

СТРУКТУРНІ ЗМІНИ АЗОТИСТИХ ОСНОВ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ, ВИКЛИКАНІ НИЗЬКОЕНЕРГЕТИЧНИМИ ЕЛЕКТРОНАМИ

І.І.Шафраньош, І.А.Петрушко, В.М.Славік, М.І.Суховія

Ужгородський державний університет, 294000, Ужгород, вул.Волошина,54

Мас-спектрометричним та оптичним методами показано, що під дією електронів малих енергій (10^1 - 10^2 eВ) в молекулах азотистих основ нуклеїнових кислот в газовій фазі ефективно проходять процеси дисоціативної іонізації та дисоціативного збудження.

Вступ

Азотисті основи нуклеїнових кислот (НК) є важливими складовими молекулярних носіїв генетичної інформації, оскільки саме вони визначають основні фізичні та біологічні властивості молекул ДНК і РНК. Зрозуміло, що ініціювання різноманітних фізико-хімічних процесів на рівні нуклеотидних основ, зумовлюючи зміни фізичної структури НК, впливатиме і на біологічну повноцінність генетичних структур. Тим більше, що на даний час надзвичайно гострою стає проблема забруднення довкілля сукупністю фізичних агентів техногенного походження, в полі дії яких постійно знаходяться живі організми. Це, насамперед, стосується підвищення фонового рівня корпускулярних і електромагнітних випромінювань різних енергетичних діапазонів. Практичне використання різноманітних джерел радіації в медицині, техніці, сільському господарстві також вимагає розкриття механізмів радіаційного ураження біологічних об'єктів.

В історичному плані вивчення особливостей впливу фізичних факторів навколишнього середовища на біомолекулярні системи, які входять до складу живих організмів, започатковано на фізичному факультеті Ужгородського державного університету ще в 70-х роках. На кафедрі біофізики, яка була тоді в складі факультету, проводились дослідження дії іонізуючих

електромагнітних випромінювань на біополімерні молекули ДНК в живих клітинах [1] і в розчинах [2]. Пізніше був виконаний цикл робіт, в яких вивчались зміни первинної та просторової структур ДНК, викликані лазерними променями різних довжин хвиль. Для оцінки структурних змін біомолекул в розчинах і плівках в цих експериментах були використані оптичний [3,4] та діелектричний [5] методи. Поглиблене вивчення фізичних механізмів, які лежать в основі біологічних ефектів, стало можливим при розробці нових методичних підходів, пов'язаних із отриманням азотистих основ нуклеїнових кислот у газоподібному стані [6,7]. В таких експериментальних умовах вперше були отримані оригінальні результати про перебіг фізичних процесів збудження [8,9] та іонізації [10] біомолекул при електронному ударі.

В даному експериментальному дослідженні вивчається ще один важливий фізичний процес, який спричинюється в біомолекулах дією низькоенергетичних електронів, а саме – процес дисоціації, аналізуються його молекулярні механізми та оцінюються біологічні наслідки.

Методика експерименту

Фізичні процеси та структурні зміни, які відбуваються в азотистих основах нуклеїнових кислот при взаємодії з повільними електронами, в даній роботі досліджувались за допомогою мас-спектрометричного та оптичного методів.

Мас-спектрометричні виміри проводились за допомогою установки, зібраної на базі приладу МИ-1201. Методика та апаратура оптичних досліджень описані в роботі [7]. В мас-спектрометрії використовувалось модернізоване джерело іонів типу Ніра без фокусування електронного пучка поздовжнім магнітним полем. До складу джерела іонів входять іонізаційна камера з електронним пучком, іонна оптика та комірка з підігрівом. Утворені внаслідок електронного удару молекулярні іони витягувались із камери зіткнень, фокусувались і аналізувались за відношенням маси до заряду (m/z) та реєструвались електронним помножувачем типу ВЕП-1. Енергія налітаючих електронів змінювалась в межах 3-150 еВ, струм електронного пучка становив 0,3 мА. Для калібрування мас-спектрометра використовувались аргон, азот і ртуть.

Експерименти проводились з молекулами нуклеотидних основ у газоподібному стані. Досліджувані препарати поміщались у комірку і нагрівались вольфрамовою спіраллю. Для збільшення коефіцієнта використання проби комірка розміщувалась у безпосередній близькості від іонізаційної камери. Шляхом зміни температури і, відповідно, тиску в камері, а також регулюванням енергії налітаючих електронів, були підібрані оптимальні умови для мас-спектрометричних досліджень даних об'єктів. В дослідках використовувались комерційні препарати нуклеотидних основ фірм "Calbiochem" та "Reanal".

