

УДК 577.3

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И МЕДИ С ПИРИМИДИНОВЫМИ ОСНОВАНИЯМИ В ЗАМОРОЖЕННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

**М.В. Косевич, О.А. Боряк, В.С. Шелковский, В.В. Орлов, В.В. Чаговец* ,
В.А. Карачевцев, Ю.П. Благой**

*Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины,
пр. Ленина 47, Харьков, 61103, Украина, e-mail: mvkosevich@ilt.kharkov.ua;*

**Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы 4, Харьков, 61077*

Поступила в редакцию 13 ноября 2002 г.

Изучено взаимодействие пириимидиновых оснований нуклеиновых кислот $m_1^3\text{Ura}$, $m_1^1\text{Thy}$. Сут с ионами меди и кальция в замороженных водных растворах с использованием НТ ББА МС. Мониторинг относительных концентраций соли и основания показал, что наблюдаемые в масс-спектрах ассоциаты обусловлены мелкодисперсной структурой эвтектики замороженных образцов. Степень взаимодействия и вид комплексов зависят от выбора иона металла. В отличие от жидких растворов с низкой концентрацией соли, в твердом состоянии ион кальция связывается с пириимидиновыми основаниями с большим выходом ассоциатов и образует комплексы с замещением протона основания, тогда как для меди зарегистрированы лишь малоинтенсивные невалентные ассоциаты. Для хлорида кальция также характерно взаимодействие в форме CaCl^+ . Склонность тимина к самоассоциации показывает, что различия в типах связывания ионов меди и кальция проявляются при взаимодействии не только с мономерами, но и димерами оснований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пириимидиновые азотистые основания нуклеиновых кислот, ионы меди и кальция, низкотемпературная вторично-эмиссионная масс-спектрометрия.

Одним из актуальных вопросов молекулярной криобиофизики является установление молекулярных механизмов криповреждений в биологических объектах [1]. К настоящему времени выяснены основные проявления криповреждений на уровне организмов, тканей и клеток, однако сопровождающие их процессы на молекулярном уровне изучены еще недостаточно, что связано, не в последнюю очередь, с отсутствием адекватных методов исследования. Одним из перспективных подходов является использование разработанного несколько лет назад низкотемпературного (НТ) масс-спектрометрического метода с бомбардировкой быстрыми атомами (ББА) [2, 3], который позволяет получать информацию о некоторых параметрах межмолекулярных взаимодействий в замороженных водных растворах биомолекул [4-6].

Одну из нескольких гипотез о возможных молекулярных механизмах криповреждений в общем виде можно сформулировать следующим образом. При охлаждении водных растворов постепенное вымораживание воды в кристаллы льда приводит к повышению концентрации растворенных веществ в жидкой фазе, вследствие чего изменяется характер связывания ионов металлов с биомолекулами. Это изменение может носить как качественный, так и количественный характер. Наиболее очевидным количественным изменением может быть увеличение числа контактов биомолекул с ионами металлов при повышении концентрации раствора, сохраняющихся при переходе системы в твердое состояние. Качественные же изменения могут состоять в появлении необычных комплексов, не характерных для растворов биомолекул при физиологических температурах.

При всем многообразии органических и неорганических соединений, входящих в состав живых организмов, механизмы молекулярного узнавания и селективного взаимодействия биологически активных веществ с их молекулярными рецепторами весьма эффективны. В связи с этим подход вычленения из сложных систем их простейших составных звеньев, таких как пары взаимодействующих молекул определенных типов, является вполне обоснованным. В рамках этого подхода в качестве относительно простых по составу систем для модельных низкотемпературных исследований нами были выбраны водные растворы, содержащие мономеры биополимеров, в частности, азотистые основания, и ионы металлов различных групп, источником которых являлись соли.

В наших предыдущих работах [4, 5] с помощью метода НТ ББА были изучены замороженные водные растворы пириимидиновых оснований нуклеиновых кислот с добавками ионов щелочных металлов и был обнаружен эффект повышения ассоциации данного вида одновалентных ионов с основаниями. В настоящей работе эти исследования были продолжены с использованием двухвалентных металлов других групп, а именно кальция, относящегося к щелочноземельным металлам, и меди, относящейся к d-элементам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

НТ ББА эксперименты проводили с помощью магнитного секторного масс-спектрометра МИ-1201Э (ПО «Электрон»-«SELMI», Сумы, Украина), снабженного системой для низкотемпературных измерений, включающей криогенный блок вторичного источника ионов [7], систему регулируемого напуска хладагента - жидкого азота, компьютеризированную систему измерения температуры и термостабилизации образца [8]. Измерения проводили либо при выбранной фиксированной температуре, либо при контролируемом отогреве образца. В качестве бомбардирующего газа использовали аргон. Энергия первичного пучка составляла 5 кэВ.

В работе использовали пиримидиновые азотистые основания метилурацил ($m_1^1\text{Ura}$), метилтимин ($m_1^3\text{Thy}$), цитозин (Cyt) «Sigma», Германия; и соли CaCl_2 , CuCl_2 , CuSO_4 производства Донецкого завода химреактивов, Украина.

Образцы готовили следующим образом. Используя пластиковую посуду, готовили серии растворов оснований и солей в деионизированной воде с концентрациями от 10^{-5} М до 10^{-2} М (с шагом в порядок величины) и смешивали их в соотношении 1:1. Каплю водного раствора объемом 10 мкл замораживали на подложке при скорости охлаждения $100^\circ\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ в парах жидкого азота и быстро вводили через шлюзовую систему в криогенный блок источника ионов, предварительно охлажденный до азотной температуры.

В работе использовали низкие неразрушающие плотности бомбардирующего пучка, соответствующие так называемым статическим условиям вторично-ионной масс-спектрометрии (ВИМС) [9-12]. Представляет интерес провести оценки скорости расхода образца чистого льда за счет распыления его бомбардирующими частицами в используемых экспериментальных условиях. Полагая, что замороженная капля воды массой 10 мг имеет площадь поверхности $S = 2 \cdot 10^{-5} \text{ м}^2$ и вся эта площадь подвергается бомбардировке достаточно широким пучком с плотностью потока $J = 5 \cdot 10^{14} \text{ частиц}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, что коэффициент распыления льда $Y_{\text{H}_2\text{O}}$ по оценкам работы [13] составляет 10^3 , а масса молекулы воды $M_{\text{H}_2\text{O}} = 29.89 \cdot 10^{-27} \text{ кг}$ [14], массу воды, распыляемую в единицу времени $dm/dt = \dot{m}$, можно определить как

$$\dot{m} = J \cdot S \cdot M_{\text{H}_2\text{O}} \cdot Y_{\text{H}_2\text{O}} = 3 \cdot 10^{-13} \text{ кг}\cdot\text{с}^{-1} \quad (1)$$

При такой скорости потери массы распыление образца массой 10 мг займет $\sim 3 \cdot 10^7 \text{ с}$, то есть около года.

