

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПЕРЕРІЗІВ УТВОРЕННЯ ДОДАТНІХ ІОНІВ МОЛЕКУЛИ ЦИТОЗИНУ ТА ЇЇ ФРАГМЕНТІВ ПОВІЛЬНИМИ ЕЛЕКТРОНАМИ

М.І. Суховія., М.О. Маргітч, М.І. Шафраньош, Л.Л. Шимон,
І.І. Шафраньош

Ужгородський національний університет, 88000, м. Ужгород, вул. Волошина, 54,
mshafra@tn.uz.ua

Надійшла до редакції 26 липня 2005 року

Методом електронного та молекулярного пучків, що перетинаються, вперше отримані дані про абсолютні величини перерізів утворення додатних іонів молекул азотистої основи нуклеїнових кислот – цитозину. Встановлено, що максимального значення повний переріз іонізації цитозину досягає при енергії налітаючих електронів 78 еВ, і його абсолютна величина становить $7,8 \cdot 10^{-16}$ см². Також визначені величини парціальних перерізів продуктів дисоціативної іонізації молекул цитозину електронним ударом. Обговорюються біофізичні наслідки процесів іонізації нуклеотидних основ.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: молекула цитозину, додатні іони, ефективний переріз іонізації, дисоціативна іонізація, повільні електрони, молекулярний пучок.

Важливою кількісною характеристикою взаємодії випромінювання з речовиною є ефективні перерізи відповідних фізичних процесів: іонізації, збудження, дисоціації тощо. Саме величина перерізу визначає ймовірність і особливості протікання даного процесу при конкретних умовах опромінення. Така інформація необхідна для оцінки вкладу первинних фізичних процесів в радіаційне ураження живих організмів і для прогнозування подальших біофізичних наслідків, наприклад при радіотерапії. Як відомо [1,2], основну кількість вторинних частинок, які виникають в опроміненому середовищі під дією різних видів високоенергетичної радіації, становлять повільні електрони (біля 90%). В той же час у літературі відсутні дані про абсолютні величини перерізів іонізації електронним ударом біологічно важливих молекул.

Авторами даної статті проведені систематичні дослідження [3-6] взаємодії низькоенергетичних електронів (0-300 еВ) з молекулами азотистих основ нуклеїнових кислот. Було показано, що, крім збудження та іонізації, мають місце процеси дисоціативного збудження та дисоціативної іонізації нуклеотидних основ. Оцінені відносні імовірності кожного із процесів при різних енергіях електронів. В останні роки також кілька закордонних дослідницьких груп розпочали вивчення електрон-молекулярних взаємодій, приділяючи основну увагу резонансним явищам [7,8].

Надійні дані про перерізи іонізації біомолекул можуть бути отримані лише у прецизійному експерименті, в якому вплив середовища практично зведений до нуля. Саме такий підхід із застосуванням сучасної техніки і методики перетину молекулярного і електронного пучків був реалізований авторами. Експериментальне визначення величин абсолютних перерізів утворення додатних іонів молекул цитозину і їх фрагментів при різних експериментальних умовах електронного удару є завданням даної роботи.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В роботі використано препарат азотистої основи нуклеїнових кислот - цитозину фірми Sigma-Aldrich (чистота 99%).

Процес іонізації досліджувався методом молекулярного і електронного пучків, які перетинаються під прямим кутом, з реєстрацією іонів в аналоговому режимі [9]. Блок-схема оригінальної установки показана на рис.1.

Суть даного експерименту заключається в слідуючому. Пучок молекул цитозину отримувався за допомогою термічного ефузійного джерела багатоканального типу та системи колімуючих щілин. Складові ефузійного джерела: мідний контейнер з препаратом цитозину, резистивний нагрівник контейнера, прокалібрований термопарний (хромель-алюмель) датчик температури контейнера, теплові екрани. Молекули пучка проходили через область взаємодії з електронним пучком і в кінці свого шляху осідали на дні колектора, утворюючи з часом помітний слід – конденсат. Колектором служила мідна камера циліндричної форми із входною щілиною S_4 та плоским дном, охолоджена до температури рідкого азоту. За масою конденсату і часом його утворення визначалась інтенсивність молекулярного пучка, а

відповідно, і його концентрація. Геометричні розміри конденсату і відстань до ефузійного джерела дозволяють встановити параметри пучка: переріз області зіткнення та кутову апертуру.

