с различными дефектами в репарационной системе при лазерном облучении с длиной волны 193 и 216 нм, выяснен механизм их инактивации; выявлено, что основной мишенью является ДНК; основными летальными фотопродуктами в случае облучения *E. coli* K12 AB2480 (uvrA гена), дефектной относительно эксцизионной и пострепликативной репарации, являются пиримидиновые димеры; в случае же облучения AB1157 (дикий тип) основными летальными фотопродуктами являются продукты ионизации: одонитевые разрывы цепей ДНК, разрывы N-гликозидной связи, разрушение нуклеотидов;

- впервые измерена эффективность  $S_2 \rightarrow S_1$  перехода для ряда модельных компонентов нуклеиновых кислот: TpT, UpU, CpC, CpU, dCpT;

#### Практическая ценность работы:

1. Новый метод измерения chirpa пикосекундного излучения.
2. Новые формулы для расчета углов синхронизма в нелинейных кристаллах.
3. Новый метод определения коэффициента двухфотонного поглощения с помощью эффекта нелинейной дефокусировки лазерного излучения.
4. Ионизация молекул нуклеиновых кислот с помощью мощных УФ лазеров.
5. Лазерно-индуцированное эффективное образование одно- и двунитевых разрывов цепей ДНК, ковалентных межнитевых сшивок, свободных оснований, локальных денатурированных участков.
6. Механизм инактивации плазмид и бактерий *E. coli* при лазерном облучении с длиной волны 193 нм.
7. Выявление роли разрывов цепей ДНК как основного звена в цепи образования летальных повреждений при облучении с 254 и 193 нм.
8. Методика определения эффективности внутренней конверсии со второго на первый возбужденный синглетный электронный уровень с помощью лазерного фотолиза.

Практическая ценность работы также обуславливается широким использованием ArF эксимерных лазеров в медицине (в частности в глазной хирургии) и необходимостью учитывания имеющих место при этом нежелательных эффектов (ионизационные повреждения: разрывы цепей ДНК, сшивки и т.д.). Результаты полученные в приведенной работе нашли широкое применение в различных научных лабораториях мира (Wellman Laboratories of Photomedicine, Massachusetts General Hospital, USA; Max-Born Institute for Nonlinear Optics and Short Pulse Spectroscopy, Berlin; Humboldt University of Berlin, Germany; CEA-Saclay, Gif-sur-Yvette, France; Trinity College,

Dublin, Ireland; Science Applications International Corporation, Ohio, USA; и др.), что также подтверждается наличием множества цитирований на публикации автора (около 100 за период 1990-95).

Апробация работы. Основные положения и результаты были доложены на IV Internat. Symp. "Ultrafast Phenomena in Spectroscopy" (GDR, 1985); Респ. конференции молодых ученых и спец., Тбилиси, 1986; 4 координ. семинара "Динамика и активность биол.макромолекул: лазерный и компьютерный эксперимент", Ереван, 1988; 5th symposium on optical spectroscopy, SOS, Eisenach, GDR, 1988; 3rd Congress of the European Society for photobiology, Budapest, 1989; 4th National Conference "Laser and their applications", Plovdiv, Bulgaria, 1990; Internat. Conference on Laser in the Life Sciences, Guangzhou, China, 1990; 4th Congress of the European Society for photobiology, 1-6.9.91, Amsterdam, 1991; 5th Congress of the European Society for photobiology, 19-26. 9. 1993, Marburg; Radiation chemistry annual meeting, Munchen, 1993; 13.Vortragstagung der GDCh, Berlin, 1993; XV IUPAC Symposium on Photochemistry, July 17-22, 1994, Prague; 6th Congress of the European Society for Photobiology, 3-8. 9. 1995, Cambridge, 1995; International Conference of Radiation Chemistry, Sept. 1995, Wurzburg; на семинарах в Max-Planck Institute für Strahlenchemie, Mülheim an der Ruhr, Germany; CEA Saclay, France; Humboldt University of Berlin, Germany; Max-Born Institute of Nonlinear Optics and Short Pulse Spectroscopy, Berlin; Institute of Radiation Biology, DLR, Cologne, Germany; в НПО Лазерная техника, Ереван; на кафедре молекулярной физики ЕГУ, Ереван; в Институте экспериментальной биологии АН Армении, Ереван; и др.

Публикации. Результаты и положения диссертации опубликованы в 44 работах, включающих 2 монографии и 26 статей в журналах (15 в международных).

Структура диссертации. Диссертация изложена в виде научного доклада.

## 2. Экспериментальные методы и материалы

### 2.1 Пикосекундный Nd:YAlO<sub>3</sub> лазер с преобразованием излучения в 4 и 5 гармонику

Экспериментально исследовалась генерация гармоник излучения пикосекундного Nd:YAlO<sub>3</sub> лазера тремя различными способами в кристаллах

КДР и пентабората калия (KB5). Лазер состоял из генератора с пассивной синхронизацией мод на красителе 3274у, системы выделения одиночного импульса и двухкаскадного усилителя на кристаллах Nd:YAlO<sub>3</sub>. На рис. 1 приведены схемы установок для генерации пятой гармоники.

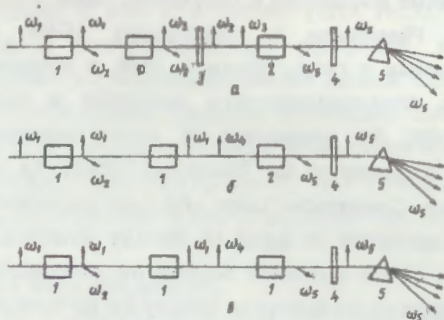


Рисунок 1.

В первом случае энергия излучения пятой гармоники 216 нм составляла 40 мкДж. Энергия измерялась калиброванным пироприемником. Во второй схеме энергии четвертой и пятой гармоник составляли, соответственно, 1,6 мДж и 50 мкДж при суммарном коэффициенте преобразования в пятую гармонику 0,08%. Третья схема, наиболее оптимальная, где вместо кристалла KB5 использовался КДР, позволяет генерировать излучение с 216 нм до 0,45 мДж при коэффициенте преобразования 0,75%. Эффективность достигается как большими нелинейностями КДР и угловой ширины синхронизма для генерации пятой гармоники, так и меньшим поглощением КДР на 216 нм по сравнению с KB5: 0,07 и 0,12 см<sup>-1</sup> соответственно.

## 2.2 Генерация второй гармоники в кристалле ВВО

Кристаллы β-бората бария β-BaV<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (ВВО) обладают многими замечательными свойствами, позволяющими эффективно их использовать для преобразования частоты в нелинейных устройствах (Chen С. ea, 1981). Эффективный коэффициент генерации второй гармоники ВВО в 5-6 раз выше, чем у монокристаллов КДР (Cheng L.K. ea, 1988). Кристаллы имеют широкую область прозрачности 190-3500 нм, высокий порог разрушения. С использованием элемента из монокристалла ВВО толщиной 1.6 мм исследовалась генерация второй гармоники пикосекундного лазера на Nd:YAlO<sub>3</sub> с пассивной синхронизацией мод: длина волны 1.08 мкм, длительность импульса 15 пс, энергия одиночного импульса 1 мДж. Для

сравнения эффективности преобразования также исследовалась генерация второй гармоники в кристаллах LiIO<sub>3</sub> (L = 6.4 мм) и КДР (L = 14.6 мм). Используя приближение заданного поля при небольших преобразованиях и литературные значения нелинейных коэффициентов получены соотношения между коэффициентами преобразования в исследуемых кристаллах:

$$\eta(\text{LiIO}_3)/\eta(\text{ВВО}) = 7.1 \quad \eta(\text{КДР})/\eta(\text{ВВО}) = 2.3$$

что достаточно хорошо согласовывалось с экспериментальными результатами. Коэффициент преобразования в ВВО при интенсивностях излучения 2 ГВт/см<sup>2</sup> составлял 6.1% (с учетом френелевских потерь и поглощения в кристалле 9%). Экспериментально измеренная угловая ширина синхронизма в ВВО (1.6 мм) равнялась  $2\Delta\theta = (3.07 \pm 0.15)$  мрад. Порог поверхностных повреждений при воздействии одиночных лазерных импульсов при 1.08 мкм составлял 250-350 ГВт/см<sup>2</sup>, а при 0.54 мкм - 120-150 ГВт/см<sup>2</sup>.

## 2.3 Новые формулы для расчета углов синхронизма

В случае скалярных взаимодействий типа eoe, oee и eeo нахождение углов синхронизма сводится к решению уравнения четвертой степени относительно  $\text{tg}^2\theta_c$ , поэтому обычно расчет углов синхронизма производится методом последовательных приближений на ЭВМ. Для углов синхронизма  $\theta_c^{eoe}$  и  $\theta_c^{oee}$  в литературе имеются приближенные формулы, но они очень громоздки и не дают необходимой точности (Дмитриев В.Г. и Тарасов Л.В. 1982). Нами получены приближенные формулы для  $\theta_c^{eoe}$ ,  $\theta_c^{oee}$ ,  $\theta_c^{eoo}$  и точные аналитические выражения для  $\theta_c^{oee}$ ,  $\theta_c^{eoo}$ ,  $\theta_c^{eoo}$ . В таблицах 2 и 3 приведены соответствующие формулы для одноосных и двухосных кристаллов.

Таблица 1. Формулы для расчета углов синхронизма в одноосных кристаллах.

Отрицательные одноосные кристаллы	Положительные одноосные кристаллы
$\text{tg}^2 \theta_c^{eoe} \approx \frac{1-U}{W-T}$	$\text{tg}^2 \theta_c^{eoe} \approx \frac{1-U}{U-S}$
$\text{tg}^2 \theta_c^{oee} \approx \frac{1-U}{W-R}$	$\text{tg}^2 \theta_c^{oee} = \frac{1-V}{V-Y}$
$\text{tg}^2 \theta_c^{eoo} \approx \frac{1-U}{W-Q}$	$\text{tg}^2 \theta_c^{eoo} = \frac{1-T}{T-Z}$

Обозначения:  $U = (A+B)^2/C^2$ ;  $W = (A+B)^2/F^2$ ;  $R = (A+B)^2/(D+B)^2$ ;  $Q = (A+B)^2/(A+E)^2$ ;  $S = (A-B)^2/(D+E)^2$ ;  $V = B^2/(C-A)^2$ ;  $Y = (B/E)^2$ ;  $T = A^2/(C-B)^2$ ;  $Z = (A/B)^2$ ;  $A = n_1^2/i_1$ ;  $B = n_2^2/\lambda_2$ ;  $C = n_3^2/\lambda_3$ ;  $D = n_1^2/\lambda_1$ ;  $E = n_2^2/\lambda_2$ ;  $F = n_3^2/\lambda_3$ .

Следует отметить, что ошибка составляет 0.1-0.2°, что намного превышает обычную ошибку вырезания кристалла по направлению синхронизма. Это обуславливает практическую ценность полученных выражений.

Таблица 2. Формулы для расчета углов синхронизма в двухосных кристаллах.

Формулы для расчета углов синхронизма в двухосных кристаллах при распространении излучения в главных плоскостях

Соотношение $n_x, n_y, n_z$	Главная плоскость	Тип взаимного действия	Формулы	Обозначения
XY		ооо	$\text{tg}^2 \varphi = \frac{1-U}{W-1}$	$A = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{x2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, F = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
		ооe	$\text{tg}^2 \varphi \approx \frac{1-U}{W-R}$	$A = \frac{n_{y1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{x2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, D = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, F = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
		оee	$\text{tg}^2 \varphi \approx \frac{1-U}{W-Q}$	$A = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, E = \frac{n_{x2}}{\lambda_2}, F = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$

Соотношение $n_x, n_y, n_z$	Главная плоскость	Тип взаимного действия	Формулы	Обозначения
YZ		ооо	$\text{tg}^2 \theta \approx \frac{1-U}{U-S}$	$A = \frac{n_{y1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}, D = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, E = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
		ооe	$\text{tg}^2 \theta = \frac{1-V}{V-Y}$	$A = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}, E = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
		ооо	$\text{tg}^2 \theta = \frac{1-T}{T-Z}$	$A = \frac{n_{y1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{x2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}, D = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}$
$n_x > n_y > n_z$ $\theta < V_z$	XZ	ооe	$\text{tg}^2 \theta = \frac{1-U}{W-1}$	$A = \frac{n_{y1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}, F = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
		ооe	$\text{tg}^2 \theta \approx \frac{1-U}{W-R}$	$A = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}, D = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, F = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
		оee	$\text{tg}^2 \theta \approx \frac{1-U}{W-Q}$	$A = \frac{n_{y1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{x2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}, E = \frac{n_{x2}}{\lambda_2}, F = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
$n_x > n_y > n_z$ $\theta > V_z$	XZ	ооо	$\text{tg}^2 \theta \approx \frac{1-U}{U-S}$	$A = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{x2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, D = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, E = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
		ооe	$\text{tg}^2 \theta = \frac{1-V}{V-Y}$	$A = \frac{n_{y1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{x2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, E = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
		ооо	$\text{tg}^2 \theta = \frac{1-T}{T-Z}$	$A = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, D = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}$

Соотношение $n_x, n_y, n_z$	Главная плоскость	Тип взаимного действия	Формулы	
			Формулы	Обозначения
XY		ооо	$\text{tg}^2 \varphi \approx \frac{1-U}{U-S}$	$A = \frac{n_{y1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}, D = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, E = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
		ооe	$\text{tg}^2 \varphi = \frac{1-V}{V-Y}$	$A = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}, E = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
		ооо	$\text{tg}^2 \varphi = \frac{1-T}{T-Z}$	$A = \frac{n_{y1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}, D = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}$
$n_x > n_y > n_z$	YZ	ооe	$\text{tg}^2 \theta = \frac{1-U}{W-1}$	$A = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{x2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, F = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
		ооe	$\text{tg}^2 \theta \approx \frac{1-U}{W-R}$	$A = \frac{n_{y1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{x2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, D = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, F = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
		оee	$\text{tg}^2 \theta \approx \frac{1-U}{W-Q}$	$A = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, E = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}, F = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
		ооо	$\text{tg}^2 \theta \approx \frac{1-U}{U-S}$	$A = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{x2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, D = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, E = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
$n_x > n_y > n_z$ $\theta < V_z$	XZ	ооe	$\text{tg}^2 \theta = \frac{1-V}{V-Y}$	$A = \frac{n_{y1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{x2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, E = \frac{n_{z2}}{\lambda_2}$
		ооо	$\text{tg}^2 \theta = \frac{1-T}{T-Z}$	$A = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}, B = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, C = \frac{n_{y2}}{\lambda_2}, D = \frac{n_{x1}}{\lambda_1}$

Общие обозначения:  $U = (A+B)^2/C^2$ ,  $W = (A+B)^2/F^2$ ,  $R = (A+B)^2/(D+B)^2$ ,  $Q = (A+B)^2/(A+E)^2$ ,  $S = (A+B)^2/(D+E)^2$ ,  $V = B^2/(C-A)^2$ ,  $Y = (B/E)^2$ ,  $T = A^2/(C-B)^2$ ,  $Z = (A/D)^2$ .