Информация о химическом составе и структуре образца получается на основании анализа кластерного состава вторично-эмиссионных спектров и его изменения с температурой. С моделью для интерпретации НТ ББА масс-спектров можно ознакомиться в работах [2-4, 6, 15-17], здесь же отметим несколько ее принципиальных положений. Состав распыляемых в газовую фазу под воздействием ББА кластерных ионов отражает межмолекулярные взаимодействия в конденсированном образце: ассоциаты, содержащие молекулы (и/или ионы) разных видов регистрируются в спектрах только в том случае, если эти молекулы взаимодействуют и в конденсированном образце. Размер зоны, из которой выбиваются ионы под воздействием одной бомбардирующей частицы, на несколько порядков меньше размеров структурных элементов (кристаллитов, межкристаллитных каналов) замороженных образцов, в связи с чем при полном фазовом разделении в образце ионы распыляются из зон разного химического состава независимо и результирующий спектр представляет собой суперпозицию спектров индивидуальных компонентов системы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура образцов замороженных растворов азотистых оснований и солей

Согласно данным криомикроскопических исследований [1, 18, 19], замороженные с небольшими скоростями охлаждения разбавленные водные растворы имеют поликристаллическую структуру, растворенные вещества вытеснены в составе эвтектики в эвтектические каналы между кристаллитами льда. Эвтектика может представлять собой структуру из смеси мелкодисперсных кристаллов воды и растворенных веществ. При крайне низких концентрациях $C < 10^{-5}$ М, количества растворенного вещества может не хватать для образования индивидуальной фазы, в связи с чем его молекулы или ионы фактически находятся в адсорбированном состоянии на поверхности кристаллитов льда, либо образуют тонкие слои [16, 20].

Разбавленные растворы являются оптимальными объектами как с точки зрения моделирования систем со сравнительно небольшим содержанием растворенных веществ определенного вида, так и с методической точки зрения, поскольку при высоких концентрациях растворенного вещества последнее выделяется в отдельную фазу с образованием относительно крупных кристаллов, из которых распыление неразрушенных молекулярных ионов органических соединений, как известно, крайне малоэффективно [10, 21].

В условиях дефицита литературных данных для теоретических оценок фазовых равновесий в исследуемых системах, выбор необходимых концентраций и соотношения компонентов - оснований и солей - проводился эмпирически методом перебора. При низких концентрациях солей, порядка 10^{-5} М, выделения фазы кристаллогидрата, как и следовало ожидать, не происходило, о чем свидетельствовало отсутствие в спектре характерных гидратных кластеров. Фаза кристаллогидрата в составе эвтектики появлялась при концентрации солей более 10^{-4} М. При концентрации оснований более 10^{-2} М в эвтектических каналах выделялась фаза оснований в виде сетки кристалликов, о чем свидетельствовали описанные далее микроскопические исследования.

Сделанные на основе литературных данных предположения о структуре образцов, которую можно получить при соблюдении определенных условий, были подтверждены микроскопическим исследованием образцов, подвергнутых масс-спектрометрическому анализу. Весьма показательным явился пример структуры образца 10^{-2} М раствора $m^1\text{Thy}$, замороженного и обезвоженного путем сублимационной сушки в вакууме. Полученный таким способом образец представлял собой своего рода слепок эвтектических каналов, заполненных нелетучим растворенным веществом. Кристаллы метилтимина имеют форму игл [22], обладающих достаточной прочностью для сохранения мелкоячеистого каркаса после сублимации льда из образца. Аналогичные каркасы для образцов с меньшей концентрацией разрушались в течение нескольких десятков секунд после извлечения из вакуумной камеры. Таким образом, данные визуальных наблюдений подтверждают, что в выбранных нами условиях замораживания образцы представляют собой поликристаллический лед с эвтектическими каналами.

На основании всех проведенных оценок была выбрана оптимальная концентрация растворов порядка 10^{-3} - 10^{-2} М. Растворы азотистых оснований и солей готовились отдельно, их смешение в соотношении 1:1 давало растворы с общим содержанием растворенных веществ того же порядка.

Очевидно, что структура замороженного образца в объеме может несколько отличаться от структуры поверхности замороженной капли, в связи с чем, для чистоты эксперимента необходимо решить задачу удаления поверхностного слоя образца для экспозиции бомбардирующему пучку более глубинных слоев. Приготовление образца по методу замораживания-скалывания по ряду причин является малоэффективным в используемых экспериментальных условиях. Стравливание поверхности самим бомбардирующим пучком в статических условиях атомной бомбардировки с плотностью первичного пучка J порядка $5 \cdot 10^{14}$ частиц \cdot м $^{-2}$ \cdot с $^{-1}$, как показала приведенная выше оценка (1), крайне незначительно, а обработка образца более интенсивным пучком может внести элемент неопределенности вследствие возможного радиационного повреждения поверхности.

Однако, эмпирический поиск и некоторые теоретические оценки позволили выработать оптимальную процедуру, основанную на «стравливании» поверхности за счет сублимации льда. Массовый поток молекул с единицы поверхности \dot{m}_s при сублимации зависит от температуры образца, определяющей давление насыщенных паров над поверхностью льда, и в рамках молекулярно-кинетической теории [23-25] может быть оценен по формуле:

$$\dot{m}_s = \alpha \frac{p_s^o(T_s)}{\sqrt{2\pi RT_s}} \quad (2)$$

где α - коэффициент испарения-конденсации, T_s - температура поверхности, $p_s^o(T_s)$ - давление насыщенного пара при температуре поверхности T_s , R - универсальная газовая постоянная (обратным потоком молекул при достаточно низких давлениях $p < 10$ Па можно пренебречь [25]). При практических расчетах массопереноса в вакууме удобнее пользоваться следующей формулой, включающей в явном виде параметры конкретного образца [10]:

$$\dot{m} = c p_s^o \sqrt{\frac{M}{T_s}} S \quad (3)$$

где M - относительная молекулярная масса, S - площадь поверхности, с которой происходит сублимация, c - коэффициент, равный 4,375, если площадь S выражена в м 2 , масса в граммах, время в секундах, а давление p_s^o - в паскалях.

Соответствующие оценки для образца льда массой 10 мг и площадью поверхности 10^{-5} м 2 , приведенные в табл. 1, позволяют сделать выбор оптимальных условий эксперимента: при $T < -90^\circ\text{C}$ скорость сублимации чрезвычайно мала, а при $T \approx -50^\circ\text{C}$ образец исчерпывается за считанные минуты. В диапазоне $-80^\circ\text{C} \div -65^\circ\text{C}$ скорость сублимации достаточна для постепенного стравливания образца, оставляя приблизительно несколько десятков минут для измерений.