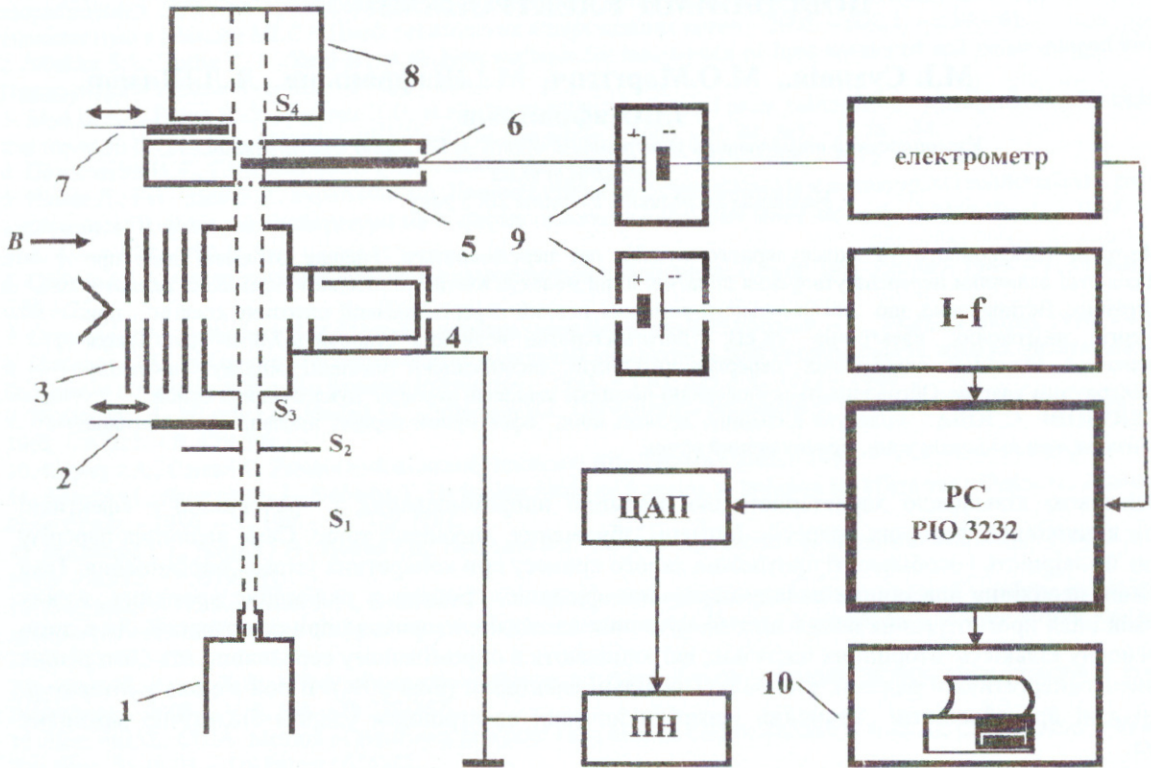


Рис. 1. Блок-схема експериментальної установки:

1- джерело молекулярного пучка; 2, 7 - засувки, перекриваючі молекулярний пучок; S_1, S_2, S_3, S_4 - колімуючі щілини; 3 - електронна гармата; 4 - колектор електронів; 5 - колектор іонів; 6 - зонд; 8 - колектор молекул; 9 - гальванічні джерела потенціалів; 10 - принтер; ЦАП - цифроаналоговий перетворювач; ПН - підсилювач напруги; I-f - перетворювач "струм-частота".

Джерелом електронів служила п'ятиелектродна гармата із катодом, виготовленим із торованого вольфраму. Температура електронної гармати була 400К, що забезпечувало стабільність параметрів гармати при роботі. Електрони пучка уловлювались циліндром Фарадея, який знаходився під додатнім потенціалом. Виміри проводилися при силі струму пучка електронів $\sim 1 \cdot 10^{-6} \text{ A}$ і енергетичній неоднорідності електронів на піввисоті їх енергетичного розподілу $\Delta E_{1/2} \sim 0,3 \text{ eV}$. Електронна гармата розміщувалася у поздовжньому магнітному полі індукцією $B = 1,2 \cdot 10^{-2} \text{ Тл}$.

Для повного збору позитивних іонів, що утворюються в області перетину електронного та іонного пучків, на шляху молекулярного пучка встановлювався прохідний колектор, всередині якого міститься осевий електрод (зонд) з негативним потенціалом (-25 В). Магнітне поле унеможливило попадання на зонд електронів, розсіяних на молекулах цитозину та поверхнях електродів. Система управління та реєстрації складалася із електрометра типу В7-30 чутливістю $1 \cdot 10^{-14} \text{ A}$ (для вимірювання струму утворених іонів), блоку перетворення струм-частота (для електронного пучка), блоку дискретної розгортки прискорюючого потенціалу електронного пучка (ЦАП, ПН), персонального комп'ютера з інтерфейсною картою РІО-3232. Основні експерименти проводилися при вакуумі у камері зіткнень $\sim 5 \cdot 10^{-8} \text{ Тор}$.