#### 2.4 Новый метод измерения чирпа излучения пикосекундного лазера

С помощью нелинейного динамического спектрографа с временным разрешением 0.1 пс и спектральным 0.02 нм измерен чирп пикосекундных импульсов лазера на фосфатном стекле с неодимом на длине волны 1.054 мкм. Схема экспериментальной установки приведена на рис. 2а.

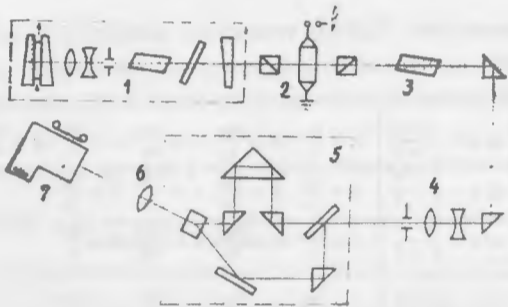


Рисунок 2а.

Лазер 1 на фосфатном стекле с пассивной синхронизацией мод генерировал пуг импульсов, один из которых выделялся с помощью ячейки Поккельса 2 и усиливался в усилителе 3. Телескопом 4 пучок расширялся до 15 мм в диаметре и направлялся на автокорреляционный измеритель длительности ультракоротких импульсов 5 совмещенный со спектрографом 7. Принцип действия нелинейного динамического спектрографа иллюстрирует рис. 2б.

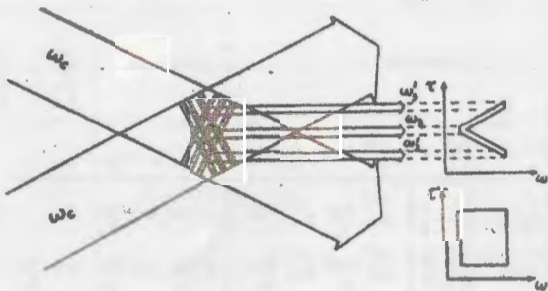


Рисунок 2б. Взаимодействие пучков в нелинейном кристалле.

На рис. 3 и 4 приведены расчетные и экспериментально полученные динамические спектрограммы в случае спектрально-ограниченных импульсов (а) и импульсов с чирпом за счет фазовой модуляции (б, в, г). Измеренные значения чирпа ультракоротких импульсов вблизи центральной части лазерной частоты для приведенных динамических спектрограмм составляют соответственно, 1,21, 0,37 и 0,15 нм/пс (рис. 4 б, в и г).

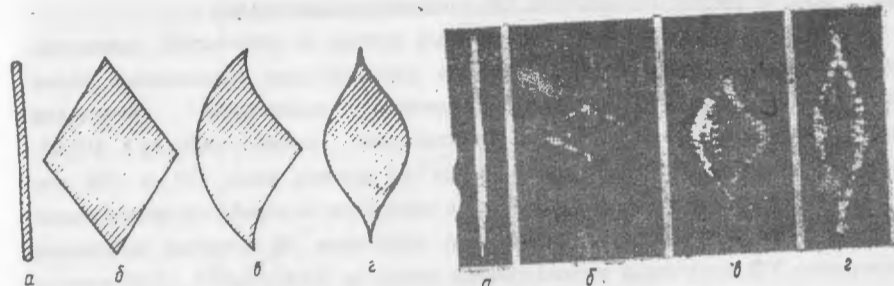


Рисунок 3

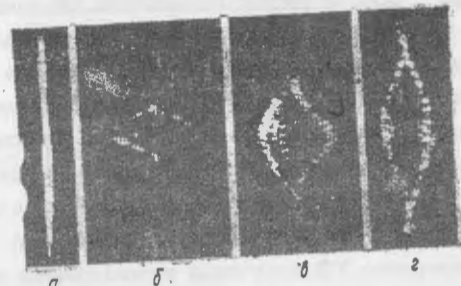


Рисунок 4

### 2.5 Измерение чирпа пикосекундного континуума

Нелинейно-динамический спектрограф, описанный в предыдущем параграфе, использовался также для исследования спектрально-временных характеристик пикосекундного континуума. Рисунок 5 иллюстрирует экспериментально полученную линейную зависимость частоты излучения пикосекундного континуума вблизи частоты накачки от временной задержки. Отметим, что в диапазоне 1,01 - 1,17 мкм в зависимости от параметров импульса накачки чирп изменяется от 250 см<sup>-1</sup>/пс до 800 см<sup>-1</sup>/пс. Результаты указывают на то, что основным механизмом генерации спектральных компонент пикосекундного континуума вблизи частоты накачки в нашем случае является фазовая самомодуляция.

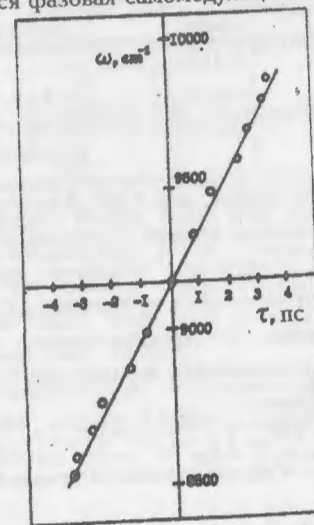


Рисунок 5.

## 2.6 Двухфотонное поглощение УФ излучения в кристаллах

Основным механизмом нелинейных потерь в оптических элементах (линзах, призмах, кристаллах) является двухфотонное поглощение. Нами измерены коэффициенты двухфотонного поглощения кристаллов дигидрофосфата калия (КДР), пентабората калия ( $\text{KB}_5\text{O}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), кристаллического и плавленного кварца на длинах волн 270 и 216 нм. Нелинейное поглощение определялось по зависимости обратного пропускания образцов от интенсивности падающего излучения. В качестве источника лазерного УФ излучения использовался лазер на  $\text{YAlO}_3:\text{Nd}^{3+}$  (1.08 мкм) с пассивной синхронизацией мод и с преобразованием частоты в четвертую (270 нм) и пятую гармонику (216 нм). Процесс двухфотонного поглощения описывается следующим уравнением:

$$dI/dz = -\alpha I - \beta I^2$$

где  $\alpha$  и  $\beta$  соответственно, коэффициенты линейного и двухфотонного поглощения,  $I$  интенсивность падающего излучения. В таблице 3 приведены результаты экспериментов для 270 и 216 нм в предположении Гауссовской формы импульса; для сравнения приведены также литературные значения коэффициентов ДП на других длинах волн (Liu P. ea, 1978, 1979, Ross I.N. ea, 1989).

Таблица 3 Коэффициенты двухфотонного поглощения  $\beta$ ,  $10^{-10}$  см/Вт

	КДР	KB5	плавленый кварц	кристаллический кварц
355 нм	0.059	-	0.0125	-
270 нм	2.8	3.5	<0.2	<0.15
266 нм	2.7	-	0.17-0.45	0.45
216 нм	6	6.5	5	4

На рис. 6 приведен соответствующий график для КДР. Как видно, кривая двухкомпонентна: имеется начальный крутой подъем с переходом на пологий наклон. Это явление объясняется следующим образом: двухквантовое поглощение кристалла следует рассматривать как комбинацию двухфотонного поглощения кристаллической решетки и двухквантового поглощения примесей, имеющих в кристаллах. Двухквантовое поглощение в этом общем случае описывается следующим уравнением:

$$dI/dz = -\sigma_1 I N_0 (2 + (\sigma_2 I \tau)^{-1}) / (1 + (\sigma_2 I \tau)^{-1}) - \beta I^2$$

где  $N_0$  и  $N_1$  населенности начального и промежуточного уровней

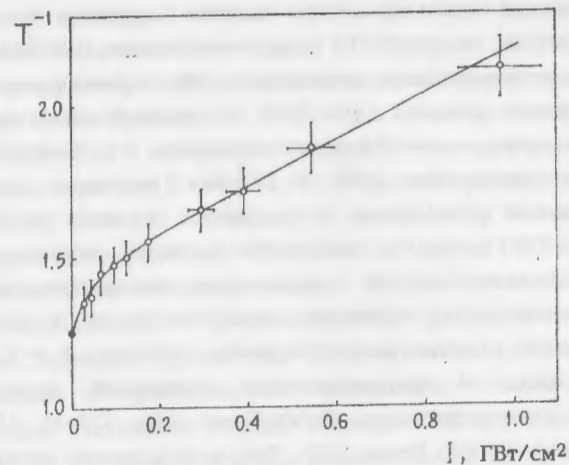


Рисунок 6.

примесей,  $\sigma_1$  и  $\sigma_2$  - сечения первого и второго электронных переходов, соответственно,  $\tau$  - время жизни промежуточного уровня. Решая уравнение численным методом согласно с экспериментом получаем при  $\beta = (3.4 \pm 0.4) 10^{-10}$  см/Вт и  $\sigma_2 \tau = (6.5 \pm 3) 10^{-26}$  см<sup>2</sup> с. Следует отметить, что первый член в уравнении ответствен за начальную кривизну кривой, а второй - за общий наклон. Этот факт указывает на то, что для корректного определения коэффициента двухфотонного поглощения необходимы достаточно большие интенсивности излучения:  $> 0,5$  ГВт/см<sup>2</sup>.

## 2.7 Другие источники УФ излучения: Nd:YAG лазер, эксимерный ArF лазер, ртутная лампа

В экспериментах в основном использовался коммерческий эксимерный ArF лазер (Lambda Physik, EMG 200), генерирующий на длине волны 193 нм импульсы длительностью 10 нс. Энергия одиночного импульса составляла 0.01-10 мДж, что соответствовало интенсивности излучения  $10^3 - 10^6$  Вт/см<sup>2</sup>. Энергия одиночных импульсов измерялась с помощью откалиброванного детектора (Laser Instr., 14 NO).

В экспериментах по двухквантовому возбуждению ДНК использовался пикосекундный Nd:YAG лазер с преобразованием излучения в четвертую гармонику: 266 нм, 30 пс, 10 мДж (Крюков П.Г. и др, 1978). В исследованиях

инактивации бактерий использовалась также пятая гармоника наносекундного Nd:YAP лазера (216 нм, энергия 0.01-1 мДж, интенсивность 0.005-0.5 МВт/см<sup>2</sup>).

В качестве источника низкоинтенсивного УФ излучения использовалась ртутная лампа низкого давления с фильтром, отсекающим длины волн меньше 200 нм, длина волны излучения 254 нм, интенсивность 0.1 - 1 МВт/см<sup>2</sup>.

Облучение препаратов ДНК и водных растворов компонентов нуклеиновых кислот проводилось в кварцевых кюветах с оптической толщиной 1 см. Оптическая плотность растворов составляла 0.2-0.8; исключение составляет случай определения лазерно-индуцированных свободных оснований при облучении полинуклеотидов: в этом случае оптическая плотность на длине волны облучения составляла  $A = 4 - 8$  в 1 см. Для абсорбционных и флуоресцентных измерений использовались, соответственно, спектрофотометр Perkin-Elmer 554, СФ-46 (ЛОМО) и спектрофлуориметр Perkin Elmer, LS5. Все исследования проводились в нейтральном водном растворе при pH 6.6-7.2 при  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## 2.8 Методы определения фотоповреждений ДНК

Детектирование неповрежденных оснований проводилось путем измерения поглощения на 260 нм после разделения свободных оснований от остального материала с молекулярным весом более 3000 Д центрифугированием (Beckman J2-21) в центрифуге 3 (Amicon, Danvers, MA) и далее жидкостной хроматографией (ЖХВД). Для ЖХВД использовалась колонка Nucleosil 5-C18 с 5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  мобильной фазой + 1% метанол и Shimadzu SPD-6AV детектор. Квантовый выход разрыва N-гликозидной связи вычислялся из отношения количества детектированных свободных оснований и количества поглощенных квантов.

Разрушение нуклеотидов исследовалось путем проведения ЖХВД УФ облученных препаратов ДНК ( $A = 1$  на 260 нм) после гидролиза с нуклеазой P1 при  $37^\circ\text{C}$  в течение 2 часов. Образующиеся 5-монофосфаты детектировались на длине волны 260 нм, квантовые выходы вычислялись с учетом поглощения всего ДНК. Потеря хромофора регистрировалась по уменьшению поглощения на максимуме первой электронной полосы (250-270 нм). Соответствующий квантовый выход рассчитывался в предположении отсутствия поглощения образующихся фотопродуктов на длине волны регистрации.

Для определения одно- и двунитевых разрывов ДНК плазмиды использовался гель электрофорез фирмы Pharmacia (GNA-100); гель

окрашивался бромидом этидия (0.5 мкг/мл), негативы поляроида сканировались на денситометре Sigma, FTR-20, далее количества трех форм плазмиды измерялись с использованием компьютерной программы (Aboul-Enein A. and Schulte-Frohlinde D., 1988).

Выживаемость плазмиды определялась по трансформации бактериальных штаммов *E. coli* K12 AB1157 (дикий тип по репарации), AB1886 ( $\text{uvrA}^-$ ), AB2463 ( $\text{recA}^-$ ) и AB2480 ( $\text{uvrA}^- \text{recA}^-$ )  $\text{CaCl}_2$  методом с небольшой модификацией (Cohen S.N. ea, 1972, Gurzadyan G.G. ea, 1993).

Количество межнитевых сшивок и локальных денатурированных участков определялось с использованием флуоресцентного метода с красителем акридин оранжевый (Завильгельский Г.Б. и др., 1964). Детектирование (6-4)фотопродуктов проводилось методом флуоресцентной спектроскопии. Оптически толстые растворы УФ облученной ДНК тимуса теленка ( $A = 6$  в 1 см) возбуждались на длине волны 330 нм и флуоресценция детектировалась в районе 420 нм.

В исследованиях возникновения разрывов цепей ДНК в протеиновом экстракте из *E. coli* K12 AB1157 использовался метод выделения экстракта согласно Lu A.L. ea, 1983 с некоторой модификацией (Ventur Y. 1992). Подробно условия проведения эксперимента описаны в Gurzadyan and Schulte-Frohlinde, 1994. Инактивация бактерий *E. coli* K12 исследовалась методом микроколоний, фотореактивация проводилась с использованием излучения с 366 нм (флуоресцентная лампа Osram L с фильтрами).

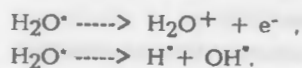
## 2.9 Используемые материалы

Использовалась плаزمида pBR322 (4360 пар оснований) и pTZ18R (2871 пар оснований) от Boehringer (Mannheim) и Pharmacia (Freiburg), соответственно. ДНК тимуса теленка была от Serva (Heidelberg) (в экспериментах по высвобождению оснований) и Merck (Darmstadt) (во всех остальных случаях). Использовались также poly C, poly A, poly U из Boehringer, poly G, poly dU из Pharmacia, мономеры нуклеиновых кислот (основания, нуклеозиды, нуклеотиды) из фирм Merck, Reidel-de Haen, Sigma или Aldrich/EGA. Все использованные динуклеотид-фосфаты (UpU, TrT, CpC, CpU, dCpT) были из фирмы Sigma. Бактериальные штаммы *E. coli* K12 AB1157 были от E.A. Adelberg (через B. Bachmann, Genetic Stock Center, Yale University); AB1886 от Devoret (через W. Wackernagel, University of Oldenburg); AB2463 от W. Wackernagel, AB2480 от B.D. Michael (Gray Laboratory). Вода была от системы Millipore (Milli Q).