Таблица 1. Давление насыщенных паров воды p_s над поверхностью льда [14], скорость сублимации $\dot{m} = dm/dt$ льда и время t_s , необходимое для сублимации образца льда массой 10 мг при различных температурах

$t, ^\circ\text{C}$ (Т, К)	p_s , Па	\dot{m} , $\text{г}\cdot\text{с}^{-1}$	t_s , с
-100 (173)	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$1,84 \cdot 10^{-8}$	$5,43 \cdot 10^5$
-90 (183)	$9,3 \cdot 10^{-3}$	$1,28 \cdot 10^{-7}$	$7,81 \cdot 10^4$
-80 (193)	$5,3 \cdot 10^{-2}$	$7,13 \cdot 10^{-7}$	$1,40 \cdot 10^4$
-70 (203)	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$3,30 \cdot 10^{-6}$	$3,03 \cdot 10^3$
-60 (213)	1,08	$1,37 \cdot 10^{-5}$	$7,30 \cdot 10^2$
-50 (223)	3,95	$4,97 \cdot 10^{-5}$	$2,01 \cdot 10^2$
-40 (233)	$1,29 \cdot 10^1$	$1,57 \cdot 10^{-4}$	$6,37 \cdot 10^1$
-30 (243)	$3,81 \cdot 10^1$	$4,6 \cdot 10^{-4}$	$2,17 \cdot 10^1$
-20 (253)	$1,04 \cdot 10^2$	$1,21 \cdot 10^{-3}$	8,26
-10 (263)	$2,60 \cdot 10^2$	$3,05 \cdot 10^{-3}$	3,27
0 (273)	$6,11 \cdot 10^2$	$6,89 \cdot 10^{-3}$	1,45

Проведение вторично-эмиссионных экспериментов при условии активной спонтанной сублимации образца имеет еще одно методическое преимущество, заключающееся в повышенной эффективности распыления. Известно, что общий выход распыленных частиц выше для твердых веществ с более низкой энергией связи или образцов с большим количеством дефектов. Так, повышение эффективности распыления под воздействием ББА наблюдалось ранее для кристаллогидратов, находящихся в стадии дегидратации [16, 17]. Нарушение регулярности структуры поверхности сублимирующего льда [26] сказывается в повышении эффективности вторично-эмиссионного процесса на несколько десятков процентов.

По завершении сублимации льда (включая мелкодисперсный лед в составе эвтектики) при температуре выше -50°C в образце остается только растворенное вещество в форме, зависящей от его исходного количества. При крайне малых исходных концентрациях вещество оседает на подложке в виде тонкой пленки. При больших количествах, как отмечалось выше, возможно сохранение эвтектического каркаса из кристаллов растворенного вещества, и в таком случае масс-спектр будет соответствовать обычному ВИМС спектру данного вещества со всеми известными недостатками, присущими твердотельной органической ВИМС. Если растворенное вещество образует кристаллогидрат, то при дальнейшем повышении температуры будет происходить постепенная его дегидратация, отражающаяся в уменьшении и исчезновении гидратных кластеров.

НТ ББА масс-спектры индивидуальных компонентов исследуемых систем

Водный лед. НТ ББА и ВИМС масс-спектры водного льда хорошо известны по данным многих предшествующих исследований [2-6, 17, 27, 28]. В спектрах присутствует серия протонированных кластеров воды $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{H}^+$, интенсивность которых монотонно убывает с ростом n , за исключением повышенной интенсивности кластера с $n = 4$ и иона H_3O^+ , m/z 19. Температурные зависимости показывают практическое отсутствие изменений в спектрах кристаллического льда в диапазоне температур от азотной до температуры исчерпания образца вследствие сублимации. Последняя, по данным экспериментальных наблюдений, хорошо согласующимся с расчетными оценками (см. табл. 1), составляет $-55 \pm 5^\circ\text{C}$ [6, 17, 27, 28]. За пару десятков градусов до этой температуры увеличение содержания паров воды у поверхности образца за счет активной сублимации повышает вероятность ББА ионизации газовой фазы, и в спектрах появляется молекулярный ион-радикал воды H_2O^+ , m/z 18, а также серия малоинтенсивных кластеров $(\text{H}_2\text{O})_n^+$, природа которых пока еще до конца не выяснена [17].

Как уже отмечалось, при фазовом разделении в замороженном образце распыление под воздействием ББА кристаллитов льда происходит независимо от распыления других составляющих образца [2, 6, 17].

Замороженные водные растворы солей. НТ ББА масс-спектры замороженных водных растворов солей CaCl_2 и CuCl_2 были исследованы ранее [29], спектры системы $(\text{H}_2\text{O} - \text{CuSO}_4)$ получены в настоя-

шей работе впервые. Практически для всех водорастворимых солей двухвалентных металлов при охлаждении характерно выделение фазы кристаллогидрата. О наличии этой фазы свидетельствует присутствие в спектре кластеров катиона соли с молекулами воды [6, 16], которые регистрируются независимо от наличия или отсутствия в образце фазы чистого водного льда. При фазовом разделении водного раствора CuSO_4 выделяется фаза кристаллогидрата $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, и в НТ ББА масс-спектре присутствуют ионы $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{Cu}^+$ ($n = 1, 2$), рис. 1. Этот же тип гидратных кластеров зарегистрирован в спектрах систем $(\text{H}_2\text{O} - \text{CuCl}_2)$ и $(\text{H}_2\text{O} - \text{CaCl}_2)$ [29]. Для хлоридов характерен также кластер иона металла (Me) с одним противоионом MeCl^+ . При повышении температуры происходит дегидратация кристаллогидрата, находящая отражение в постепенном уменьшении интенсивности гидратных кластеров в спектрах, завершающемся их полным исчезновением при формировании безводной соли.

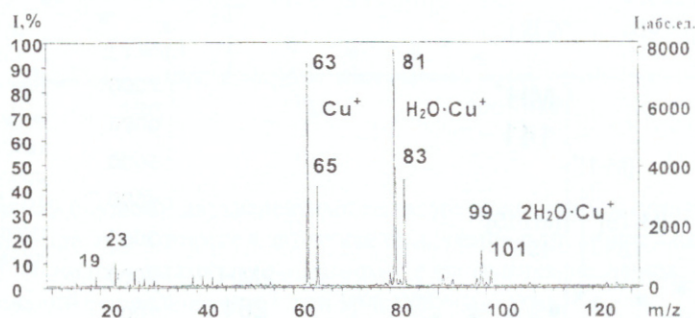


Рис. 1. НТ ББА масс-спектр замороженного водного раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. $T = -150^\circ\text{C}$.

Включение меди или хлора в тот или иной кластер подтверждается наличием двух изотопных пиков ($^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu}$, $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) в соответствующем соотношении.

Отметим, что ионы двухвалентных металлов во вторично-эмиссионных масс-спектрах регистрируются обычно в однозарядной форме Me^+ вследствие процессов нейтрализации заряда, описанных в работах [30, 31]. Двухзарядное состояние иона металла сохраняется в его ассоциатах с однозарядным анионом MeCl^+ и в ионах вида MeOH^+ .