Результати експериментів та їх обговорення

Мас-спектрометричні та оптичні дослідження показали, що взаємодія низькоенергетичних електронів з біомолекулами має складний характер - протікають різноманітні фізичні процеси та фізико-хімічні перетворення. При даних умовах експериментів, крім прямих процесів збудження та іонізації,

відбуваються також процеси дисоціації молекул.

Аналіз отриманих мас-спектрів свідчить про те, що під дією електронного удару утворюються іони цілих молекул нуклеотидних основ, а також - іони молекулярних осколків. Відносний вихід продуктів дисоціації відчутно залежить від умов експериментів, в першу чергу, від енергії налітаючих електронів та концентрації молекул у камері. .

На рис.1, для прикладу, приведений мас-спектр піримідинової нуклеотидної основи - цитозину, отриманий при енергії електронів 70 еВ.

Видно, що мас-спектр має складну структуру. Найбільш інтенсивна лінія в спектрі відповідає молекулярному іону цитозину (відношення маси до заряду: $m/z = 111$). В результаті електронного удару утворюються також іони фрагментів молекули. Так, наявні іони піримідинового кільця і продукти його дисоціації. Відносна кількість фрагментів, для яких відношення маси до заряду рівне 28, 42, 69, 83, найбільша. З дещо меншою імовірністю утворюється іон молекули цитозину без однієї бокової групи: $-NH_2$ або $=O$ ($m/z = 95$). Експерименти показали, що вихід дисоціативних процесів збільшується з ростом енергії електронів. Були досліджені енергетична та температурна залежності інтенсивності лінії для $m/z = 111$. Встановлено, що при пониженні енергії іонізації відносна інтенсивність даної лінії збільшувалась. При певних умовах досліду (температура 393К, тиск у камері $8,7 \cdot 10^{-3}$ Па), починаючи з енергії електронів 70 еВ, спостерігався двократний іон молекули цитозину. На відміну від мас-спектрів основ, досліджуваних методом польової мас-спектрометрії [11], в даних умовах асоціати молекул не виявлені. Появу лінії з $m/z = 112$ і деяких інших (наприклад, 32, 43, 70 тощо) можна пов'язати із проявом різного ізотопного складу вуглецевих атомів, вклад якого, згідно проведеної оцінки, може становити до 5% .

В окремій серії експериментів були досліджені спектри випромінювання нуклеотидних основ, збуджувані електронним ударом. Зокрема, встановлено, що спектр цитозину має складну структуру і при енергії електронів 70 еВ містить ряд молекулярних смуг з максимумами при 290,6; 316,8; 328,3; 340,5; 356,7; 381,2; 429,3 нм. Кількість смуг та їх інтенсивності залежать від енергії налітаючих електронів. Для ідентифікації оптичних спектрів були використані такі підходи. По-перше, експериментально досліджені функції збудження і виміряні енергетичні пороги відповідних фізичних процесів. По-друге, проаналізовані і враховані дані літератури [12-14] про ідентифікацію електронних спектрів молекул та про енергії зв'язків у молекулах.

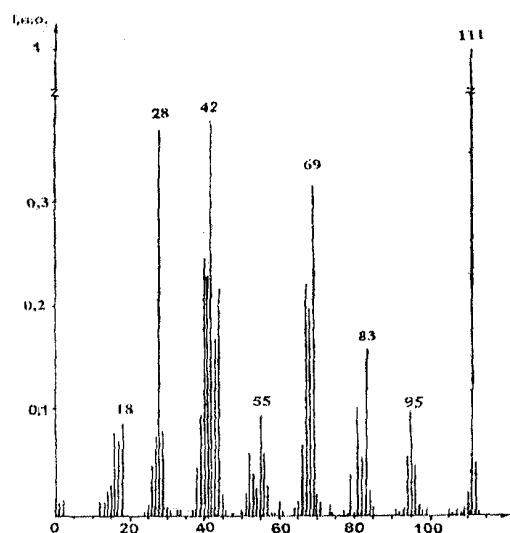


Рис. 1. Мас-спектр молекули цитозину.