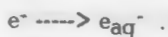
### 3. Нелинейные эффекты в воде

#### 3.1 Двухфотонное поглощение

При высокоинтенсивном пикосекундном облучении с 266 - 316 нм вода поглощая два УФ кванта приобретает энергию 7.9-9.3 эВ, что достаточно для ее ионизации и диссоциации (Ангелов Д.А. и др. 1981, Nikogosyan D.N. and Angelov D.A., 1981, Никогосян Д.Н., 1987):



За время  $3 \cdot 10^{-13}$  с электрон гидратируется (Wiesenfeld J.M. and Ippen E.P. 1980):



Далее за время порядка  $10^{-13}$  с катион радикал воды реагирует с молекулой воды (Swallow A.J., 1973):



Экспериментально определялась зависимость квантового выхода двухфотонной ионизации воды (образования гидратированного электрона) от длины волны лазерного УФ излучения (Gurzadyan G.G. ea, 1982): на длине волны 266 нм он равен  $\Phi_1 = 0.15 \pm 0.02$  и уменьшается в 10 раз при переходе к длине волны 316 нм. Порог ионизации жидкой воды равен  $6.5 \pm 0.5$  эВ (Nikogosyan D.N. ea, 1983), что больше энергии кванта излучения с 193 нм (6.4 эВ). Квантовый выход диссоциации воды на длине волны 266 нм равен  $0.13 \pm 0.07$  (Nikogosyan D.N. ea, 1983). Отметим, что максимальный квантовый выход ионизации и диссоциации в случае двухфотонного поглощения может равняться 0.5.

Таким образом, за время лазерного пикосекундного импульса образуются  $\text{e}_{\text{aq}}^-$ ,  $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{H}^{\bullet}$  и  $\text{OH}^{\bullet}$ . Возникает "косвенный" канал фотоллиза нуклеиновых кислот, который необходимо учитывать в экспериментах по фотохимии с использованием пикосекундного УФ излучения.

#### 3.2 Нелинейная дефокусировка лазерного УФ излучения

Поглощение лазерного излучения (линейное или нелинейное) в отсутствие процессов переизлучения (флуоресценция, фосфоресценция) приводит в конечном счете к нагреванию среды. Показатель преломления среды в этом случае можно представить в виде

$$n(T) = n_0 + (\partial n / \partial T) \Delta T$$

где  $n_0$  показатель преломления невозмущенной среды,  $\Delta T$  возмущение температуры в поле волны. В случае  $\partial n / \partial T > 0$  имеет место самофокусировка, при  $\partial n / \partial T < 0$  расфокусировка (или дефокусировка) (Chiao R. ea, 1964). Нами обнаружен и исследован эффект нелинейной дефокусировки пикосекундного лазерного УФ излучения с длиной волны 216 нм в воде вследствие нелинейного (двухфотонного) поглощения. Нами предлагается новый метод измерения коэффициента двухфотонного поглощения на основе эффекта нелинейной дефокусировки излучения. Возбуждение осуществлялось с помощью пятой гармоники излучения пикосекундного лазера на алюминате иттрия 216 нм, 15 пс; визуализация эффекта достигалась с помощью пучка He-Ne лазера типа ЛГ-72 с длиной волны 633 нм и  $P = 1$  мВт (рис. 7а).

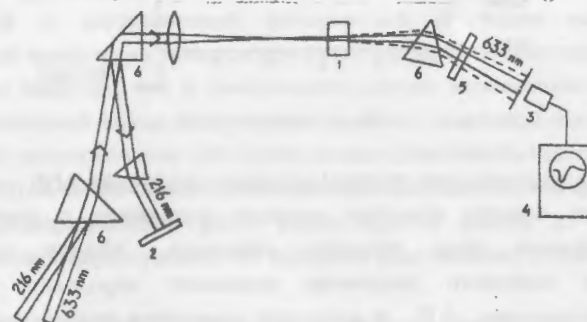


Рисунок 7а.

Для оценки угла расфокусировки в геометрическом приближении получена следующая формула:

$$\Delta \theta = \frac{2}{\alpha n_0} \frac{\partial n}{\partial T} \frac{\tau}{c \rho} \cdot I_0 \left\{ 1 - \frac{d}{\beta I_0 (e^{d\beta} - 1) + d e^{d\beta}} \right\}$$

где  $d$  и  $\beta$  коэффициенты линейного и двухфотонного поглощения,  $I_0$  - интенсивность пучка,  $l$  - длина взаимодействия. В отсутствие двухфотонного поглощения зависимость  $\Delta \theta$  от интенсивности линейная, а наличие приводит к нелинейной зависимости, причем при  $d \ll 1$ ,  $\beta \neq 0$  эта зависимость квадратичная, что хорошо согласуется с полученными

экспериментальными кривыми для этанола и воды. Из уравнения рефракции с учетом температурной зависимости показателя преломления получена формула для изменения интенсивности зондирующего пучка:

$$\frac{J(l)}{J(0)} = \exp \left\{ \frac{4}{\pi_0 a^2} \frac{\partial n}{\partial T} \int_0^l \frac{1}{\beta + a/I_0} \left( \frac{a}{I_0 [\beta + a/I_0] \exp(a/l) - \beta} - 1 \right) - I_0 dl \right\},$$

где  $J(l)/J(0)$  нормированная интенсивность дефокусированного излучения в осевой части. В случае расфокусировки в воде (рис. 76) наилучшее согласие с экспериментом имеет место при  $\beta = (2 \pm 0.5) \cdot 10^{-10}$  см/Вт.

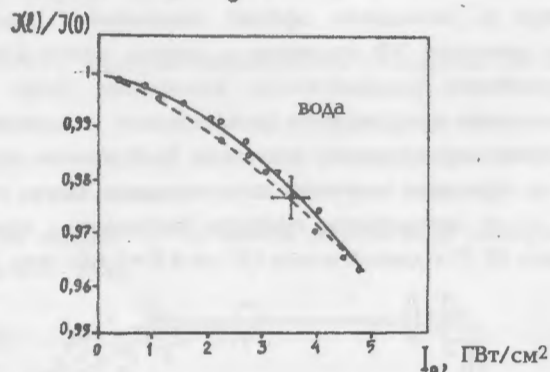


Рисунок 76.

### 3.3 Тепловые эффекты при мощном лазерном облучении ДНК:

Одним из важных аспектов лазерной фотохимии и фотобиологии является выявление роли тепловых эффектов. Эффект нелинейной дефокусировки лазерного излучения позволяет определить вариации показателя преломления  $\Delta n$  и локальное изменение температуры  $\Delta T$  в облучаемом участке водной среды. При  $I = 5$  ГВт/см<sup>2</sup>, для  $\Delta n$  получена величина  $10^{-5}$  и для  $\Delta T = 0.12^\circ\text{C}$ . Эти результаты достигнуты в чистой воде при двухфотонном поглощении излучения (50% поглощенной энергии). Следует отметить, что в случае облучения ДНК в водном растворе с  $A=0.4$  приведенные оценки для температурных вариаций будут такие же, как для случая воды. Таким образом, при высокоинтенсивном пикосекундном лазерном облучении биомолекул в воде температурными эффектами можно пренебречь вплоть до интенсивностей в несколько ГВт/см<sup>2</sup>.

## 4. Лазерная фотофизика ДНК

### 4.1 Одно- и двухступенчатое возбуждение

При высокоинтенсивном пикосекундном лазерном облучении ( $I = 1-10$  ГВт/см<sup>2</sup>) с длиной волны 216-270 нм происходит двухступенчатое возбуждение высоколежащих синглетных электронных уровней  $S_N$  молекул оснований нуклеиновых кислот через промежуточный уровень  $S_1$  (Nikogosyan D.N. and Letokhov V.S., 1983, Zavihgelsky G.B. ea, 1984) (рис. 8а). При наносекундном облучении с  $I = 0.1-1$  МВт/см<sup>2</sup> происходит двухступенчатое возбуждение высоколежащих триплетных уровней  $T_N$  через промежуточный уровень  $T_1$ . При этом энергия двух квантов (8-10 эВ) выше порога ионизации оснований нуклеиновых кислот в водной среде, 5.5-6.8 эВ (Rubin L.B. ea, 1981), что приводит к его ионизации и реализации химических реакций с высоким квантовым выходом.

Под квантовым выходом фотореакции (как одноквантовой, так и двухквантовой) подразумевается отношение числа прореагировавших молекул к числу поглощенных квантов излучения. При таком определении становится возможным сравнивать между собой квантовые эффективности одноквантовой и двухквантовой фотореакций, а также выявлять их относительный вклад по их зависимости от интенсивности облучения.

Хорошо известно, что в классическом случае низкоинтенсивного УФ-облучения квантовый выход фотореакции является величиной постоянной, не зависящей от интенсивности облучения (закон Бунзена-Роско, см. Смит К., Хэнеуолт, 1972). В то же время квантовый выход двухквантовой фотореакции возрастает пропорционально росту интенсивности вплоть до насыщения одной из ступеней двухступенчатого процесса возбуждения (Nikogosyan D.N. ea, 1982).

Линейная зависимость квантового выхода разложения оснований нуклеиновых кислот от интенсивности 216 нм пикосекундного лазерного излучения с последующим насыщением (пример для аденина показан на рис. 8б) указывает на двухступенчатое возбуждение через промежуточный уровень  $S_2$ . Как было уже указано выше, энергия одного кванта лазерного излучения с длиной волны 193 нм (6.4 эВ) достаточна для ионизации ДНК и компонентов (но недостаточна для ионизации воды, см. раздел 3.1). Таким образом, облучение с 193 нм приводит к одноквантовой ионизации ДНК (подробнее в разделе 4.2).

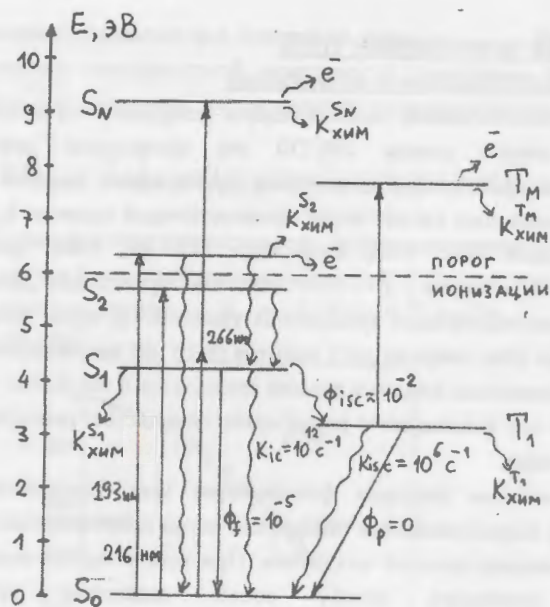


Рисунок 8а.

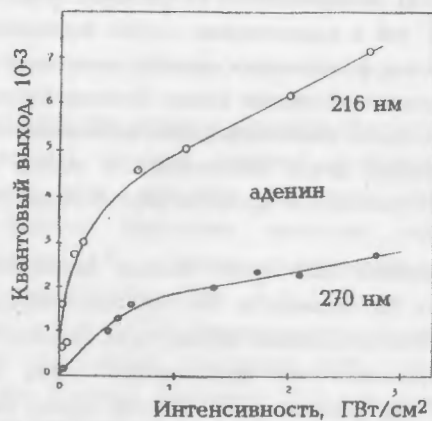


Рисунок 8б.

При двухступенчатом возбуждении ДНК с длиной волны 266 нм наблюдается также следующее явление: интенсивности насыщения двухквантовых эффектов (например, образования однонитевых разрывов) в биополимерах ДНК значительно меньше таковых в случае отдельных компонент ДНК: оснований, нуклеозидов, нуклеотидов (Гурзаян Г.Г. и

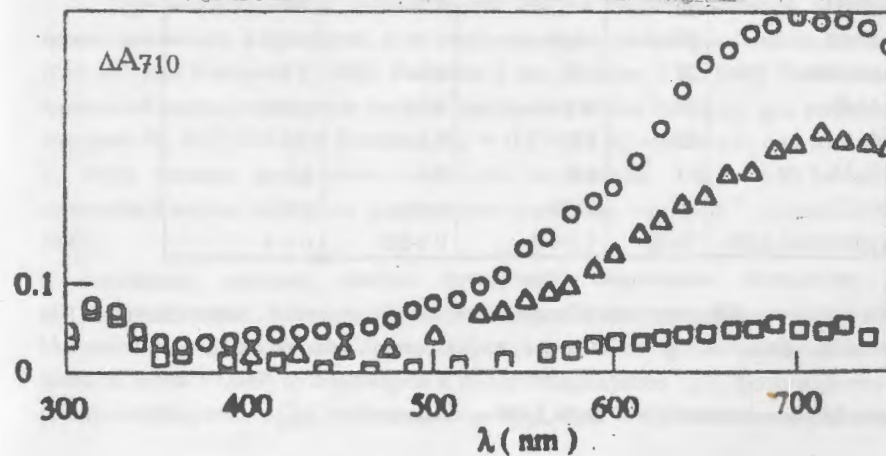
Никогосян Д.Н., 1984). Этот эффект объясняется эффективной синглет-синг летной миграцией электронной энергии вдоль цепи ДНК, последующей аннигиляцией и, как следствие, образованием двухквантово-возбужденной молекулы.

При высоких интенсивностях лазерного излучения ( $> \text{ГВт/см}^2$ ) квантовые выходы одноквантовых фотореакций с уровней  $S_1$  и  $T_1$  также начинают зависеть от интенсивности, а именно, уменьшаются обратно пропорционально интенсивности облучения. Это происходит, когда константы скоростей опустошения уровней  $S_1$  и  $T_1$  за счет переходов  $S_1 \rightarrow S_N$  и  $T_1 \rightarrow T_N$  начинают превосходить по величине сумму констант скоростей дезактивации уровней  $S_1$  и  $T_1$ . Уменьшение квантового выхода одноквантовых фотопродуктов, пиримидиновых димеров, было нами продемонстрировано при пикосекундном лазерном возбуждении poly dT (Никогосян Д.Н. и др., 1983).

#### 4.2 Фотоионизация ДНК и ее компонентов

Ионизация ДНК и ее составляющих детектировалась путем регистрации образующегося при этом гидратированного электрона по ее характерному спектру поглощения с максимумом вблизи 710 нм (рис. 9).

Рисунок 9. Наведенный спектр поглощения в водном растворе однонитевой ДНК через 0.1 (o), 3 ( $\Delta$ ) и 10 мкс ( $\square$ ) после возбуждающего импульса с 193 нм.



Линейная зависимость наведенной оптической плотности на длине волны 700 нм от интенсивности излучения (пример для уридина, poly U и poly dU приведен на рис. 10) указывает на одноквантовый механизм ионизации при 193 нм. Сравнение результатов с КВг ( $\Phi_e = 0.34$  из Iwata A. ea, 1993) позволяет определить абсолютные значения квантовых выходов ионизации (таблица 4).

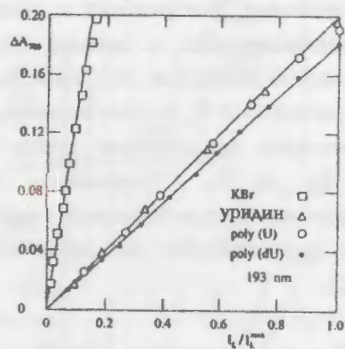


Рисунок 10.