Замороженные водные растворы азотистых оснований. Как было показано ранее [3-5], масс-спектры замороженных разбавленных растворов азотистых оснований представляют собой суперпозицию спектров структурных элементов гетерогенного образца: спектра кластеров воды $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{H}^+$, распыляемых из кристаллитов льда, и набора ионов, распыляемых из фазы основания (M) в составе эвтектики, наиболее интенсивным из которых является протонированный молекулярный ион MH^+ . На рис. 2 а, б показаны НТ ББА масс-спектры растворов, содержащих $m^1\text{Tbu}$ в концентрациях, различающихся на порядок - 10^{-3} М и 10^{-2} М. Соотношение вкладов кластерных серий двух веществ - воды и основания - в целом отражает соотношение двух компонентов образца. При более низкой концентрации основания (10^{-3} М, рис. 2. а) больше вклад кластерного спектра воды, при более высокой (10^{-2} М, рис. 2. б) - доминирует спектр основания. Распыление оснований из сухих пленок, образующихся как при высыхании капли водного раствора, так и после сублимации льда из замороженного образца, подчинялось закономерностям твердотельной ВИМС: эффективность распыления была невысока, интенсивность пика иона MH^+ - крайне низкая, уровень так называемого «химического шума», возникающего за счет хаотического разрушения твердого образца - сравнительно высок. Набор ионов, распыляемых из кристаллитов основания в составе эвтектики, включает, наряду с мономером MH^+ , m/z 141, малоинтенсивный молекулярный ион-радикал M^+ , m/z 140, фрагмент $[\text{M}-\text{H}]^+$, m/z 139, димер 2MH^+ , m/z 280, фрагментный ион $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, m/z 125, а также ряд фрагментов с четной массой, среди которых наиболее интенсивен ион с m/z 42 (рис. 2, б). О распыление ионов именно из кристаллов оснований свидетельствует достаточно высокий уровень химического шума, наличие димера, а также интересного иона с m/z 155, который можно отнести к продукту реакции трансметилирования $[\text{M}+\text{CH}_3]^+$. В то же время абсолютная интенсивность молекулярного иона в несколько раз выше, чем при распылении макроскопических сухих пленок. Вероятно, мелкодисперсные кристаллиты оснований, образующиеся при замораживании раствора, содержат значительное количество дефектов решетки, что облегчает процесс распыления. Дефекты на поверхности кристаллитов оснований могут возникать также в процессе разрушения границ с сублимирующими зернами льда.

В НТ ББА масс-спектрах замороженного раствора метилурацила $m^3\text{Ura}$ присутствовал молекулярный ион MH^+ , m/z 127, и фрагменты на уровне «химического шума». Ионов, связанных с де- и трансметилированием, в отличие от образцов $m^1\text{Tbu}$, не наблюдалось. Канал реакций переноса метильной группы открыт для $m^1\text{Tbu}$, вероятно, в связи с лабильностью связи при метилировании по первому положению, задействованному в образовании гликозидной связи в нуклеозидах: связь метильной группы в третьем

положении $m_1^3\text{Ura}$ оказывается более устойчивой к фрагментации. Масс-спектр Cyt содержал молекулярный ион MH^+ , m/z 112, и димер 2MH^+ , m/z 223.

Как было показано ранее, образцы оснований содержат практически неустраняемую примесь следовых количеств ионов щелочных металлов, которые регистрируются в спектрах вследствие высокой чувствительности к ним метода НТ ББА [16, 32]. В то время как константа связывания ионов щелочных металлов с основаниями в растворе крайне мала, в замороженных образцах даже следовые количества Na^+ активно связываются с основаниями, что проявляется в наличии в НТ ББА масс-спектрах ассоциатов MNa^+ . Масса ассоциата метилтимина с ионом натрия совпадает с массой ассоциата воды $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$, m/z 163, однако интенсивность иона MNa^+ явно превышает ожидаемую интенсивность кластера воды (рис. 2, б). Образцы $m_1^3\text{Ura}$ содержали, судя по их спектрам, примесь не только Na^+ , но и K^+ .

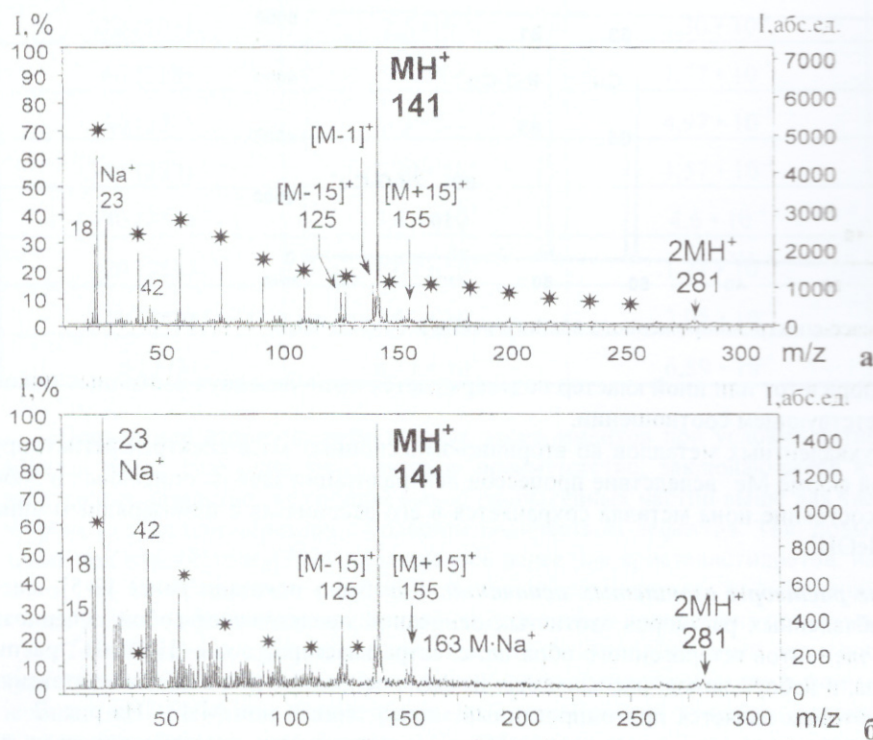


Рис. 2. НТ ББА масс-спектры замороженных водных растворов $m_1^3\text{Thy}$, содержащих основание в концентрациях 10^{-3} M (а) и 10^{-2} M (б). Температура образцов составляла -80°C (а) и -76°C (б).

Важной чертой НТ ББА масс-спектров растворов оснований является полное отсутствие гидратных кластеров оснований вида $\text{M}(\text{H}_2\text{O})_n^+$, что, в соответствии с более ранними наблюдениями [4-6], свидетельствует о полном фазовом расслоении при замораживании образца, или, другими словами, утрате контактов биомолекул с молекулами растворителя-воды.