Таким чином, поєднання методу мас-спектрометрії з оптичними дослідженнями дало змогу дослідити фізичні процеси іонізації, збудження та дисоціації нуклеотидних основ, зареєструвати фрагменти молекул основ, утворені дією повільних електронів, ідентифікувати фрагменти та виміряти їх відносну кількість. Структурні формули найбільш імовірних молекулярних осколків приведені на рис.2.

Що стосується механізмів іонізації та збудження цілих молекул нуклеотидних основ, а також піримідинових та пуринових кілець, то можна вважати, що вони реалізуються, в першу чергу, з участю π -електронів. Оскільки осколочні іони виникають не лише в основному, але і в збудженому станах, то імовірна поява надзбуджених станів молекул. Не виключено, що при цьому проходять і складніші електронні процеси. Як показано авторами роботи [15], в таких гетероциклічних сполуках можуть мати місце ефекти електронного спряження. Суть їх зводиться до $p\pi$ -спряження вільної електронної пари амінного атома азоту з π -електронною системою кільця. Ці процеси посилюються при переході молекули у збуджений стан. Наслідком даних електронних чинників є те, що нуклеотидні основи, до складу яких входить аміногрупа (цитозин, аденін, гуанін), є стереохімічно нежорсткими молекулами із складною топологією гіперповерхні потенціальної енергії. Квантово - хімічними розрахунками [15,16] показано, що при переході із основного електронного стану у перший збуджений площини основ стають плоскими, тобто всі атоми кожної молекули знаходяться в одній площині, яка співпадає із площиною симетрії. Можливо, цим пояснюється той експериментальний факт, що при електронному ударі з близькими імовірностями утворюються різноманітні фрагменти основ, в тому числі і внаслідок розриву зв'язків у взаємно перпендикулярних напрямках.

В даних експериментах реєструвалися лише позитивні іони. Однак слід мати на увазі, що взаємодія повільних електронів з молекулами може приводити до утворення і негативних іонів. Дослідження таких явищ становить окремий інтерес, оскільки питання про роль від'ємних іонів у біоструктурах залишається відкритим.

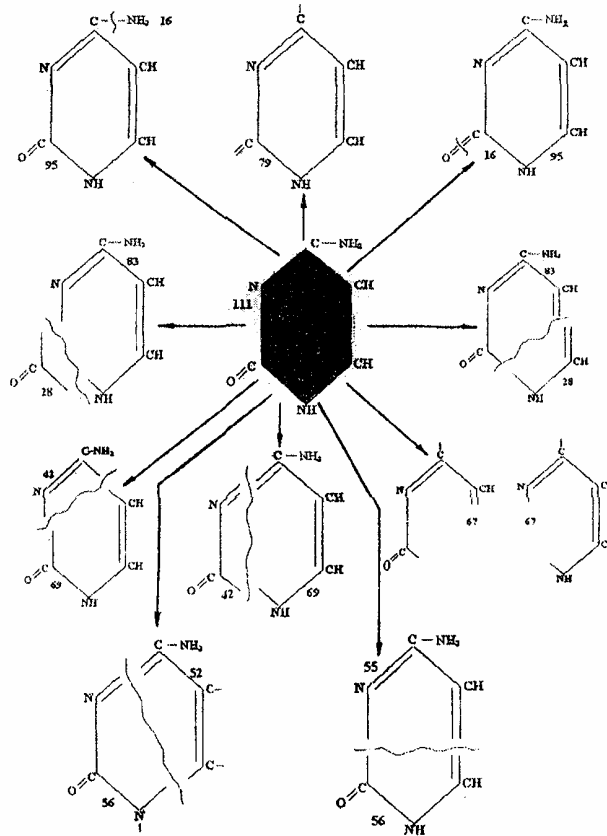


Рис.2. Структурні формули молекулярних фрагментів піримідинових нуклеотидних основ.

Важливо, що всі ці фізичні процеси матимуть місце і в клітинах живих організмів під впливом β - опромінення інкорпорованих радіонуклідів або вторинних електронів довільного походження. Відомо, що деякі довгоживучі радіонукліди, які знаходяться у воді, ґрунті, повітрі і можуть потрапити до клітин організму, є β - випромінювачами з широким енергетичним спектром [17]. Причому в

умовах внутріклітинного середовища особливо небезпечними стають повільні електрони, які, крім цього, складають і значну частину вторинних електронів, виникаючих при взаємодії інших видів іонізуючої радіації з речовиною.. Структурні зміни азотистих основ, в свою чергу, можуть спричинити серйозні біологічні наслідки, насамперед деградацію ДНК та генні мутації.