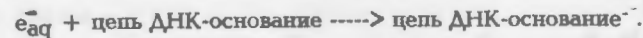
Таблица 4. Квантовые выходы ( $10^{-3}$ ) ионизации и высвобождения оснований  $\Phi_{gr}$  при возбуждении с длиной волны 193 нм.

Соединение	$\Phi_{e^-}$	$\Phi_{gr} (O_2)$	$\Phi_{gr} (Ar)$	$\Phi_{gr} (N_2O)$
урацил	44	-	-	-
уридин	50	9.7	1.8	3.5
5-UMP	53	7.5	4.3	>4
polyU	50	12	4.3	>4
polydU	45	1.7	0.53	1.8
аденин	42	-	-	-
аденозин	31	1.4	1.1	3.3
5-AMP	40	0.5	0.29	0.68
polyA	35	1.6	1.1	3.3
polydA	31	1.8	0.8	2.2
poly G	34	0.73	0.45	1.2
двунитевая ДНК	21-36	0.3-0.6	0.3-0.6	0.9-1

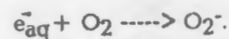
В результате ионизации образуются катион радикал основания и гидратированный электрон (Candeias L.P. and Steenken S., 1992, Candeias L.P. ea, 1992, Görner H. ea, 1992, Gurzadyan G.G. and Görner H., 1992):



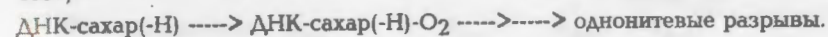
В свою очередь гидратированный электрон может реагировать с основаниями ( $K = (0.9-1.5) \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) с образованием анион радикалов (Schulte-Frohlinde D. and Bothe E., 1991, Steenken S. ea, 1992):



В присутствии кислорода электрон трансформируется в менее реакционноспособный  $O_2^-$  (von Sonntag C., 1987):



Радикалы результирующие от радикал катиона пиримидиновых оснований реагируют с кислородом с образованием пероксил радикалов (von Sonntag C., 1987):



В присутствии  $N_2O$  электрон эффективно трансформируется в реакционно способный OH радикал (von Sonntag C., 1987, Steenken S., 1989):



В дальнейшем OH<sup>•</sup> радикалы участвуют в образовании разрывов цепей ДНК и разрывов N-гликозидной связи.

При возбуждении с длиной волны 193 нм гидратированный электрон может появиться, в принципе, и от возбужденного сахара-фосфатного остатка (Gut I.G. and Kochevar I., 1992, Kochevar I. and Buckley L.A., 1990). Более того, квантовый выход ионизации (вылета электрона) очень высокий: для рибозо-5-фосфата  $\Phi_e = 0.24-0.47$  и фосфата  $\Phi_e = 0.33-0.52$  (Candeias L.P. and Steenken S., 1992). Однако, из-за очень маленькой экстинкции  $\epsilon < 150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , суммарный выход электрона оценивается в меньше, чем  $4 \cdot 10^{-3}$  (Görner H. ea, 1992).

#### 4.3 Денатурация высоковозбужденных синглетных уровней

Исследовалось образование фотодимеров урацила и оротической кислоты, фотогидратов 5-UMP, фотодимеров и (6-4)фотопродуктов TrT, фотогидратов и (6-4)фотопродуктов dCrT, фотогидратов UrU, CrC и CrU в водном растворе

при комнатной температуре при возбуждении с длиной волны 254 или 193 нм (рис. 11).

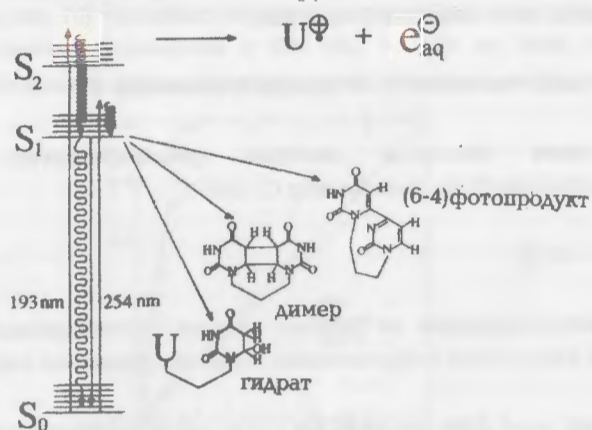


Рисунок 11.

Проведена идентификация фотопроductов и выявлен вклад ионизации при 193 нм. Разделение фотопроductов с помощью хроматографии и их спектры поглощения после разделения на примере TrT и UpU приведены на рис. 12 и 13.

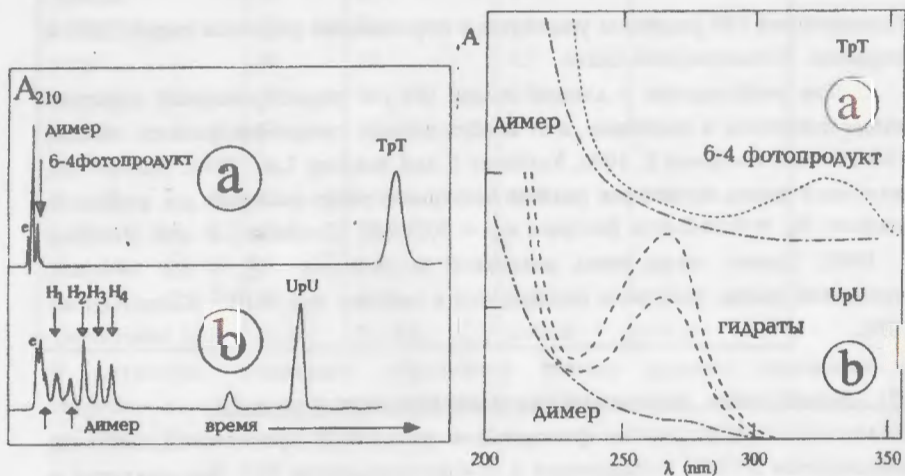


Рисунок 12

Рисунок 13

В таблицах 5а, б, в приведены квантовые выходы разрушения динуклеотидов ( $\Phi_{dec}$ ), образования гидратов ( $\Phi_{hyd}$ ), фотодимеров ( $\Phi_{dim}$ ) и (6-4) фотопроductов ( $\Phi_{6-4}$ ) при облучении с 254 и 193 нм.

Таблица 5а. Квантовые выходы образования фотопроductов при облучении с 254 нм.

Соединение	$\Phi_{dec}$	$\Phi_{hyd}$	$\Phi_{dim}$	$\Phi_{6-4}$
TrT	0.023 (0.023)	—	0.017	0.0059
UpU	0.032 (0.025)	0.016	0.015	0.0004
CpC	0.0045 (0.003)	0.0038	§	0.0006
CpU	0.010	0.0093	§	
dCpT	0.010	0.0053	§	0.0014

Таблица 5б. Квантовые выходы образования фотопроductов при облучении с 193 нм.

Соединение	$\Phi_{dec}$	$\Phi_{hyd}$	$\Phi_{dim}$	$\Phi_{6-4}$
TrT	0.043 (0.043) <sup>†</sup>	—	0.012	0.0032
UpU	0.069	0.0088		
CpC	0.014	0.0023	§	
CpU	0.037	0.0054	§	
dCpT	0.031	0.0057	§	0.0011

Таблица 5в. Квантовые выходы образования четырех типов гидратов в динуклеотидах при облучении с 254 и 193 нм.

Соединение	$\lambda_{irr}$ (nm)	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>	H <sub>4</sub>	sum
UpU	254	0.0044	0.0044	0.0043	0.0032	0.016
CpC		0.0010	0.0012	0.0010	0.0006	0.0038
CpU		0.0047	0.0014	0.0006	0.0026	0.0093
dCpT		0.0035	0.0018			0.0053
UpU	193	0.0041	0.0025	0.0013	0.0009	0.0088
CpC		0.0008	0.0007	0.0004	0.0004	0.0023
CpU		0.0017	0.0019	0.0011	0.0007	0.0054
dCpT		0.0022	0.0035			0.0057

Отношение квантовых выходов соответствующих фотопродуктов (таблица 5 г) во всех исследованных случаях  $< 1$ , что позволяет сделать вывод о том, что указанные фотопродукты образуются с уровня  $S_1$ , но не с уровня  $S_2$ . Другим выводом является возможное существование двух путей дезактивации высоковозбужденных электронных уровней:  $S_2 \rightarrow S_1$  и  $S_2 \rightarrow S_0$ .

Согласно правилу Каша (Kasha M., ea, 1950) молекулы люминесцируют с низшего возбужденного уровня, т.е. дезактивация высоковозбужденных состояний протекает через  $S_1$  или  $T_1$ . Однако, в нескольких соединениях была зарегистрирована люминесценция с  $S_2$  в  $S_0$  (McGimpsey W.G., 1989, Kobayashi H. and Kaizu Y., 1986). Ввиду предельно маленького выхода флуоресценции нуклеиновых кислот ( $< 10^{-5}$ , Wang Y.S., 1976, Daniels M., 1976) и субпикосекундных времен жизни  $S_2$  уровня (время жизни  $S_1$  уровня, например, порядка 1 пс; Nikogosyan D.N. and Letokhov V.S., 1983), измерение эффективности  $S_2 \rightarrow S_0$  перехода методами сверхбыстрой лазерной спектроскопии (как абсорбционной, так и флуоресцентной) представляется чрезвычайно затруднительным.

Таблица 5 г. Отношение квантовых выходов продуктов при облучении с 193 и 254 нм.

Соединение	$\eta$ гидр	$\eta$ дим	$\eta$ 6-4
Урацил		0.94	
оротическая кислота		0.55	
Уридин	0.67		
5-UMP	1.0		
ТрТ		0.71	0.54
УрU	0.55		
СрС	0.61		
СрU	0.58		
dCpT	1.08		0.79

## 5. Лазерная фотохимия ДНК

### 5.1 Пиримидиновые димеры

Основные фотопродукты низкоинтенсивного УФ облучения нуклеиновых кислот с 254 нм, пиримидиновые димеры, образуются с квантовым выходом  $2.6 \cdot 10^{-3}$ . (Rahn R.O and Patrick M.H., 1976, Cadet J. and

Vigny P., 1990, Garces F. and Davila C.A., 1982). Литературные данные для диапазона длин волн 190-290 нм позволяют сделать вывод, что квантовый выход их образования практически не зависит от длины волны возбуждения (Kochevar I. and Buckley L.A., 1990, Rahn R.O and Patrick M.H., 1976). Результаты инактивации бактерий, полученные нами для длин волн 193, 216 и 254 нм (см. ниже) также указывают на эффективное образование этих фотопродуктов даже при возбуждении в ВУФ диапазоне. Приведенные выше результаты (раздел 4.3) позволяют утверждать, что высоколежащие электронные уровни не дают вклада в образование димеров. Более того, при интенсивностях пикосекундного лазерного излучения  $1 - 10$  ГВт/см<sup>2</sup> уровень  $S_1$  эффективно опустошается за счет переходов  $S_1 \rightarrow S_N$ , и, как следствие, выход димеров резко падает. Это было продемонстрировано на poly(dT), dTrpT и плазмидной ДНК (Никогосян Д.Н. и др, 1983, Есеналиев Р.О. и др, 1987).

### 5.2 Гидраты

Фотогидраты цитозина образуются в ДНК и ее компонентах с высоким квантовым выходом, однако ввиду их неустойчивости и быстрой дегидратации обратно в цитозин, биологическая роль этих продуктов незначительна (Grossman L. and Rodgers E., 1968, Vanderhoek J.Y. and Cerutti P.A., 1973). Учитывая, что потеря хромофора включает в себя все фотопродукты с небольшим поглощением на 260 нм, а разрушение нуклеотидов (измеренная после гидролиза ДНК и последующего анализа с помощью хроматографии) включает в себя все продукты кроме гидратов (гидраты СМР быстро переходят обратно в СМР), таким образом разность соответствует квантовому выходу образования гидратов.

### 5.3 (6-4)ФОТОПРОДУКТЫ

Образование (6-4)фотопродуктов регистрируется с помощью флуоресценции в диапазоне 400-420 нм при возбуждении с 320-360 нм (Hauswirth W. and Wang S.Y., 1973, Wang S.Y., 1976). Зависимость интенсивности флуоресценции на 420 нм от дозы облучения с длинами волн 254 и 193 нм приведена на рис. 14а. При облучении с 193 нм нами обнаружена зависимость квантового выхода их образования от газовой среды и увеличивается в порядке  $\Phi_{6-4}(O_2) < \Phi_{6-4}(Ar) < \Phi_{6-4}(N_2O)$  (Таблица 6). Вообще говоря, увеличение при  $N_2O$  указывает на дополнительный канал образования поврежденных (помимо  $S_1$  уровня) - через ионизацию; в пользу

этого говорит также факт возрастания выхода (6-4)фотопродуктов при переходе от 254 к 193 нм облучению.

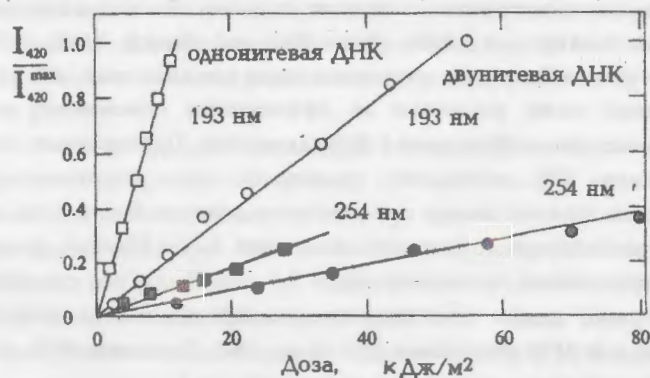


Рисунок 14а.

Таблица 6. Квантовые выходы ( $10^{-4}$ ) образования (6-4)фотопродуктов

	Газ	193 нм	254 нм
Однонитевая ДНК	N <sub>2</sub> O	20-30	
	O <sub>2</sub>	22	
	воздух		2.9
Двунитевая ДНК	Ag	7.7	
	N <sub>2</sub> O	12	
	O <sub>2</sub>	4.8	
Тимин	воздух		1.4
	Ag	1.4	
	N <sub>2</sub> O	2.1	
	O <sub>2</sub>	0.7	
	воздух		0.08

#### 5.4 Разрушение субстрата

Квантовый выход разрушения субстрата (нуклеотидов) в однонитевой ДНК определялся по количеству 5-монофосфатов с помощью жидкостной хроматографии (после гидролиза нуклеазой Р1 и инкубацией при 37°С). Аналогичный эффект - потеря хромофора - определялась по убыли поглощения на 250-270 нм в предположении, что образующиеся фотопродукты не поглощают на длине волны регистрации (таблица 7).

Таблица 7. Квантовые выходы высвобождения неповрежденных оснований  $\Phi_{во}$ , разрушения нуклеотидов в ДНК  $\Phi_{рн}$  и потери хромофора  $\Phi_{пх}$  при облучении с 193 и 254 нм, а также значения величин G для разрушения оснований при воздействии ионизирующим излучением (значения G из Cerutti, 1976).