НТ ББА масс-спектры замороженных водных растворов смесей азотистых оснований и солей

Были изучены образцы, формирующиеся при замораживании водных растворов пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот $m_1^1\text{Ura}$, $m_1^3\text{Thy}$, Cyt и солей CaCl_2 , CuCl_2 , CuSO_4 . Анализ полученных НТ ББА масс-спектров проводился с целью выявить различия в параметрах взаимодействия в зависимости от следующих характеристик систем: тип иона металла, тип катиона соли, тип основания. Анализ охватывал также сравнение связывания двух- и одновалентных металлов и поиск возможных различий взаимодействия основание-ион металла в жидких растворах и твердом замороженном образце.

В спектрах образцов с низкой концентрацией (меньше 10^{-4} M) солей двухвалентных металлов пики, соответствующие ионам металлов, были крайне малы, а ассоциаты основание-металл отсутствовали, как видно на примере спектра системы, содержащей $0,5 \cdot 10^{-3}\text{ M}$ $m_1^3\text{Ura}$ и $0,5 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ CuSO_4 (рис. 3). В то же время ионы примеси щелочных металлов Na^+ и K^+ , присутствующей в образце в следовых количествах (в концентрации менее 10^{-5} M), проявляются в спектре и образуют ассоциаты с молекулами основания: $\text{M}\cdot\text{Na}^+$, m/z 149, $\text{M}\cdot\text{K}^+$, m/z 165 (слабоинтенсивный). Высокая эффективность связывания ионов щелочных металлов в замороженных растворах была описана и объяснена ранее [4], в данном же случае интерес представляет тот факт, что ионы одновалентных металлов конкурируют с ионами двухвалентных металлов. Поскольку количества примесных ионов натрия и ионов меди, введенных в систему, примерно одного порядка, можно предположить, что ион щелочного металла имеет преимущество в связывании с

основанием, что прямо противоположно характеру взаимодействий, наблюдающемуся в жидких растворах [33].

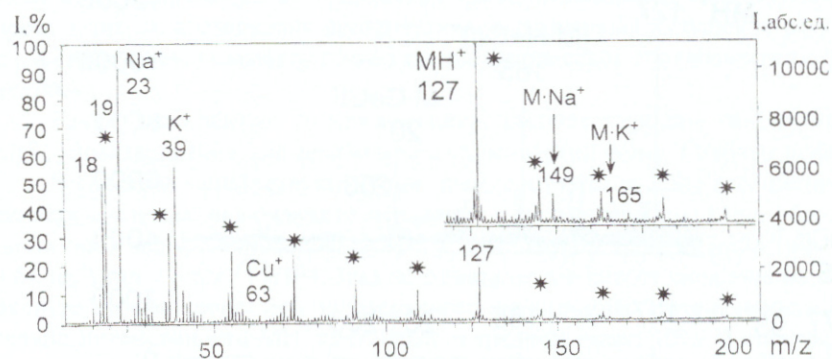


Рис. 3. НТ ББА масс-спектр замороженного водного раствора, содержащего $m_1^3\text{Ura}$ ($0.5 \cdot 10^{-3}\text{M}$) и CuSO_4 ($0.5 \cdot 10^{-4}\text{M}$). (Коммерческий образец основания содержит следовые количества примеси натрия и калия [4]). $T = -73^\circ\text{C}$. Серия кластеров воды $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{H}^+$ обозначена *.

Ассоциаты оснований с ионами двухвалентных металлов появлялись в спектрах при концентрациях солей порядка 10^{-3}M и выше, при которых в эвтектике выделяется фаза кристаллогидрата, дающая характеристический спектр. В таких системах, по-видимому, реализуются не парные комплексы основание-металл, а контакт оснований с поверхностью зерен кристаллогидратов.

На рис. 4 и рис. 5 приведены типичные НТ ББА масс спектры систем, содержащих пары различных оснований и ионов: рис. 4,а - $m^1\text{Thy} : \text{CuSO}_4$; рис. 4,б - $\text{Cyt} : \text{CuSO}_4$; рис. 5, а - $m_1^3\text{Ura} : \text{CaCl}_2$, рис. 5,б - $m^1\text{Thy} : \text{CaCl}_2$, рис. 5,в - $\text{Cyt} : \text{CaCl}_2$. Масс-спектры для систем с остальными парами основание-соль имели качественно сходный характер.

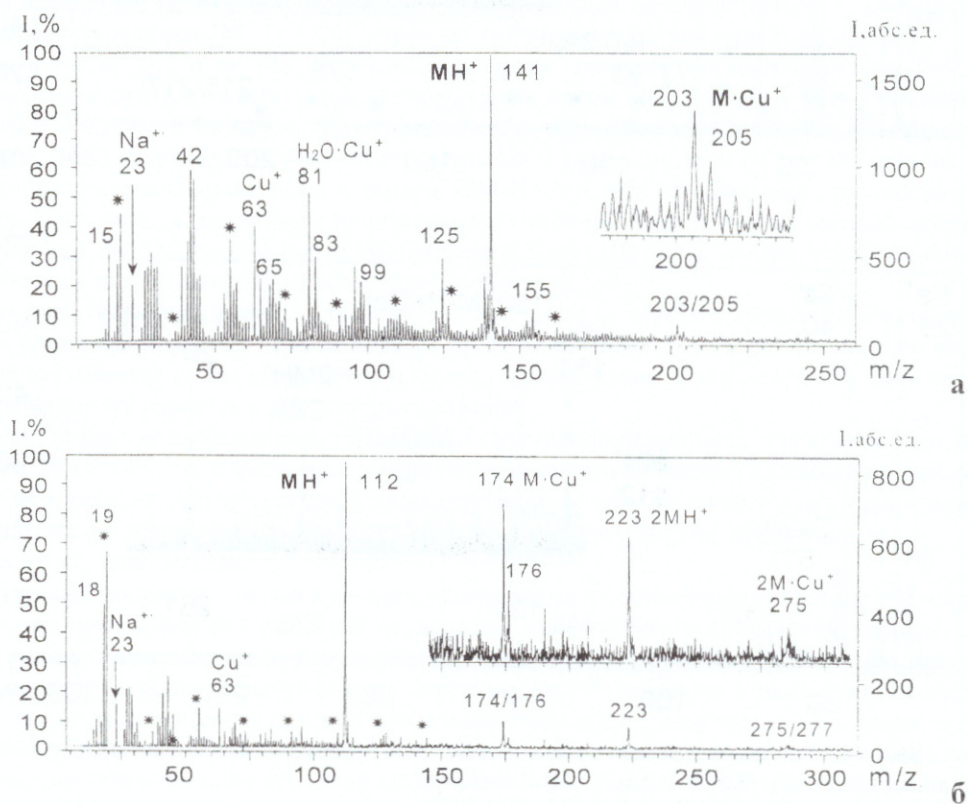


Рис. 4. НТ ББА масс спектры замороженных водных растворов оснований с солью меди.
а - $m^1\text{Thy} : \text{CuSO}_4$ ($0.5 \cdot 10^{-2} : 0.5 \cdot 10^{-2}\text{M}$), $T = -73^\circ\text{C}$;
б - $\text{Cyt} : \text{CuSO}_4$, ($0.5 \cdot 10^{-2} : 0.5 \cdot 10^{-3}\text{M}$), $T = -85^\circ\text{C}$.