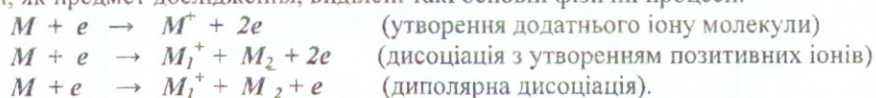
Для апробації методики досліджень камера зіткнень за допомогою прецизійної системи напуску (СНА-2) наповнювалася газом SF_6 до тиску $\sim 1 \cdot 10^{-5} \text{ Тор}$ і реєструвався резонанс для процесу утворення іонів SF_6^+ . В цьому випадку на зонд подавався позитивний потенціал: +25 В. Положення резонансу іонів SF_6^+ (біля 0,0 eV) використовувалося для калібрування енергетичної шкали електронів, а його ширина - для знаходження величини $\Delta E_{1/2}$. Потім камера зіткнень відпомпувалася і заповнювалася газом N_2 до тиску $\sim 1 \cdot 10^{-5} \text{ Тор}$ і вимірювалася енергетична залежність перерізу утворення іонів N_2^+ . Проведені таким

Експериментальне визначення перерізів утворення додатніх іонів...

способом контрольні виміри характеристик еталонних газів добре узгоджувались з даними літератури [10]. Відносні похибки визначення перерізів іонізації молекул цитозину не перевищували 11%.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Із усієї сукупності фізичних явищ, супроводжуваних непружні взаємодії молекули M з електроном e , у даній роботі, як предмет дослідження, виділені такі основні фізичні процеси:



Відмітимо, що вищенаведені процеси протікають практично одночасно, з великими швидкостями і з різними ймовірностями.

Як відомо [11], для визначення абсолютних величин перерізів іонізації молекул-мішеней можна використати таке співвідношення:

$$Q = i / i_e N l, \quad (1)$$

де Q - повний переріз утворення іонів; i - сила струму іонів відповідного знаку; i_e - сила струму електронного пучка; N - концентрація молекул цитозину в області перетину пучків; l - шлях електронів у молекулярному пучку.

Видно, що у формулу (1) входять експериментальні параметри, прецизійне вимірювання яких є нелегким завданням. Особливо це стосується визначення концентрації молекул безпосередньо в області взаємодії з електронами. Відмітимо, що струми i та i_e вимірюються електрометрами, а шлях l визначається із геометрії молекулярного пучка.

Експериментальні виміри проводилися у кілька етапів. Спочатку при вакуумі $\sim 5 \cdot 10^{-8}$ Тор в діапазоні 0–200 еВ вимірювалися енергетичні залежності перерізів утворення додатніх іонів цитозину. На цьому ж етапі за умови відсутності пучка молекул цитозину детально визначався внесок від іонізації залишкового газу, який становив $\sim 2\%$.

На другому етапі визначалась концентрація N молекул у пучку за такою процедурою. При закритих засувках 2 і 7 (див. рис.1) температура контейнера з цитозином піднімалась до 384К і стабілізувалась. Масивність контейнера разом із стабілізованим джерелом нагріву забезпечувала його температурний режим на рівні 384 ± 2 К протягом всього етапу вимірів. Лише після цього на заданий проміжок часу відкривалися засувки 2 і 7 і вимірювалися струми позитивних іонів цитозину при енергії електронного пучка 78 еВ. Час утворення конденсату у п'яти дослідах змінювався у межах $(1 \div 3) \cdot 10^3$ с. Після закінчення експерименту оптичним методом визначалась маса конденсату M .

З іншого боку, маса конденсату M залежить від параметрів експерименту наступним чином:

$$M = N S m v t, \quad (2)$$

де N - шукана концентрація молекул в області перетину пучків; S - переріз області перетину; m - маса молекули; v - швидкість молекул у пучку; t - час наплення конденсату.

На третьому етапі визначалися абсолютні величини перерізів утворення позитивних іонів цитозину та продуктів його дисоціативної іонізації з використанням співвідношень (1) і (2). Таким чином були вперше отримані дані про абсолютні величини повних ефективних перерізів утворення додатніх іонів молекул цитозину та їхніх фрагментів електронним ударом в області енергій електронів від порогу до 200 еВ. Результати експериментів показані на рис.2, де по осі ординат відкладено переріз іонізації в см^2 , а по осі абсцис – енергія іонізуючих електронів в електрон-вольтах (еВ).