Основание	193 нм ( $10^{-4}$ )			254 нм ( $10^{-4}$ )			G
	$\Phi_{во}$	$\Phi_{рн}$	$\Phi_{пх}$	$\Phi_{во}$	$\Phi_{рн}$	$\Phi_{пх}$	
тимин	3.4	140	-	0.02	9.6	-	0.64
цитозин	7.7	110	-	0.15	5.3	-	0.38
аденин	6.3	80	-	0.03	4.4	-	0.39
гуанин	0.2	150	-	0.03	2.1	-	0.26
T+Ц+A+Г	17.6	480	-	0.23	21.4	-	1.67
ДНК	-	-	530	-	-	31	

Отметим, что при 254 нм облучения фоторазложение пиримидинов (более чем в 10 раз выше, чем для пуринов. В случае же 193 нм, разница в значениях  $\Phi_{рн}$  значительно меньше (менее чем в 2 раза); с максимальным значением для гуанина. Повторим, что разность  $\Phi_{пх} - \Phi_{рн}$  соответствует выходу гидратов (см. раздел 5.2).

#### 5.5 Одно- и двунитевые разрывы цепей ДНК

При облучении плазмид рR322 и рTZ18R с 193 нм количество суперскрученной формы уменьшалось с дозой, одновременно количество кольцевой открытой и линейных форм увеличивалось (рис. 14б), что указывало на образование одно- и двунитевых разрывов (ОР и ДР) цепей ДНК.

Образование разрывов исследовалось в присутствии воздуха при различных интенсивностях излучения и различных концентрациях ТЕ буфера (Трис-ЕДТА в молярной пропорции 10:1, рН7.5). В отсутствие буфера квантовый выход образования однонитевых разрывов составлял  $1.5 \cdot 10^{-3}$ , двунитевых разрывов -  $6 \cdot 10^{-5}$ . Зависимость количества ДНК без разрывов от дозы во всех случаях являлась монокспоненциальной, что свидетельствовало об одноударном механизме возникновения ОР. В отличие от ОР, ДР являются следствием накопления достаточного количества ОР. С увеличением концентрации ТЕ буфера в диапазоне 0.1 - 10 мМ доза необходимая для

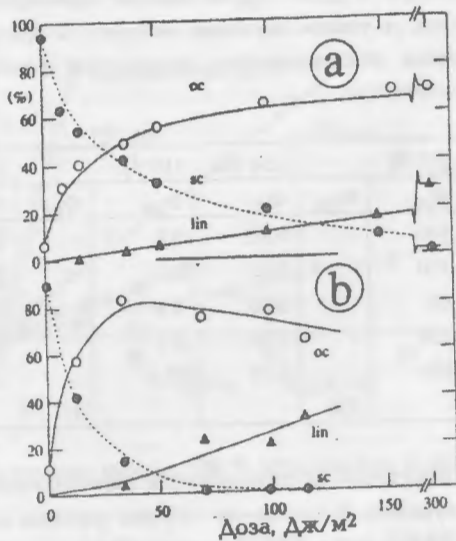
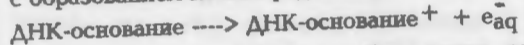


Рисунок 146.

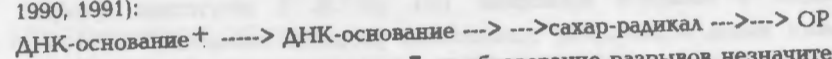
образования определенного количества ОР и ДР резко увеличивалась, что свидетельствовало о защитном эффекте буфера: за счет поглощения излучения, ионной силы, и возможно, захвата радикалов, возникающих из катион радикала ДНК.

Механизм образования разрывов ДНК включает ионизацию основания

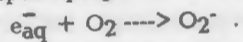
с образованием катион радикала:



Следующим звеном в цепи образования разрывов следует рассматривать отделение Н-атома от С-4 позиции сахара нейтральным радикалом основания с последующим разрывом сахаро-фосфатной цепи (Schulte-Frohlinde ea, 1989, 1990, 1991):



Роль гидратированного электрона  $e_{aq}^-$  в образовании разрывов незначительна, поскольку квантовый выход ОР одинаков в присутствии аргона и кислорода - в кислороде электрон превращается в менее реакционноспособный  $O_2^{\cdot -}$ :



Биологическая роль разрывов ДНК обсуждается в следующих разделах, посвященных инактивации плазмид и бактерий.

## 5.6 Высвобождение оснований

При 193 нм лазерном возбуждении двунитовой ДНК при помощи хроматографии после разделения фракций с маленьким молекулярным весом от остального, регистрировалось образование всех четырех оснований и ничего иного поглощающего на длине волны регистрации 260 нм, например мононуклеозидов и мононуклеотидов. Пример хроматографии показан на рис. 15 (вставка).

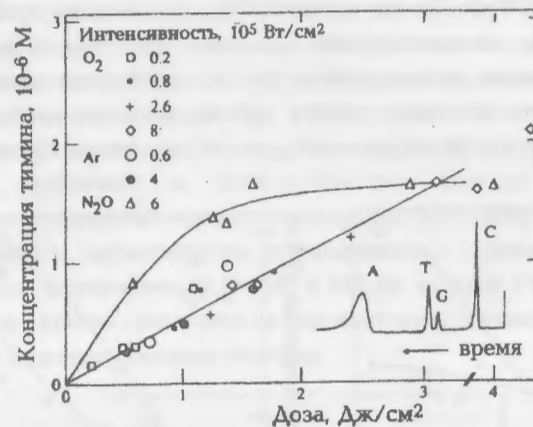


Рисунок 15. Концентрация высвобожденного от ДНК тимина в зависимости от дозы облучения с 193 нм.

Укажем, что необлученные образцы двунитовой ДНК, в отличие от однонитовой ДНК, не содержали свободных оснований. Оптическая плотность во всех случаях была постоянной и равнялась  $A = 3.0 \cdot 1 \text{ см}$ . Концентрация свободного тимина в растворе при облучении с прокачкой кислородом увеличивается линейно с дозой (до  $4 \text{ Дж/см}^2$ ) при 193 нм лазерном облучении (рис. 15). Не наблюдалось зависимости квантового выхода образования свободного тимина  $\Phi_{\text{ВО}}$  от интенсивности лазерного излучения при изменении последнего в диапазоне  $0.02 - 0.8 \text{ МВт/см}^2$ . Это указывает на то, что  $\Phi_{\text{ВО}}$  не зависит ни от дозы и ни от интенсивности излучения. В растворах с прокачкой аргоном были получены практически такие же квантовые выходы образования свободного тимина. В растворах насыщенных  $N_2O$  концентрация тимина в зависимости от дозы имеет несколько иное поведение

происходит насыщение при дозах 1 Дж/см<sup>2</sup> (что соответствует 1 % преобразованию) и остается неизменной вплоть до 4 Дж/см<sup>2</sup>. Полученный с линейного участка зависимости  $\Phi_{\text{ВО}}$  в N<sub>2</sub>O существенно больше, чем таковой в O<sub>2</sub> или Ag (таблица 4).

Лазерно-индуцированный вылет цитозина с двунитовой ДНК показан на рис. 16. Зависимости в Ag, O<sub>2</sub> и N<sub>2</sub>O насыщенных растворах описанные выше практически те же, что для тимина, т.е. линейные зависимости в Ag и O<sub>2</sub>, и насыщение в N<sub>2</sub>O. Однако, величины  $\Phi_{\text{ВО}}$  для цитозина, примерно в два раза больше, чем соответствующие значения для тимина (таблица 4). Аналогичные эффекты наблюдались и для высвобождения аденина, с той лишь разницей, что линейные участки кривых доходили до больших доз. Наименьший выход при фиксированной дозе наблюдался для гуанина (рис.17).

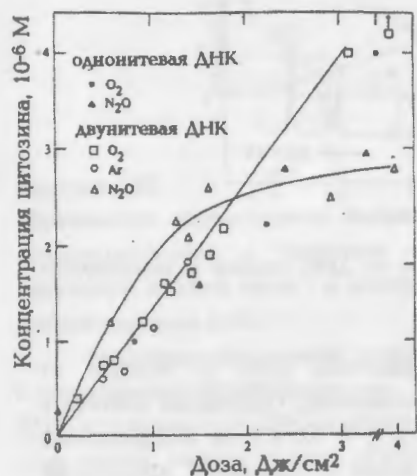


Рисунок 16

$\Phi_{\text{ВО}}$  для гуанина в 10 - 50 меньше, чем соответствующие  $\Phi_{\text{ВО}}$  для остальных трех оснований. С другой стороны, при переходе от O<sub>2</sub> к N<sub>2</sub>O, увеличение значительно больше. Следует отметить, что эффективность разрыва N-гликозидной связи при двухквантовом возбуждении с 266 нм и последующей обработкой щелочью, - в обратном порядке, т.е. наибольшая для гуанина и наименьшая для цитозина (Budowsky E.I. ea, 1986).

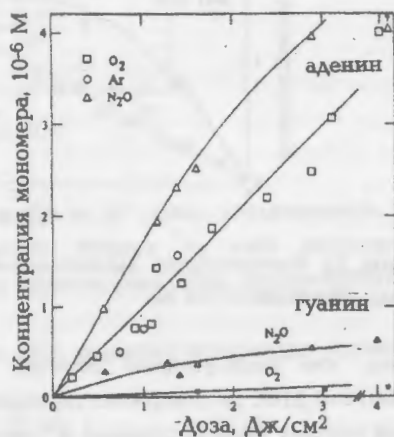


Рисунок 17

### 5.7 Межнитевые ковалентные сшивки

Образование межнитевых сшивок и локальных денатурированных участков в ДНК при облучении с 193 нм определялось с использованием красителя акридина оранжевого как флуоресцентного индикатора (Завильгельский Г.Б. и др., 1964). Известно, что акридин оранжевый прикрепляется к двунитовой ДНК в виде мономеров и к однонитовой ДНК в виде димеров. Мономеры и димеры характеризуются флуоресценцией с максимумом, соответственно, на 530 и 640 нм. После УФ облучения часть препаратов ДНК денатурировалась при 95 С и затем быстро охлаждалась во льду. ДНК с одним и более межнитевыми сшивками после этой процедуры денатурации-охлаждения полностью ренатурировалась. Затем эти препараты ДНК вместе с теми не прошедшими такой процедуры окрашивались акридином оранжевым и регистрировались спектры флуоресценции. Образование межнитевых сшивок и локальных денатурированных участков регистрировалось, соответственно, по увеличению и уменьшению отношения интенсивности флуоресценции на 640 и 530 нм от дозы УФ облучения (рис. 18). Верхняя кривая относится к межнитевым сшивкам, нижняя - к локальными денатурированным участкам.

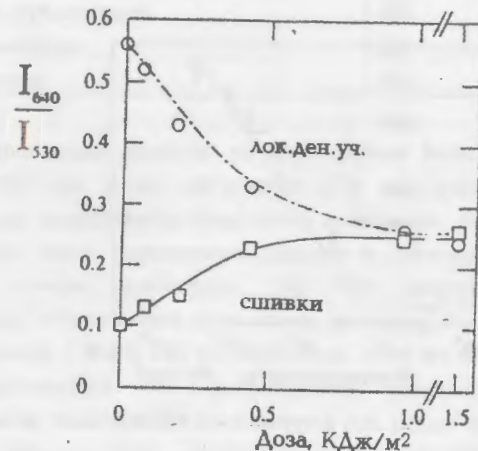


Рисунок 18.

Результаты измерений (таблица 8) показывают, что в случае использования конкретного газа оба эффекта, образование межнитевых сшивок и локальных денатурированных участков, коррелируют. Отсутствие зависимости от интенсивности излучения указывает на одноквантовый механизм образования указанных фотоповреждений. В то же время, наблюдается четкий эффект от

используемого газа (увеличение квантового выхода в  $N_2O$ ), что указывает на то, что эти эффекты инициируются фотоионизацией, т.е. они могут быть следствием образования свободных радикалов. В присутствии  $O_2$ , как известно, гидратированный электрон трансформируется в  $O_2^-$ .

Таблица 8

Интенсивность МВт/см <sup>2</sup>	Газ	$\Phi_{\text{сшивки}} (10^{-4})$	$\Phi_{\text{лок. ден. уч.}} (10^{-4})$
3.0	аргон	0.12	0.14
0.15	аргон	0.45	0.26
	$N_2O$	1.6	2.3
	воздух	0.9	0.8

Образование межнитевых ковалентных сшивок также исследовалось при мощном пикосекундном облучении с длинами волн 216 и 270 нм. Четкая зависимость квантового выхода образования сшивок от интенсивности облучения свидетельствует о двухквантовом механизме их образования (рис. 19).



Рисунок 19.

### 5.9 Квантовые выходы образования фотопродуктов

В таблице 9 приведены квантовые выходы ( $10^{-4}$ ) образования различных фотопродуктов/фотоповреждений в двунитевой ДНК в

присутствии воздуха (в случае измерения разрушения нуклеотидов использовалась одонитевая ДНК).

Таблица 9

Процесс	193 нм	254 нм
Межнитевые сшивки + локальные денатурированные участки	1.7	0.021
Двунитевые разрывы	0.6	0.014
Одонитевые разрывы	15	0.4
Высвобождение оснований	18	0.23
(6-4)фотопродукты	4.8	1.4
Пиримидиновые фотодимеры	17-26	26
Инактивация плазмиды в K12 AB1157	14	1.6
Инактивация плазмиды в K12 AB1886	21	4.2
Инактивация плазмиды в K12 AB2463	-	4.1
Инактивация плазмиды в K12 AB2480	30	31
Фотогидраты	-	10
Разрушение нуклеотидов	480	21
Потеря хромофора	530	31
Фотоионизация	200	-

Сравнение квантовых выходов на двух длинах волн в условиях наличия ионизации (193 нм) и его отсутствия (254 нм) позволяет выявить класс фотопродуктов, являющихся следствием ионизации: разрывы цепей ДНК и N-гликозидной связи, межнитевые сшивки и локальные денатурированные участки и потеря хромофора (за счет разрушения нуклеотидов). Эффективность образования указанных фотопродуктов возрастает в 10-100 раз при переходе с 254 к 193 нм облучению. В то же самое время квантовые выходы классических УФ повреждений (димеров, гидратов и (6-4)фотопродуктов) практически не меняются (см. раздел 4.2).

Таким образом, при облучении с 193 нм образуются два класса фотопродуктов: ионизационных и классических УФ (254 нм-специфичных). Касательно биологической роли ионизационных фотопродуктов, отметим, что, в частности, инактивация плазмид и бактерий *E. coli* K12 ~~данного~~ штамма AB1157, способного репарировать пиримидиновые димеры, имеет место в основном за счет одонитевых разрывов цепей ДНК (подробнее в разделе 7).

## 6. Фотореакции в модельных компонентах ДНК

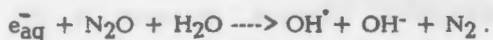
### 6.1 Цитозин и его производные

Фоторазложение цитозина и poly C при возбуждении с 193 нм исследовалось по изменению оптического спектра поглощения и с помощью жидкостной хроматографии. Одним из основных путей разложения poly C является высвобождение основания (таблица 10).