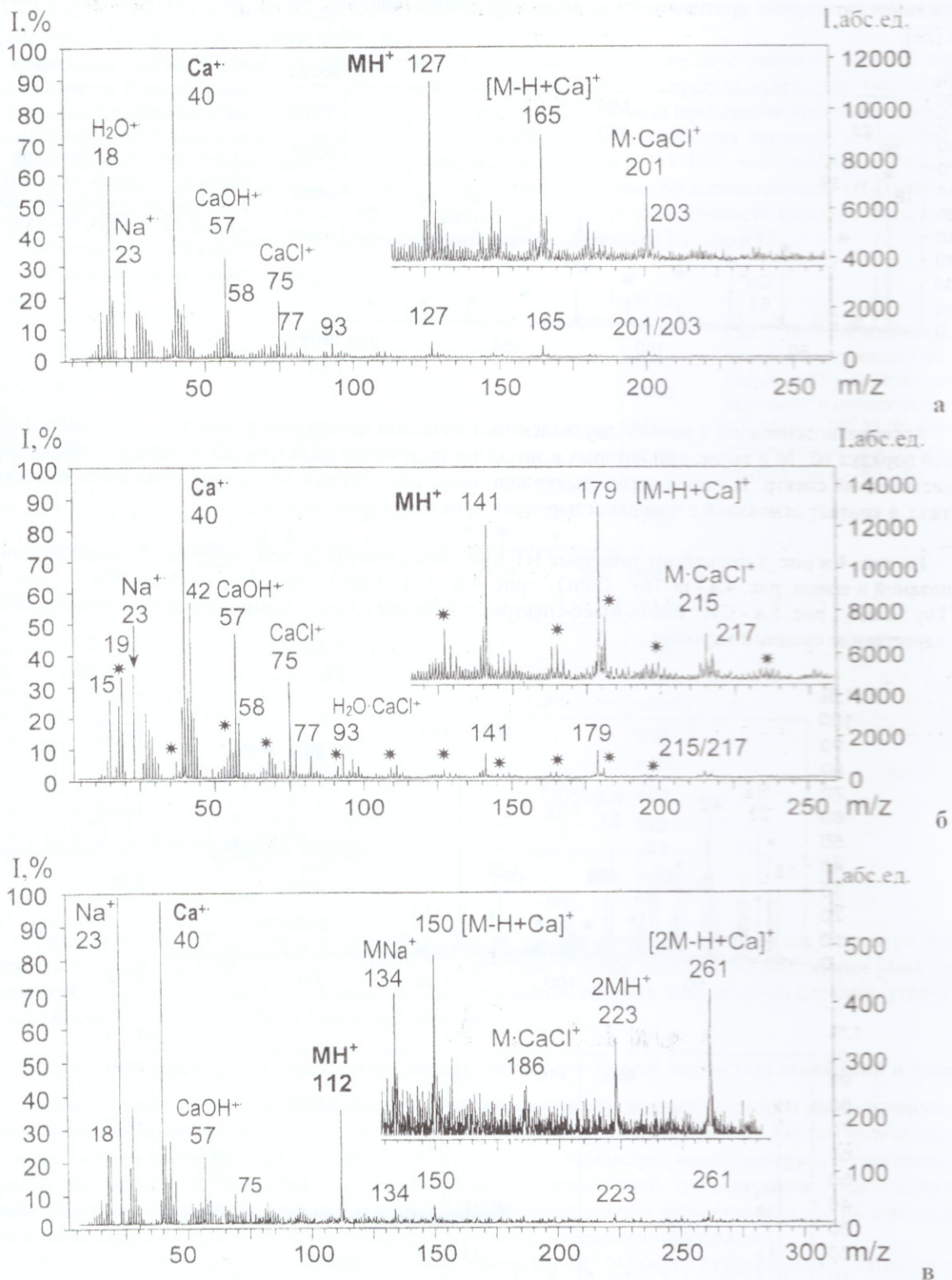


Рис. 5. НТ ББА масс спектры замороженных водных растворов пиримидиновых оснований и хлорида кальция:
 (а) - $m_1^3\text{Ura}$: CaCl_2 ($0.5 \cdot 10^{-3}$: $0.5 \cdot 10^{-2}$ M), $T = -70^\circ\text{C}$;
 (б) - $m_1^1\text{Thy}$: CaCl_2 ($0.5 \cdot 10^{-3}$: $0.5 \cdot 10^{-2}$ M), $T = -70^\circ\text{C}$;
 (в) - Cyt : CaCl_2 ($0.5 \cdot 10^{-2}$: $0.5 \cdot 10^{-3}$ M), $T = -76^\circ\text{C}$.

Во всех спектрах можно выделить наборы ионов, соответствующих различным компонентам образца. Кристаллитам льда соответствуют малоинтенсивные пики кластеров воды, интенсивный пик H_3O^+ , m/z 19, а также достаточно интенсивный пик H_2O^+ , m/z 18, свидетельствующий об активной сублимации льда в сочетании с дегидратацией кристаллогидратов. Кристаллогидратам трех солей отвечают соответствующие пики: кристаллогидрату $\text{CuSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O} - \text{Cu}^+$, m/z 63/65; $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{Cu}^+$, m/z 81/83 при $n = 1$ и m/z

99/101 при $n = 2$ (рис. 4,а); кристаллогидрату $\text{CuCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ - эти же два типа гидратов: кристаллогидрату $\text{CaCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ - Ca^+ , m/z 40; CaOH^+ , m/z 57; $\text{H}_2\text{O} \cdot \text{Ca}^+$, m/z 58; CaCl^+ , m/z 75/77 (рис. 5). Содержание молекул воды в кристаллогидратах обозначено как x , поскольку в используемых экспериментальных условиях происходит их постепенная дегидратация, вызывающая нарушение регулярной кристаллической решетки, в связи с чем указывать точное стехиометрическое соотношение соли и воды не представляется корректным.

Также все спектры содержали пики, соответствующие основаниям, включая молекулярный ион MH^+ , характеристические фрагменты и «химический шум». Гидраты оснований не зарегистрированы.

В спектрах присутствуют новые пики, соответствующие ассоциатам оснований с ионами металлов. Во всех системах, включающих основание и медьсодержащие соли, образовывался только один тип ассоциата иона меди с основанием - $\text{M} \cdot \text{Cu}^+$: $m_1^3\text{Thy} \cdot \text{Cu}^+$, m/z 203/205 (рис. 4,а). $\text{Cyt} \cdot \text{Cu}^+$, m/z 174/176 (рис. 4,б), $m_1^1\text{Ura} \cdot \text{Cu}^+$, m/z 189/191. Вид ассоциата не зависел от типа аниона используемой соли меди - двухзарядного сульфат-иона или однозарядного хлорид-иона. Интенсивность пиков ассоциатов $\text{M} \cdot \text{Cu}^+$ относительно интенсивности MH^+ составляла в среднем около 10%. В спектре системы, содержащей Cyt , присутствует заметный пик димера 2MH^+ , m/z 223, а также комплекс димера с ионом меди 2MCu^+ , m/z 275/277.