1. М.И.Суховия, Радиобиология, 14, 3, 441 (1974).
2. М.И.Суховия, А.В.Ковальчук, Э.Н.Трифонов, Доклады АН СССР, 225, 5, (1975).
3. М.И.Суховия, В.С. Шевера, Биофизика, 25, 5, 913 (1980).
4. М.И.Суховия, И.И. Шафраньош, Материалы. I Всесоюзного Биофизического съезда, т.4 (Москва, 1982), 76.
5. С.А.Чичак, М.И.Суховия, А.А.Кикинши, Биополимеры и клетка, 15, 2, 149 (1999).
6. М.И.Суховия, И.И.Шафраньош, И.П.Запесочный, Тез. докл. IX ВКЭАС, ч.2 (Рига, 1984), 63.
7. М.И.Суховия, В.Н.Славик, И.И.Шафраньош, Л.Л.Шимон, Биополимеры и клетка, 7, 6, 77 (1991).
8. M.I.Sukhoviya, E.I.Voshchepinets, I.I.Shafranyosh, L.L.Shimon, Proc. XVIII Int.Conf. Phys.El.Atom.Coll. (Aarhus, Denmark, 1993), 320.
9. M.I.Sukhoviya, M.I.Shafranyosh, In:Spectroscopy of Biological Molecules. New Directions (Kluw.Acad.Publ., London, 1999), 281.
10. М.И.Суховия, Е.И.Вощепинец, И.И.Шафраньош, Л.Л.Шимон, Биополимеры и клетка, 12, 3, 97 (1996).

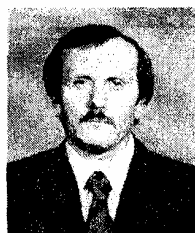
11. И. Л.Ф.Суходуб, Биофизика, 32, 6, 994 (1987).
12. R.W. Pearse, A.G.Gaydon, The identification of molecular spectra (London,Chapman, 1963).
13. Г.Герцберг, Электронные спектры и строение многоатомных молекул (Москва, Мир, 1969), 772 с.
14. Л.В.Гурвич, Г.В.Карачевцев и др., Энергии разрыва химических связей. Потенциалы ионизации и сродство к электрону (Москва, Наука, 1974), 351с.
15. Д.М.Говорун, Я.Р.Мищук, І.В.Кондратюк, Биополимеры и клетка, 12, 5, 5 (1996).
16. Д.М.Говорун, Я.Р.Мищук, І.В.Кондратюк, Биополимеры и клетка, 12, 5, 13 (1996).
17. Г.Г. Поликарпов, Радиобиология, 33, 1, 136 (1993).

STRUCTURAL CHANGES OF NUCLEIC ACID BASES UNDER INFLUENCE OF LOW ENERGETIC ELECTONS

I.I.Shafranyosh, I.A.Petrushko, V.M.Slavik, M.I.Sukhoviya

Uzhgorod State University, 88000, Uzhgorod, Voloshin Str. 54

Mass-spectrometric and optical methods showed the presence of dissociative ionization and dissociative excitation processes in nucleic acid bases molecules in gas phase under the influence of the low energy electrons ($10^1 - 10^2$ eV).



Іван Іванович Шафраньош - доктор фізико-математичних наук, професор кафедри квантової електроніки УжДУ, завідувач відділом електронних процесів ПНДЛ фізичної електроніки. Закінчив фізичний факультет УжДУ кандидатську дисертацію захистив у 1977 році, докторську дисертацію - в 1993 доктор фізико-математичних наук, професор



Ірина Антоніновна Петрушко - аспірантка кафедри твердотільної електроніки Закінчила фізичний факультет УжДУ в 1999 році.



Володимир Миколайович Славік - доцент кафедри приладобудування інженерно-технічного факультету УжДУ Закінчив фізичний факультет УжДУ. Кандидатську дисертацію захистив у 1979р.



Марія Іллівна Суховія - доцент кафедри твердотільної електроніки Закінчила фізичний факультет УжДУ. Кандидатську дисертацію захистила в 1975 році.