Таблица 10

Соединение	Газо	$\Phi$ разл $10^{-2}$	$\Phi$ polyC $\rightarrow$ cyt $10^{-2}$
poly C	O <sub>2</sub>	2.6	1.0
	N <sub>2</sub> O	2.4	1.3
	Ar	0.7	0.7
цитозин	O <sub>2</sub>	3.5	
	N <sub>2</sub> O	3.5	
	Ar	1.3	

Основным фотопродуктом цитозина и его производных при облучении с длиной волны 254 нм является 5,6-дигидро-6-гидрокси-цитозин (фотогидрат) (Rahn R.O and Patrick M.H., 1976). При облучении с 193 нм после дезактивации S<sub>2</sub>  $\rightarrow$  S<sub>1</sub> также образуются гидраты. Однако, в этом случае значительный вклад в фоторазложение имеет фотоионизация, приводящая, в частности, к образованию одонитевых разрывов и высвобождению оснований. Вклад гидратов при облучении polyC с 193 нм не является основным, поскольку квантовый выход гидратации polyC при 254 нм меньше 0.003 (сравни с табл. 10). Значительное увеличение квантового выхода разложения polyC и цитозина в присутствии N<sub>2</sub>O объясняется образованием реакционно-способного радикала OH путем



OH радикалы известны как эффективно взаимодействующие с основаниями нуклеиновых кислот. Прямой фотолиз N<sub>2</sub>O вероятно не имеет существенного

вклада поскольку квантовый выход разрыва N-гликозидной связи не меняется при увеличении концентрации poly C в 3 раза.

При облучении poly C с 193 нм концентрация свободного цитозина увеличивается с дозой, достигает максимума и при дозах больше 1.8 Дж/см<sup>2</sup> уменьшается (рисунок 20). Этот эффект объясняется одновременным участием двух процессов: фоторазложением свободного цитозина и цитозина в составе poly C. Экспериментальные результаты для случая O<sub>2</sub> сравнивались с расчетной кривой, полученной из уравнений:

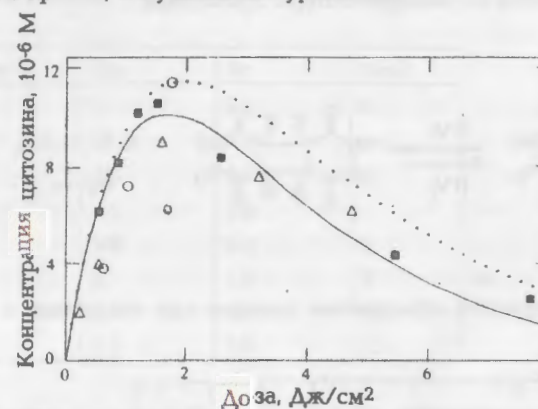


Рисунок 20.

$$\begin{aligned} d[\text{cyt}]/dD &= N(\Phi_{\text{polyC} \rightarrow \text{cyt}} \epsilon_{\text{polyC}} [\text{polyC}] - \Phi_d(\text{cyt}) \epsilon_{\text{cyt}} [\text{cyt}]) \\ d[\text{polyC}]/dD &= -N(\Phi_{\text{polyC} \rightarrow \text{cyt}} + \Phi_d(\text{polyC})) \epsilon_{\text{polyC}} [\text{polyC}] \end{aligned}$$

где D - доза облучения (в квантах на квадратный сантиметр),  $\epsilon_{\text{polyC}}$  и  $\epsilon_{\text{cyt}}$  молярные коэффициенты экстинкции polyC и cyt, соответственно, на длине волны облучения 193 нм,  $N = 10^3 \ln 10 / N_A$  ( $N_A$  - число Авогадро). Первый член в первом из уравнений описывает образование свободного цитозина за счет разрыва N-гликозидной связи, и второй член - фоторазложение цитозина. Второе уравнение описывает разложение polyC за счет как вылета основания, так и потери хромофора. Сплошная кривая на рис. 20 получена подстановкой в уравнения значений квантовых выходов из таблицы 10. Как видно, согласие с экспериментом достаточно хорошее, что указывает на правильность выбранной модели.

## 6.2 Урацил и его производные

При облучении пиримидинов (в частности урацила и его производных) с 254 нм основными фотопродуктами являются гидраты и димеры (рис. 11) (Swenson P.A. and Setlow R.B., 1963, Pearson M. ea, 1966, Brown I.H. and Johns H.E., 1968, Fisher G.J. and Johns H.E., 1976). Их квантовые выходы находятся в диапазоне 0.006-0.05. Для уридина и 5-UMP основным фотопродуктом является гидрат. Маленький вклад димеров подтверждается незначительным кислородным эффектом на реакцию потерю хромофора.

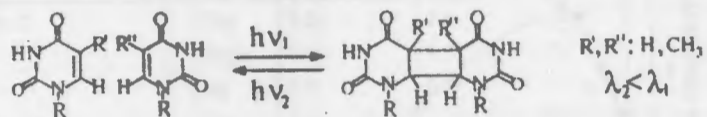


Рисунок 21а иллюстрирует образование димеров при облучении с  $\lambda_1$  и реверсия с  $\lambda_2$ .

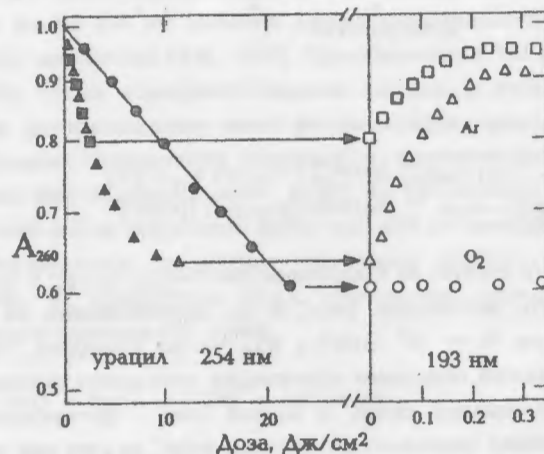


Рисунок 21б. Первоначальное уменьшение и последующее увеличение поглощения на 260 нм при облучении водного раствора урацила в присутствии аргона, соответственно, с 254 и 193 нм.

В отсутствие кислорода основными фотопродуктами урацила являются димеры; их относительный вклад может быть оценен путем облучения с 193 нм, что приводит к разрыву димеров и образованию мономеров (реакция фотореверсии с квантовым выходом 1) (рис. 21а, б).

Нами обнаружено образование свободных оснований за счет разрыва N-гликозидной связи при облучении с 254 нм. Квантовые выходы этого процесса ( $10^{-5}$ ) в присутствии различных газов приведены в таблице 11.

Таблица 11

Соединение	O <sub>2</sub>	Ar	N <sub>2</sub> O
уридин	6	2-4	6
5-UMP	3	2-3	4-5
poly U	3.5	1.5	
poly dU	2.1	2.4	
аденозин	3-5	3-8	1
5-AMP	2	1.3	2
poly A	2.5	1.6	2-3
poly dA	3.5	2.0	3.5

Квантовые выходы очень малы (меньше  $10^{-4}$ ), и чувствительны к присутствию кислорода, в частности для уридина.

При облучении с 193 нм вышеуказанные фотопродукты также образуются, однако, не обязательно с той же эффективностью. В добавок, образуются фотопродукты результирующие от однофотонной ионизации



Здесь R относится к сахаро-фосфатному остатку. В нейтральных водных растворах катион радикалы быстро взаимодействуют с водой или депротонируются:



Гидратированный электрон может также взаимодействовать с основанием с образованием анион радикала

$e_{aq} + R\text{-основание} \rightarrow R\text{-основание}^-$

$R\text{-основание}^- + H_2O \rightarrow R\text{-основание}-(H) + OH^-$

Два процесса результирующие от катион радикала, вылет оснований и разрывы цепей ДНК, включают в себя радикалы сахара, согласно:

$R_1\text{-основание}-OH + R_2\text{-основание} \rightarrow R_1\text{-основание}/H_2O + R_2\text{-(H)-основание}$

$R_1\text{-основание}-(H) + R_2\text{-основание} \rightarrow R_1\text{-основание} + R_2\text{-(H)-основание}$

$R_2\text{-(H)-основание} \rightarrow \rightarrow$  вылет оснований и разрыв цепей

В присутствии  $N_2O$  оба этих процесса значительно более эффективны за счет реакции трансформации гидратированного электрона в ОН радикал (см. раздел 6.1). Из радиационной химии (von Sonntag C., 1986) ОН радикалы известны как эффективно взаимодействующие с основаниями нуклеиновых кислот. Таким образом может быть объяснено двукратное увеличение эффективности разрывов цепей (см ниже) и N-гликозидной связи в присутствии  $N_2O$  (см. таблицу 4).

### 6.3 Аденин и его производные

При облучении аденина и его производных с 254 нм образуются несколько фотопродуктов (например, в случае аденозина 11, Arce R. ea, 1993). Два основных димерных фотопродукта обнаружены и идентифицированы (Porschke D., 1973, Kumar S. ea, 1991). Измеренный нами суммарный квантовый выход фоторазложения аденина и производных (потеря хромофора и разрушение нуклеотидов, см. раздел *Экспериментальные методы*), так же как и разрывов N-гликозидной связи очень мал и составляет порядка  $(3-15) \cdot 10^{-5}$ . Эффективность указанных реакций не зависит от присутствия или отсутствия  $N_2O$ , что указывает на отсутствие ионизации при 254 нм. В тоже время, при 193 нм облучении в присутствии  $N_2O$  наблюдается двукратное увеличение квантового выхода разрушения нуклеотидов, что является следствием ионизации и участия реакционно-способного ОН радикала в фоторазложение (см. реакции в разделе 6.2). Квантовые выходы разрушения нуклеотидов (и потери хромофора) более чем в 10 раз выше при 193 нм облучении в сравнении с 254 нм. Таким образом, в случае аденин содержащих соединений основными фотопродуктами при 193 нм облучении являются таковые результирующие от ионизации.

### 6.4 Гуанин и его производные

В сравнении с  $\gamma$ -радиолизом, информация о фотохимии гуанина и его производных с 254 нм и, тем более с 193 нм, очень скудная (Steenken S., 1992, Vieira A.J.S.C. ea, 1993). Это, в частности, является следствием его высокой фотохимической устойчивости. Фотоионизация наблюдалась с использованием мощного лазерного излучения с 266 нм (в условиях двухступенчатого возбуждения) и 193 нм (одноквантовое возбуждение) с квантовым выходом 0.034-0.057 (193 нм, Candeias L.P. ea, 1992, Gurzadyan and Gbner, 1992). Нами также исследовалось образование свободных оснований в poly G за счет разрывов N-гликозидной связи:  $\phi_{gr} = 4.5; 7.3$  и  $12 \cdot 10^{-4}$  в присутствии аргона, кислорода и  $N_2O$ , соответственно.

## 7. Лазерная фотобиология ДНК

### 7.1 Инактивация плазмид

Моноэкспоненциальная зависимость выживаемости плазмидной ДНК от дозы облучения с 193 нм при трансформации бактерий E.coli K12 AB1886 и AB1157 (рис. 22) указывает на одноударный механизм инактивации плазмид.

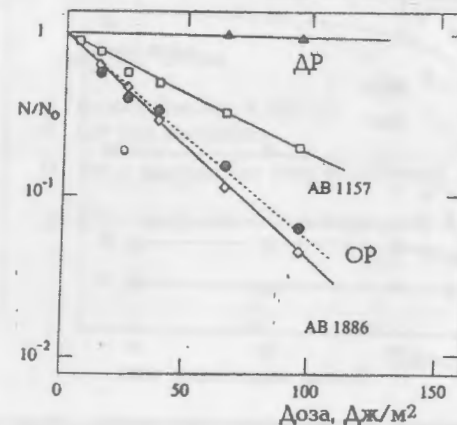


Рисунок 22.

Разница в наклонах этих двух кривых соответствует вкладу димеров и (6-4) фотопродуктов в летальный фотопродукт. Для AB2480 известно, что каждый димер является летальным (Howard-Flanders P. and Boyce R.P., 1966). Обнаружено, что димеры при 193 нм, так же как и при 254 нм облучении, являются основными летальными фотопродуктами; квантовые выходы остальных фотоповреждений значительно меньше квантового выхода инактивации. В случае E.coli K12 AB1157, эффективно репарирующим димеры

и (6-4)фотопродукты, основными летальными повреждениями являются одонитевые разрывы цепей ДНК и освобожденные основания. Вклад двунитевых разрывов в инактивацию AB1157 меньше 15%. В случае AB1886 30-40% летальных повреждений являются димеры и (6-4)фотопродукты, остальное - одонитевые разрывы и разрывы N-гликозидной связи.

### 7.2 Роль разрывов цепей ДНК в инактивации плазмид

Процессы, протекающие в клетках моделировались с использованием протеинового экстракта из бактериальных штаммов E.coli AB1157 (дикий тип по репарации) и AB2480 *uvr-гес*-. Плазмидная ДНК pBR322 после облучения с 254 нм инкубировалась в протеиновом экстракте при 37°С и затем с помощью гель-электрофореза исследовалась на образование одно- и двунитевых разрывов. Наблюдалось ферментативная трансформация 254-нм-индуцированных фотопродуктов (пиримидиновых димеров и (6-4)фотопродуктов) в одонитевые разрывы (рис. 23).



Рисунок 23.

Отметим, что в условиях эксперимента не наблюдалось образование двунитевых разрывов. Без инкубации в экстракте (непосредственно после УФ облучения) практически не образуется разрывов. При инкубации же при временах меньше 3 мин количество ОР увеличивается и затем переходит на насыщение. Зависимость ОР от дозы УФ облучения указывает на ферментативное трансформирование УФ повреждений. Моноэкспоненциальная зависимость количества с разрывов от дозы (рис. 24) свидетельствует о том, что один фотопродукт трансформируется в один

разрыв. Из рис. 24 видно, что квантовые выходы биологической инактивации при трансформации бактерий E.coli AB1157 и энзиматически-индуцированных разрывов одинаковы (оба кривых параллельны). Отметим, что квантовый выход пиримидиновых димеров примерно в 20 раз меньше квантового выхода инактивации в E.coli AB1157. Таким образом, более 90% димеров репарируются в бактериях с помощью *uvr* системы. Оставшаяся часть (10%) не репарируется *uvr* системой и остается как нерепарируемые ОР. Природа этих нерепарируемых ОР следующая: в процессе энзиматической репарации, как промежуточное звено, образуется ОР на месте димера. Очевидно, такой

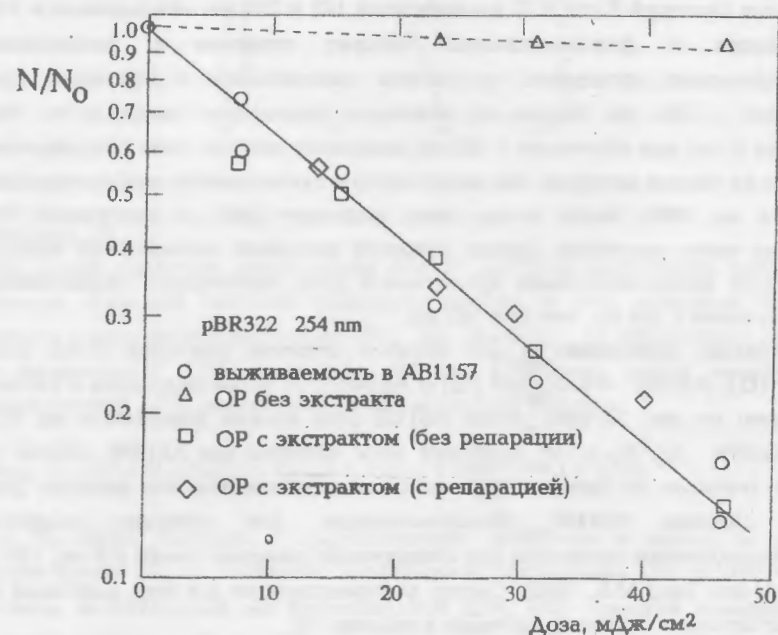


Рисунок 24.