Ассоциаты оснований с ионом кальция имеют более сложный вид (см. рис. 5). Для всех трех пиримидиновых оснований наблюдается однозарядный комплекс, образующийся путем замещения одного протона основания ионом кальция: $[m_1^1\text{Ura} - \text{H} + \text{Ca}]^+$, m/z 165, $[m_1^3\text{Thy} - \text{H} + \text{Ca}]^+$, m/z 179, $[\text{Cyt} - \text{H} + \text{Ca}]^+$, m/z 150, а также ассоциаты с катионом и анионом соли $m_1^1\text{Ura} \cdot \text{CaCl}^+$, m/z 201/203, $m_1^3\text{Thy} \cdot \text{CaCl}^+$, m/z 215/217, $\text{Cyt} \cdot \text{CaCl}^+$, m/z 186/188. Пики, соответствующие возможному невалентному комплексу $\text{M} \cdot \text{Ca}^+$, перекрываются с изотопным (^{13}C) пиком соответствующих оснований. Интенсивность пиков $\text{M} \cdot \text{Ca}^+$ выше ожидаемой интенсивности изотопного пика комплекса с депротонированным основанием в пределах нескольких процентов, что не позволяет сделать достоверного вывода о возможном образовании и вкладе ассоциатов $\text{M} \cdot \text{Ca}^+$.

Отметим, что вытеснение протона в комплексе Ca^{2+} с основанием не может быть объяснено превращениями вследствие каких-либо процессов, индуцированных бомбардировкой. С большой степенью вероятности структура ионов $[\text{M} - \text{H} + \text{Ca}]^+$ отражает тип взаимодействия в твердом образце.

Для систем с $m_1^1\text{Ura}$ и $m_1^3\text{Thy}$ интенсивность пиков, соответствующих ассоциату $[\text{M} - \text{H} + \text{Ca}]^+$, близка к интенсивности соответствующих молекулярных ионов MH^+ , относительная интенсивность пиков ассоциатов $\text{M} \cdot \text{CaCl}^+$ также высока. Для системы с Cyt интенсивность этих ассоциатов меньше, однако в спектре присутствует димер основания и его комплекс с кальцием, причем тип связывания путем вытеснения одного протона сохраняется и в димере $[2\text{M} - \text{H} + \text{Ca}]^+$, m/z 261. Большая склонность к образованию димеров у цитозина, в сравнении с производными тимина и урацила, может быть объяснена наличием у цитозина протондонорной и протонакцепторной групп. Примесь натрия, поступающая с цитозином, проявляется в слабоинтенсивном ассоциате $\text{Cyt} \cdot \text{Na}^+$, m/z 134.

Налицо качественное различие в связывании с основаниями двух исследованных двухвалентных металлов: в то время как ион меди присоединяется путем невалентного электростатического взаимодействия, кальций связывается путем вытеснения протона, а также в комплексе с анионом. Для цитозина различие в связывании сохраняется и для димера основания.

Искомый эффектом является также различие в связывании ионов металлов в жидком и замороженном растворе. Известно, что в растворах с основаниями преимущественно связывается ион меди: ассоциация с ионом кальция отсутствует либо наблюдается при очень высокой концентрации ионов [33]. В замороженном же растворе взаимодействие оснований с кальцием весьма эффективно и его уровень намного выше, чем с ионами меди.

Усиление взаимодействия ионов кальция с основаниями в замороженном образце объясняется качественно теми же причинами, которые были предложены для объяснения связывания щелочных металлов: при фазовом разделении и вымораживании растворителя-воды в кристаллы льда между молекулами растворенных веществ возникают вынужденные контакты, отсутствовавшие в разбавленном растворе. Повторим, что и в водных растворах при высоких концентрациях Ca^{2+} появляются комплексы кальция с основаниями [33]. Большой интерес представляет тип связывания иона металла, состоящий в вытеснении протона. Отметим, что в качестве исходной информации о возможных структурах комплексов основание-металл берутся обычно данные рентгеноструктурного анализа [34], который, как известно, не дает прямой информации о положении легких атомов водорода. О связывании с вытеснением водорода может свидетельствовать уменьшенное расстояние между ионом металла и гетероатомом основания. В связи с этим одним из направлений дальнейшего поиска должен являться анализ рентгеноструктурных данных для кристаллов оснований, нуклеозидов, нуклеотидов, содержащих ионы кальция; данная задача не является тривиальной, поскольку во многих случаях связывание ионов двухвалентных металлов с компонентами нуклеиновых кислот в кристаллах происходит опосредовано через молекулы кристаллизационной

воды. В этом плане масс-спектрометрические данные для твердых образцов, полученных путем замораживания, могут представлять интерес для сравнения с данными для кристаллов оснований, выращенных при положительных температурах.

Низкий уровень связывания ионов меди с основаниями в замороженных растворах в первом приближении может быть объяснен кинетическим эффектом: рост кристаллогидратов солей меди происходит достаточно быстро [29], что, по-видимому, способствует эффективному фазовому разделению по отношению к органическому компоненту раствора.

Более глубокие причины различий во взаимодействии ионов кальция и меди с основаниями следует искать в принадлежности данных металлов к разным группам периодической системы элементов - щелочноземельным и *d*-элементам, соответственно. Для обоснованного анализа, однако, необходимо получить аналогичные экспериментальные данные для других двухвалентных металлов.

ВЫВОДЫ

Изучено взаимодействие примидиновых оснований нуклеиновых кислот метилтимина, метилурацила и цитозина с ионами двухвалентных металлов кальция и меди в замороженных водных растворах с использованием возможностей метода масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами.

На основании анализа кластерного состава НТ ББА масс-спектров и оценки структуры образцов сделаны заключения об особенностях связывания оснований с ионами двухвалентных металлов в замороженных растворах.

1. Комплексы двухвалентных ионов меди и кальция с основаниями были зарегистрированы только для относительно высоких концентраций солей металлов (более 10^{-4} М), достаточных для выделения фазы соответствующего кристаллогидрата, что отличает их от ранее изученных комплексов со щелочными металлами, наблюдающихся при следовых (10^{-5} М) концентрациях одновалентных ионов. При близких малых концентрациях (менее 10^{-4} М) ионов щелочных и двухвалентных металлов в исходном растворе, ассоциаты оснований образуются преимущественно со щелочными металлами.

2. Установлены типы комплексов основание-металл, характерных для твердого состояния замороженного образца и показано, что они различаются для двух исследованных металлов: с ионом меди образуются невалентные ассоциаты вида $M \cdot Cu^+$, стабилизированные электростатическим взаимодействием, а с ионом кальция ассоциаты образуются либо путем замещения протона основания $[M - H + Ca]^+$, либо путем связывания с ассоциатом кальция с однозарядным анионом $M \cdot CaCl^-$.