ОР репарируется энзиматической системой репарации. Один тип повреждения трудно репарировать, это - двунитевые повреждения. Возможное объяснение в нашем случае может состоять в следующем: одонитевый разрыв или пробел в дочерней нити напротив фотодимера. Очевидно, такой тип одонитевых разрывов не может быть репарирован *uvr* системой репарации.

При облучении плазмиды с длиной волны 193 нм, как было показано выше, эффективно образуются одонитевые разрывы. Инкубация 193 нм-

облученной плазмиды в протеиновом экстракте из *E.coli* AB1157 приводит к появлению двунитевых разрывов. Сравнение инактивации плазмиды с кривой соответствующей двунитевым разрывам позволяет выявить биологическую роль энзиматически образуемых ДР: их вклад составляет 20-30%, основной же вклад в инактивацию плазмид имеют непосредственно (лазерно) индуцируемые одонитевые разрывы.

### 7.3 Инактивация бактерий *E.coli*

В этой части приводятся результаты полученные при непосредственном облучении бактерий *E.coli* K12 длинами волн 193 и 216 нм. Исследовались УФ инактивация и фотореактивация четырех штаммов с различными репарационными мутациями, результаты сравнивались с таковыми при облучении с 254 нм. Одним из основных результатов является то, что бактерии *E.coli* при облучении с 193 нм инактивируются за счет повреждения ДНК, но не белков мембран, как имеет место в случае клеток млекопитающих (Cadet J. ea, 1992). Белки только лишь защищают ДНК от вакуумного УФ поглощая часть излучения. Другой основной результат: штамм *E.coli* AB1157 репарировал фотоповреждения хромосомной ДНК значительно эффективнее при облучении с 254 нм, чем при 193 нм.

Кривые выживаемости для четырех штаммов бактерий *E.coli* K12 AB1157 (□), AB1886 (○), AB2463 (△) и AB2480 (▽) после облучения с 193 нм приведены на рис. 25 (для случая AB1157 доза должна умножаться на 10). Зависимости  $N/N_0$  от падающей дозы линейны для AB1886, AB2463 и AB2480 указывая на одноударный механизм, и незначительно выгнуты для дикого штамма AB1157. Фотореактивация, как известно является высокоселективным процессом для обнаружения димеров (Heelis P.F ea., 1993, Sancar A. and Tang M.S., 1993). Сектор фотореактивации для трех длин волн и четырех штаммов бактерий приведен в таблице 12.

Таблица 12.

длина волны, нм	AB1157	AB1886	AB2463	AB2480
254	<3	85 ± 3	81 ± 3	88 ± 3
216	<3	63 ± 8	68 ± 8	80 ± 3
193	<3	67 ± 3	70 ± 3	70 ± 3

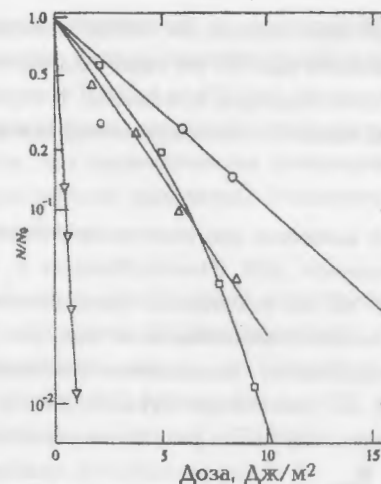


Рисунок 25.

Как видно, исключая дикий штамм AB1157 (который эффективно репарировал димеры темновой системой репарации клеток), в трех остальных штаммах сектор фотореактивации больше 60%. Это указывает на образование димеров в хромосомной ДНК даже при 193 нм. Квантовый выход инактивации хромосомной ДНК рассчитывался по следующей формуле

$$\Phi_{ina} = (330 \times N_a) / [D_{37} \times T(\lambda_{irr}) \times \epsilon(\lambda_{irr}) \times MW(ДНК) \times \ln 10]$$

где  $N_a$  число Авогадро,  $T(\lambda_{irr})$  - оптическая прозрачность клеток на данной длине волны,  $\epsilon(\lambda_{irr})$  - молярный коэффициент поглощения ДНК и  $MW = 2 \cdot 10^9$  г/моль, молекулярный вес бактериальной ДНК; 330 - средний молекулярный вес нуклеотидов (таблица 13).

Таблица 13.

длина волны, нм	T	$\Phi_{ina} (10^{-4})$			
		AB1157	AB1886	AB2463	AB2480
254	0.80	0.032	0.90	1.9	29
216	0.48	0.027	0.34	0.91	15
193	0.30	0.077	0.59	0.99	12

Сравнение квантовых выходов инактивации для АВ1157 показывает основной вклад ионизационных повреждений при 193 нм (одно- и двунитевые разрывы, разрушение нуклеотидов и освобожденные основания). В случае АВ2480 при всех трех длинах волн димеры являются основным летальным фотопродуктом.

#### 7.4 Разрушение белков

Известно, что основной мишенью при инактивации бактерий *E.coli* K12 при облучении с 254 нм является ДНК (Howard-Flanders P, and Theriot L., 1966). При переходе с 254 к 193 нм значительно увеличивается поглощение белков содержащих ароматические аминокислоты, так для ароматических аминокислот молярный коэффициент поглощения становится в 100 раз больше, и в 2-3 раза больше чем таковой для нуклеотидов (Repeyev Yu.A. ea, 1992). Учитывая высокий квантовый выход разрушения аминокислот при 193 нм (0.1-0.24) произведение  $\phi_{dec} \cdot \epsilon$  (эффективность инактивации белков) становится на 193 нм в 1000 раз больше, чем на 254 нм (Nikogosyan D.N. and Götteg H., 1992). Сравнение средних летальных доз для трех длин волн облучения в случае АВ2480, однако же, указывает на пренебрежительно малую роль вклада разрушения белков в инактивацию бактерий: на длине волны 193 нм доза в 8 раз больше, чем на 254 нм. Основная функция белков и других клеточных компонентов, таким образом, является лишь защита внутриклеточной ДНК от облучения с 193 и 216 нм, но не инактивация. Дополнительными аргументами в пользу этого вывода являются:

- наличие эффективной фотореактивации на длинах волн 216 и 193 нм;
- существенная разница в квантовых выходах инактивации для  $uvrA^+$  и  $uvrA^-$  систем, указывающая на более чем 90% вклад повреждений ДНК (димеров и (6-4) фотопродуктов) в инактивацию бактерий.

#### 7.5 Сравнение инактивации плазмид и бактерий

На длине волны 254 нм квантовый выход инактивации *E.coli* K12 АВ2480 для плазмидной, и хромосомной ДНК одинаков в пределах фактора 2 (таблица 14). Это указывает на то, что во всех этих случаях ДНК инактивируется за счет единичного фотодимера на геном. Все остальные фотопродукты имеют меньшие квантовые выходы (сравни данные табл. 9 и 14). Бактериальный штамм АВ2480 не может репарировать фотодимеры  $uvrABC$  системой репарации, а также двунитевые разрывы, возникающие как промежуточное звено при неудачной попытке репликации ДНК содержащей димер.

Выживаемость плазмидной и хромосомной ДНК в *E.coli* K12 АВ2463 одинакова; квантовые выходы инактивации изменяются в пределах  $1.8 \cdot 10^{-4}$  -  $2.7 \cdot 10^{-4}$  для *E.coli* и от  $1.2 \cdot 10^{-4}$  до  $4.0 \cdot 10^{-4}$  для различных фагов и плазмид. Так как репарация двунитевых разрывов в указанном штамме ( $rec^-$ ) отсутствует, можно заключить, что энзиматическая репарация  $uvrABC$  системой в обоих типах ДНК практически одинакова. Указанное заключение относится к пиримидиновым димерам.

Таблица 14. Квантовые выходы ( $10^{-4}$ ) инактивации для разных биообъектов на длине волны облучения 254 нм (вычислены с использованием значений средних доз инактивации *доза<sub>37</sub>* из Gurzadyan ea, 1993, Radman ea, 1970, Ogawa ea, 1968, Tyrrell, 1979, Nikogosyan ea, 1986, Howard-Flanders ea, 1966, Hodges ea, 1980, Webb and Brown, 1976, Strike and Lodwick, 1987).

Биообъект	Мол.вес ( $10^6$ )	AB2480	AB1886	AB2463	AB1157
pTZ18R	1.89	31	4.3	4.0	1.6
pBR322	2.88	27	-	-	1.8
Фаг $\lambda$	33	4.9	2.3	1.3	0.4
		-	6.3	-	1.3
		-	5.9	-	0.85
		18	-	-	-
		6.8	5.2	1.8	1.1
Фаг T1	31	-	8.2	2.6	2.1
<i>E. coli</i>	2000	28	0.7	1.9	0.012
		14	0.37	-	-
		28	-	1.2	-
		-	-	2.8	0.023
		27	-	-	-
		-	1.7	2.8	0.045

В штамме АВ1886, неспособной репарировать димеры и (6-4)фотопродукты, инактивация хромосомной ДНК в 10 раз меньше, чем плазмидной. Обнаружена также существенная разница в квантовых выходах инактивации на всех трех длинах волн 193, 216 и 254 нм для *E.coli* K12 АВ1886 и особенно АВ1157 для плазмидной и хромосомной ДНК; так для 193 нм  $\phi_{ina}$  в 35 и 180 раз, соответственно выше для плазмидной ДНК. Этот факт объясняется

недостаточной эффективностью гесА системы репарации для плазмид вследствие единичного акта инфицирования клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные выводы.

1. Предложены новые приближенные формулы для расчета углов синхронизма в одноосных и двухосных нелинейных кристаллах.
2. Теоретически и экспериментально исследовано двухквантовое поглощение в кристаллах при наличии двухфотонного поглощения кристаллической решетки и двухступенчатого поглощения молекул примесей. Указано, что для корректного определения коэффициента двухфотонного поглощения необходимо использование интенсивностей лазерного излучения  $> 0.5$  ГВт/см<sup>2</sup>.
3. Обнаружен и теоретически и экспериментально исследован эффект расфокусировки лазерного УФ излучения в нелинейно поглощающих средах (двухфотонное поглощение в воде). Предложен новый метод измерения коэффициента двухфотонного поглощения и локального изменения температуры в облучаемом участке среды. Показано, что тепловыми эффектами при пикосекундном лазерном облучении биомолекул в воде можно пренебречь.
4. Предложен новый метод измерения chirpa ультракороткого импульса с помощью нелинейного динамического спектрографа с временным 0.1 пс и спектральным разрешением 0.02 нм. Измерен chirp одиночного пикосекундного импульса лазера на фосфатном стекле и излучения пикосекундного континуума.
5. Систематически исследована фотохимия и фотобиология нуклеиновых кислот и их компонентов при лазерном облучении с длиной волны 193 нм. Показано, что лазерное излучение с 193 нм ионизует молекулы нуклеиновых кислот по одноквантовому механизму. Измерен квантовый выход ионизации для ряда модельных молекул нуклеиновых кислот.
6. Предложен метод определения эффективности перехода с высоковозбужденного на первый возбужденный электронный уровень молекул с помощью фотолиза. Показано, что в молекулах нуклеиновых кислот димеры, гидраты, (6-4)фотопродукты образуются только с низколежащего уровня S<sub>1</sub> (или T<sub>1</sub>), но не с S<sub>2</sub>. Измерена эффективность безызлучательного

S<sub>2</sub> ----->S<sub>1</sub> перехода для ряда компонентов нуклеиновых кислот: ГрТ, УрУ, СрС, СрУ, dСрТ, урацил, уридин, оротическая кислота, 5-UMP. Она находится в диапазоне 0.5 - 1.

7. Всесторонне исследована фотохимия цитозин, урацил и аденин содержащих нуклеиновых компонент, измерены квантовые выходы потери хромофора, разрушения нуклетоидов, образования гидратов и димеров (для пиримидинов) в различных условиях эксперимента (газ, длина волны, интенсивность излучения).
8. Выявлено эффективное образование одно и двунитевых разрывов цепей ДНК, разрывов N-гликозидной связи, межнитевых сшивок, локальных денатурированных участков, разрушения субстрата (нуклеотидов) при облучении ДНК с 193 нм.
9. Выявлен механизм инактивации плазмид и бактерий E.coli K12 при облучении с 193 нм. Основной мишенью, аналогично с 254 нм, в бактериях E.coli K12 является ДНК. Двойной мутант АВ2480 (uvr<sup>-</sup> гес<sup>-</sup>) инактивируется в основном за счет пиримидиновых димеров (как плазмидная, так и хромосомная ДНК). Для дикого штамма E.coli K12 АВ1157 основными летальными повреждениями являются инициационные фотопродукты, одонитевые разрывы, разрывы N-гликозидной связи и поврежденные нуклеотиды.
10. Выявлена роль одонитевых разрывов цепей ДНК как промежуточного звена в цепи образования летальных повреждений в плазмиде при облучении с длиной волны 254 нм и, соответственно, двунитевых разрывов в случае 193 нм.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. D.N.Nikogosyan, G.G.Gurzadyan. Two-quantum photoprocesses in DNA and RNA biopolymers under powerful picosecond laser UV irradiation. Laser Chemistry, v.4, p.297-303, 1984.
2. Г.Г.Гурзаян, Д.Н.Никогосян. Двухступенчатое возбуждение оснований в составе биополимеров ДНК и РНК. Доклады АН СССР, том 276, с. 628-631, 1984.