3. Для солей меди тип взаимодействия медь-основание не зависит от типа аниона (сульфат- или хлорид-ион) соли.

4. Обнаружено некоторое различие во взаимодействии с ионами металлов цитозина и производных тимина и урацила, обусловленное склонностью цитозина к димеризации: для последнего обнаружены комплексы с металлами не только мономеров, но и димеров цитозина, причем с сохранением различий в типе связывания меди и кальция.

5. Уровень ассоциации с основаниями ионов двух металлов качественно различается для жидких и замороженных растворов: в то время как в жидком растворе ионы меди связываются с основаниями, а ассоциация с ионами кальция отсутствует либо наблюдается при очень высокой концентрации последнего, для замороженных растворов характерна обратная зависимость: достаточно высокая эффективность связывания с кальцием и низкая - с медью.

Изменение качественных и количественных параметров связывания исследованных ионов металлов с основаниями при замораживании водных растворов может лежать в основе одного из возможных механизмов криповреждений на молекулярном уровне.

Обнаруженные различия в характере ассоциатов, образуемых разными парами ионов металлов и оснований показывают чувствительность метода НТ ББА к различиям в межмолекулярных взаимодействиях разнящихся соединений в твердых (замороженных) образцах, подтверждают его адекватность по отношению к поставленной задаче и перспективность дальнейших исследований, которые будут заключаться в систематическом наборе данных для остальных типов ионов металлов, имеющих биологическое значение.

Благодарности. Данное исследование было выполнено при частичной поддержке гранта фонда ИНТАС INTAS-99-00478.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные проблемы криобиологии / Под ред. Н.С.Пушкаря., А.М.Белоуса. К.: Наук. думка. 1981. 608 с.
2. Kosevich M.V. // Eur. Mass Spectrom. 1998. V. 4. N 4. P. 251-264.
3. Благой Ю.П., Шеина Г.Г., Иванов А.Ю., Радченко Е.Д., Косевич М.В., Шелковский В.С., Боряк О.А., Рубин Ю.В. // Физика низких температур. 1999. Т. 25. N 10. С. 1003-1020.
4. Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Blagoy Yu.P. // Rapid Commun. in Mass Spectrom. 1996. V. 10. N 2. P. 197-199.
5. Боряк О.А., Косевич М.В., Шелковский В.С., Благой Ю.П. // Биофизика. 1996. Т. 41. N 6. С. 1207-1213.
6. Косевич М.В. // Вісник Харківського університету N 422. Біофізичний вісник. 1998. Вип. 2. С. 5-14.
7. Боряк О.А., Косевич М.В., Шелковский В.С. // Приборы и техника эксперимента. 1993. N 6. С. 176-181.
8. Орлов В.В., Косевич М.В., Боряк О.А., Шелковский В.С. // Радиотехника и информатика. 2001. N4. С. 49-51.
9. Фогель Я.М. // Журн. техн. физики. 1976. Т. 46. Вып. 3. С. 621-624.
10. Черепин В.Т. Ионный микрозондовый анализ. К.: Наук. думка. 1992. 344 с.
11. Скурат В.Е. Получение и исследование ионов нелетучих органических веществ в газовой фазе и в вакууме / Итоги науки и техники. Сер. Радиационная химия. Фотохимия. Т. 5. М.: ВИНТИ. 1988. 176 с.
12. Vaek L.V., Adriaens A., Gijbels R. // Mass Spectrom. Rev. 1999. V. 18. N 1. P. 1-47.
13. Танцырев Г.Д., Николаев Е.Н. // Докл. АН СССР. 1972. Т. 206. N 1. С. 151-154.
14. Краткий справочник физико-химических величин. Изд. 8-е, перераб. / Под ред. А.А.Равделя, А.М.Пономаревой. Л.: Химия. 1983. 232 с.
15. Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Blagoy Yu.P. // Rapid Commun. in Mass Spectrom. 1995. V. 9. N 11. P. 978-984.
16. Boryak O.A., Stepanov I.O., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Orlov V.V., Blagoy Yu.P. // Europ. Mass Spectrom. 1996. V. 2. N 6. P. 329-339.
17. Косевич М.В. Физические механизмы вторичной эмиссии кластеров из конденсированных сред при низких температурах: Дис. докт. физ.-мат. наук: 01.04.14. Харьков. 2001. 369 с.
18. Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Иткин Ю.А. и др. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах. К.: Наук. думка. 1977. 243 с.
19. Юрченко Т.Н., Козлова В.Ф., Скорняков Б.А., Строна В.И., Репин Н.В. Влияние криопротекторов на биологические системы. К.: Наук. думка. 1989. 240 с.
20. Workman E.J., Reynolds S.E. // Phys. Rev. 1950. V. 78. N 3. P. 254-259.
21. Benninghoven A., Rudenauer F.G., Werner H.W. Secondary ion mass spectrometry: basic concepts, instrumental aspects, applications and trends. New York: Wiley, 1987. 1226 p.
22. Калинин Ф.Л., Лобов В.П., Жидков В.А. Справочник по биохимии. К.: Наук. думка. 1971. 1016 с.
23. Веркин Б.И., Гетманец В.Ф., Михальченко Р.С. Теплофизика низкотемпературного сублимационного охлаждения. К.: Наук. думка. 1980. 232 с.
24. Третьяков Ю.Д., Олейников Н.Н., Можаяев А.П. Основы криохимической технологии. М.: Высш. школа. 1987. 143 с.
25. Новиков П.А., Вагнер Е.А. // Инж.-физ. журн. 1969. Т. 17. N 5. С. 856-860.
26. Наберухин Ю.И. // Соросовский образовательный журнал. 1996. N 5. С. 41-48.
27. Танцырев Г.Д., Николаев Е.Н. // Докл. АН СССР. 1972. Т. 206. N 1. С. 151-154.
28. Lancaster G. M., Honda F., Fukuda Y., Rabalais J. W. // J. Amer. Chem. Soc. 1979. V. 101. N 8. P. 1951-1958.
29. Косевич М.В. // Проблемы криобиологии. 1999. N 2. С. 54-64.
30. Sunner J. // Org. Mass Spectrom. 1993. V. 28. N 8. P. 805-823.
31. Vekey K. // Mass Spectrom. Rev. 1995. V. 14. N 3. P. 195-225.
32. Kosevich M.V., Boryak O.A., Stepanov I.O., Shelkovsky V.S. // Europ. Mass Spectrom. 1997. V. 3. N 1. P. 11-17.
33. Благой Ю.П., Галкин В.Л., Гладченко Г.О., Корнилова С.В., Сорокин В.А., Шкорбатов А.Г. Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах. К.: Наук. думка. 1991. 272 с.
34. Swaminathan V., Sundaralingam M. // CRC Critical Rev. Biochem. 1979. V. 6. N 3. P. 245-336.