3. G.B.Zavilgelsky, G.G.Gurzadyan, D.N.Nikogosyan. Pyrimidine dimers, single-strand breaks and crosslinks induced in DNA by powerful laser UV radiation. Photobiochem. Photobiophys., v.8, p.175-187, 1984.
4. R.E.Avalyan, G.G.Gurzadyan, R.N.Gyuzalian. Investigation of the temporal distribution of picosecond continuum by the "sum-frequency beam" technique. in Abstracts of IV Internat. Symp. "Ultrafast Phenomena in Spectroscopy" (GDR, 1985), p.PW33, 1985.
5. Г.Б.Завильгельский, Г.Г.Гурзаян, Д.Н.Никогосян. Индуцируемые лазером межнитевые сшивки в ДНК. Биофизика, том 30, с.568-570, 1985.
6. Г.Г.Гурзаян. Двухквантовая лазерная фотохимия ДНК. Тезисы докладов респ. конференции молодых ученых и спец., Тбилиси, с. 38-40, 1986.
7. Д.Н.Никогосян, Г.Г.Гурзаян. Новые формулы для расчета углов синхронизма. Квантовая электроника, том 13, с.2519-2520, 1986.
8. R.E.Avalyan, G.G.Gurzadyan, R.N.Gyuzalian. Investigation of the temporal distribution of picosecond continuum by the "sum-frequency beam" technique. Proceed. IV Internat. Symp. "Ultrafast Phenomena in Spectroscopy" (GDR, 1985), Moscow, p.127-130, 1987.
9. Д.Н.Никогосян, Г.Г.Гурзаян. Кристаллы для нелинейной оптики. Квантовая электроника, том 14, с.1529-1541, 1987.
10. Г.Г.Гурзаян, Р.Н.Гюзалин, И.С.Захаркин. Измерение чирпа пикосекундных импульсов лазера на фосфатном стекле с неодимом методом динамической спектроскопии. Квантовая электроника, том 14, с.1660-1663, 1987.
11. Գ. Գուրզադյան: Լազերների կիրառման հեռանկարները կենսաբանության մեջ: Փիտոթյուն և տեխնիկա, N 4, էջ 15-19, 1988.
12. Գ. Գուրզադյան, Կ. Ոսկանյան: Լազերային բջկության ֆիզիկական առաջնությունները: Փիտոթյուն և տեխնիկա, N 11, էջ 48-51, 1988.

13. Г.Г.Гурзаян, К.Ш.Восканян, Р.К.Испирян, С.Г.Арутюнян. Фотомодификации вторичной структуры ДНК при мощном лазерном УФ облучении. Тезисы докладов 4 координ. семинара "Динамика и активность биол.макромолекул: лазерный и компьютерный эксперимент", Ереван, с. 70-71, 1988.
14. G.G.Gurzadyan, K.Sh.Voskanyan, S.G.Harutunyan. Investigation of DNA two-quantum photoproducts induced by intense 216 and 270 nm laser irradiation. Abstracts of fifth symposium on optical spectroscopy. SOS, p. 97, Eisenach, GDR, 1988.
15. А.Г.Арутюнян, Г.Г.Гурзаян, Р.К.Испирян. Генерация пятой гармоники пикосекундного лазера на алюминате иттрия. Квантовая электроника, том 16, с.2493-2495, 1989.
16. G.G.Gurzadyan, R.K.Ispiryan, K.Sh.Voskanyan. Two-quantum photoprocesses in DNA and water at picosecond laser UV 216 and 270 nm irradiation. Abstracts of 3rd Congress of the European Society for photobiology, Budapest, p. 231, 1989.
17. Г.Г.Гурзаян, Р.К.Испирян. Нелинейная дефокусировка лазерного пучка вследствие нелинейного поглощения излучения. Оптика и спектроскопия, том 68, с. 1348-1351, 1990.
18. G.G.Gurzadyan, R.K.Ispiryan. Efficiency of laser photolysis of nucleic acids at 216 nm. Abstracts of Internat. Conference on Laser in the Life Sciences, Guangzhou, China, p. 15, 1990.
19. G.G.Gurzadyan, R.K.Ispiryan. Two-photon absorption peculiarities of KDP, KB5 and quartz crystals at 216 nm. Abstracts of 4 national conference Laser and their applications, Plovdiv, Bulgaria, p. 146-147, 1990.
20. G.G.Gurzadyan, R.K.Ispiryan. Nonlinear defocusing of laser radiation in nonlinear absorbing medium. J. Modern Optics, v. 38, p.1265-1269, 1991.

21. Г.Г.Гурзаян, В.Г.Дмитриев, Д.Н.Никогосян. Нелинейно-оптические кристаллы. Свойства и применения в квантовой электронике. Справочник. Радио и связь, Москва, 160 стр, 1991.

22. V.G.Dmitriev, G.G.Gurzadyan, D.N.Nikogosyan. Handbook of Nonlinear Optical Crystals (Springer Series in Optical Sciences, vol.64), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 222 p., 1991, ISBN 3-540-53547-0

23. G.G.Gurzadyan, R.K.Ispiryan. Two-photon absorption peculiarities in potassium dihydrogen phosphate crystal at 216 nm. Appl. Phys. Lett., v.59, p.630-631, 1991.

24. Г.Г.Гурзаян, А.С.Оганесян, А.В.Петросян, Р.О.Шархатунян. Выращивание и исследование нелинейных свойств монокристаллов б-бората бария. Журн. Техн.Физ. том 61, с.152-154, 1991.

25. G.G.Gurzadyan, R.K.Ispiryan, K.Sh.Voskanyan. Two-quantum photoprocesses in DNA at picosecond laser UV 216 and 270 nm irradiation. J. Photochem. Photobiol. B: Biology, v.11, p.269-275, 1991.

26. G.G.Gurzadyan, R.K.Ispiryan. Efficiency of laser photolysis of nucleic acids at 216 nm. Proceed. of Internat. Conference on Laser in the Life Sciences, Guangzhou, China, p. 27-40, 1991.

27. G.G.Gurzadyan. Photochemistry of DNA and its components at laser 216 nm irradiation. Abstracts of 4th Congress of the European Society for photobiology, 1-6.9.91, Amsterdam, p. 88, 1991.

28. G.G.Gurzadyan, R.K.Ispiryan. Two-photon absorption in KDP, KB5 and quartz crystals at 270 and 216 nm. Int. J. Nonlinear Optical Physics, v.1, p. 533-540, 1992.

29. G.G.Gurzadyan and H.Görner. Base release from DNA and polynucleotides upon 193 nm laser excitation. Photochem. Photobiol., v.56, p.371-378, 1992.

30. H. Görner and G.G.Gurzadyan. Photolysis of polycytidylic acid on 193 nm laser excitation. J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry, v. 71, p.155-160, 1993.

31. G.G.Gurzadyan and H.Görner. Photolesions in DNA upon 193 nm excitation. Photochem. Photobiol. v. 58, p. 71 - 80, 1993.

32. G.G.Gurzadyan, H.Görner and D.Schulte-Frohlinde. Photolesions and biological inactivation of plasmid DNA on 254 nm irradiation and comparison with 193 nm laser irradiation. Photochem. Photobiol. v.58, p. 311-319, 1993.

33. G.G. Gurzadyan and D.Schulte-Frohlinde. Biological inactivation of plasmid DNA on 254 and 193 nm Irradiation, Abstracts of the Vth Congress of the European Society for Photobiology, 19-26. 9. 1993, Marburg.

34. G.G. Gurzadyan and D. Schulte-Frohlinde. Are enzymatically produced single-strand breaks involved in UV-induced inactivation of plasmid DNA? J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 1993, v.22, p.131-138, 1994.

35. G.G.Gurzadyan, H.Görner. Damage to uracil- and adenine-containing bases, nucleosides, nucleotides and polynucleotides: quantum yields on irradiation at 193 and 254 nm. Photochem. Photobiol. v.60, p.323-332, 1994.

36. H. Görner and G.G.Gurzadyan. Photochemie der DNA: Produktverteilung und Quantenausbeuten. J.Inform. Record. Mater. v.21, p.439-440, 1994.

37. G.G.Gurzadyan, H.Görner and D.Schulte-Frohlinde. Ultraviolet (193, 216 and 254 nm) photoinactivation of E.coli strains with different repair deficiencies. Radiat. Research, v. 141, p.244-251,1995.

38. H.Görner and G.G. Gurzadyan. Product Quantum Yields of Uracil- and Adenine-Containing Bases, Nucleosides, Nucleotides and Polynucleotides. Abstracts of the XVth IUPAC Symposium on Photochemistry. July 17-22, 1994, Prague.

39. H.Görner, G.G.Gurzadyan. Photolesions in DNA produced by irradiation at 193 and 254 nm. Abstracts of th Vth Congress of the European Society for Photobiology, 3-8. 9. 1995, Cambridge. p. 26, 1995.

40. G.G. Gurzadyan, H.Görner and D. Schulte-Frohlinde. Influence of Different Repair Deficiencies on the Photoinactivation (193, 216 and 254 nm) of *E. coli* Strains. Abstracts of the International Conference of Radiation Chemistry, Sept. 1995, Würzburg.

41. G.G.Gurzadyan, H.Görner. Depopulation of highly excited singlet states of DNA model compounds: quantum yields of 193 and 254 nm photoproducts of pyrimidine monomers and dinucleoside monophosphates. Photochem. Photobiol. v. 63, p. 143-153, 1996.

42. G.G.Gurzadyan, H.Görner. Laser photoionization of DNA and its constituents. Abstracts of the second symposium "Multiphoton photochemistry in biological systems", Bad Honnef, Germany, 1996.

43. T.Gustavsson, L.Cassara, G.Gurzadyan, S.Pommeret, J.-C.Mialocq. Femtosecond spectroscopic study of the non-radiative relaxation processes in 7-aminocoumarins. In: Ultrafast Phenomena X, 1996

44. Г.Г.Гурзядян, Д.Шульте-Фролинде. Биологическая важность разрывов цепей ДНК при облучении с длиной волны 193 нм. Биофизика, т. 41, N3, 1996.

Выражаю благодарность всем моим коллегам и друзьям, с кем довелось работать и находить дружескую поддержку в Институте спектроскопии АН СССР (Троицк), Молекулярной биологии АН СССР (Москва), Институте физических исследований АН Армении (Аштарак), НПО Лазерная техника (Ереван), Max-Planck-Institut für Strahlenchemie (Germany), AG Photobiophysics, Humboldt University of Berlin (Germany), Service de chimie moleculaire, CEA Saclay (France).

Gagik G. Gurzadyan

## LASER PHOTOIONIZATION OF DNA

### Summary

New formulas for calculation of phase-matching angles in uni and biaxial crystals are presented. Two-photon absorption peculiarities of KDP crystal at 216 nm are studied. A new method of nonlinear dynamic spectroscopy for measurements of the picosecond pulse chirp is offered. Nonlinear thermal defocusing of laser radiation in water due to two-photon absorption is detected.

Action of laser radiation of nanosecond and picosecond duration with wavelengths of 193, 216, 248, 266 and 270 nm, as well as of low-power UV light from conventional Hg-lamp on DNA, nucleic acids constituents, plasmids and bacteria *E.coli* with different repair deficiencies was studied. Formation of single- and double-strand breaks, covalent interstrand crosslinks, locally denatured sites, base release, destruction of nucleotides with high quantum yield was observed. It was shown that above mentioned photoproducts/photolesions are the consequence of ionization.

Biological inactivation of plasmid (transformation of *E.coli* bacteria strains AB1157 wild type, AB1886 *uvrA*, AB2463 *recA*, AB2480 *uvrA recA*) was studied upon irradiation at 193 and 254 nm; the monoexponential survival curves in all cases show that a single damage site leads to inactivation (one single hit). The biological consequences of different photoproducts are outlined. Inactivation of *E.coli* upon irradiation at 193 and 216 nm was demonstrated to be due to damage of intracellular DNA rather than to membrane or protein damage.

Depopulation of highly excited electronic states of DNA model compounds was studied. Quantum yields of photodimers, (6-4)photoproducts and photohydrates in pyrimidine monomers and dinucleoside monophosphates after excitation of the first and second excited states (254 and 193 nm, respectively) were measured. The efficiency of the internal conversion  $S_2 \rightarrow S_1$  was found to be in the range of 0.5 - 1 for UpU, CpC, CpU and dCpT.

Գազիկ Գրիգորի Գուրգառյան

ՂՆԹ-ի ԼԱԶԵՐԱՅԻՆ ՖՈՏՈՒՈՆԻԶԱՑԻԱ

Ամփոփում

Սխտեմատիկորեն հետազոտված է նուկլեոնային թթուների ֆոտոֆիզիկան և ֆոտոքիմիան լազերային նանովայրկյանային 193 նմ ալիքով ճառագայթման ազդեցության տակ: Լազերային 193 նմ ճառագայթը իոնիզացնում է նուկլեոնային թթուները միֆոտոն մեխանիզմով՝ առաջացնելով հիդրատային էլեկտրոն ու հիմքի կատիոն ռադիկալ:

Ցույց է տրված, որ առաջանում են նոր տիպի ֆոտոնյութեր: ՂՆԹ ի մեկ և երկթելային ճեղքեր, միջթելային կարվածքներ, լոկալ դենատուրացված տեղամասեր, ազատ հիմքեր: Այդ էֆեկտները իոնիզացիայի հետևանքն են: Լազերային ուլտրամանուշակագույն 216 նմ հզոր ճառագայթը էֆեկտիվորեն առաջացնում է միջթելային կարվածքներ ՂՆԹ ի մոլեկուլում: Ցույց է տրված, որ լազերային 193 նմ ճառագայթը առաջացնում է 254 նմ բնորոշ ֆոտոնյութեր. նուկլեոզիդների ու նուկլեոտիդների պիրիմիդինային դիմերներ, (6-4)ֆոտոնյութեր, հիդրատներ:

Ֆոտոքիմիական ձևով առաջին անգամ չափված է երկրորդ սինգլետ էլեկտրոնային մակարդակից առաջին մակարդակ ոչ ճառագայթային անցման էֆեկտիվությունը. նուկլեոնային թթուների տարբեր կոմպոնենտների համար այն փոփոխվում է 0.5 ու 1-ի միջև:

Պարզաբանված է պլազմիդների ու բակտերիաների ինակտիվացիայի մեխանիզմը լազերային 193 նմ ճառագայթի ազդեցությամբ: ՂՆԹ ի մեկթելային ճեղքերը հանդիսանում են պլազմիդների գլխավոր լետալ վնասվածքները: 254 նմ ճառագայթման տակ ինակտիվացիայի միջանկյալ փուլն է ՂՆԹ ի մեկթելային ճեղքերը, որոնք առաջանում են էնզիմատիկորեն պիրիմիդինային դիմերներից, իսկ 193 նմ ճառագայթման տակ ինակտիվացիայի միջանկյալ փուլն է երկթելային ճեղքերը, որոնք առաջանում են էնզիմատիկորեն մեկթելային ճեղքերից:

E.coli բակտերիաների գլխավոր թիրախը 193 նմ ճառագայթման տակ ՂՆԹ-ի մոլեկուլն է: AB2480 մուտանտ բակտերիաների համար գլխավոր լետալ վնասվածքներն են դիմերները, իսկ վայրի շտամն AB1157 ի համար՝ իոնիզացիայի ֆոտովնասվածքները, հատկապես մեկթելային ճեղքերը:

Ցույց է տրված, որ ջերմային էֆեկտները կենսամոլեկուլների պիկովայրկյանային լազերային ճառագայթման ժամանակ աննշան են. ճառագայթման մասում ջերմաստիճանի լոկալ փոփոխությունը 1 աստիճանից փոքր է:

Իրագործված է պիկովայրկյանային լազերային ճառագայթման ու պիկովայրկյանային կոնտինուումի չիրայի չափման նոր մեթոդ: Ստացված են բյուրեղների մեջ ֆազային սինխրոնիզմը հաշվելու նոր բանաձևեր: Հայտնաբերված և հետազոտված է ոչ գծային կլանող միջավայրերում լազերային ուլտրամանուշակագույն ճառագայթի ոչ գծային ցրումը:

Бумага 60x84 печ. 3.5 листа  
Заказ 102

Тираж 75

Цех "Ротапринт" Ереванского госун иверситета  
Ереван, улица Алека Манукяна 1