Як видно із рис.2, крива іонізації цитозинових молекул є пологою із слабо вираженими особливостями та широким максимумом в діапазоні від 73 до 90 еВ. Зокрема, при енергії 78 еВ переріз іонізації рівний $(7,8 \pm 0,8) \cdot 10^{-16} \text{ см}^2$. Отриманий у даній роботі переріз утворення додатніх іонів має зміст повного перерізу, тобто включає в себе перерізи утворення іонів як цілої молекули, так і її фрагментів (так звані парціальні перерізи). Поріг утворення додатніх іонів рівний $9,0 \pm 0,2$ еВ, що непогано узгоджується з даними, отриманими іншими методами [12,13]. Для визначення перерізів продуктів дисоціативної іонізації цитозину були використані мас-спектрометричні дані, отримані у роботі [14]. Парціальні перерізи утворення додатніх іонів найбільш вірогідних фрагментів цитозину для енергій налітаючих електронів 78 еВ приведені у таблиці 1. Аналіз таблиці вказує, що максимального значення набуває абсолютний переріз іону цілої молекули. Він рівний $(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-16} \text{ см}^2$ при енергії електронів 78 еВ. Утворення іонів фрагментів цитозину реалізується з набагато меншою ймовірністю $\sim (10^{-17} - 10^{-18}) \text{ см}^2$. Із фрагментів відносно великий переріз мають іони груп $-N-C-NH_2$, $-N-C=O$. Спостерігаються іони молекули без груп $-NH_2$ чи $-C=O$, а також іон піримідинового кільця. Структурні формули найбільш імовірних іонів молекулярних фрагментів цитозину зображені на рис.3.

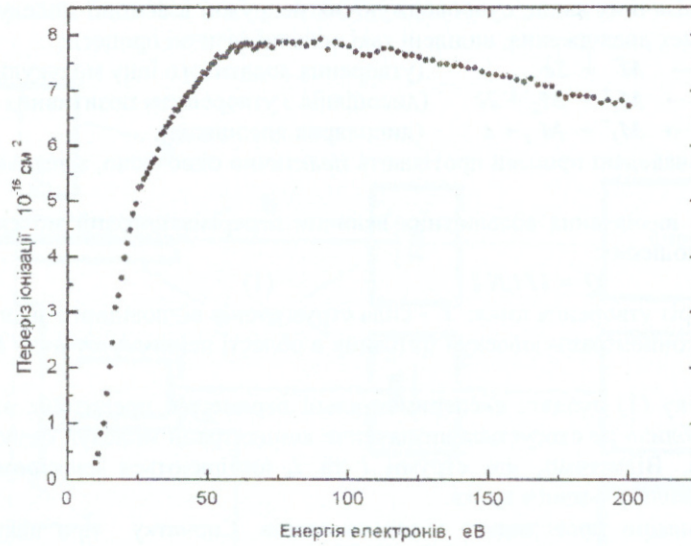


Рис.2. Залежність абсолютної величини повного ефективного перерізу утворення додатніх іонів цитозину та іонів його фрагментів від енергії електронів.

Таблиця 1. Мас-спектрометричні характеристики і абсолютні значення ефективних перерізів іонізації (Q) молекул цитозину та фрагментів при енергії електронів 78 eV.

Іон	Маса	$Q, 10^{-16} (\text{см}^2)$
$\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O}$	111	1,65
$\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2\text{O}; \text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3$	95	0,17
$\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2\text{O}; \text{C}_3\text{H}_5\text{N}_3$	83	0,25
$\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_3$	81	0,17
$\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2$	79	0,11
$\text{C}_3\text{H}_3\text{NO}; \text{C}_3\text{H}_5\text{N}_2$	69	0,52
$\text{C}_3\text{H}_2\text{NO}$	68	0,32
$\text{C}_3\text{HNO}; \text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2$	67	0,36
$\text{C}_2\text{H}_2\text{NO}; \text{CN}_2\text{O}$	56	0,09
$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}_2$	55	0,17
$\text{C}_3\text{H}_2\text{N}$	52	0,10
CH_2NO	44	0,35
CHNO	43	0,27
$\text{CH}_2\text{N}_2; \text{CNO}$	42	0,62
$\text{CHN}_2; \text{C}_2\text{H}_3\text{N}$	41	0,36
$\text{C}_2\text{H}_2\text{N}$	40	0,40
C_2HN	39	0,16
COH	29	0,12
$\text{CO}; \text{CH}_2\text{N}$	28	0,60
CHN	27	0,12
H_2O	18	0,14
OH	17	0,11
$\text{O}; \text{NH}_2$	16	0,12

Експериментальне визначення перерізів утворення додатніх іонів...

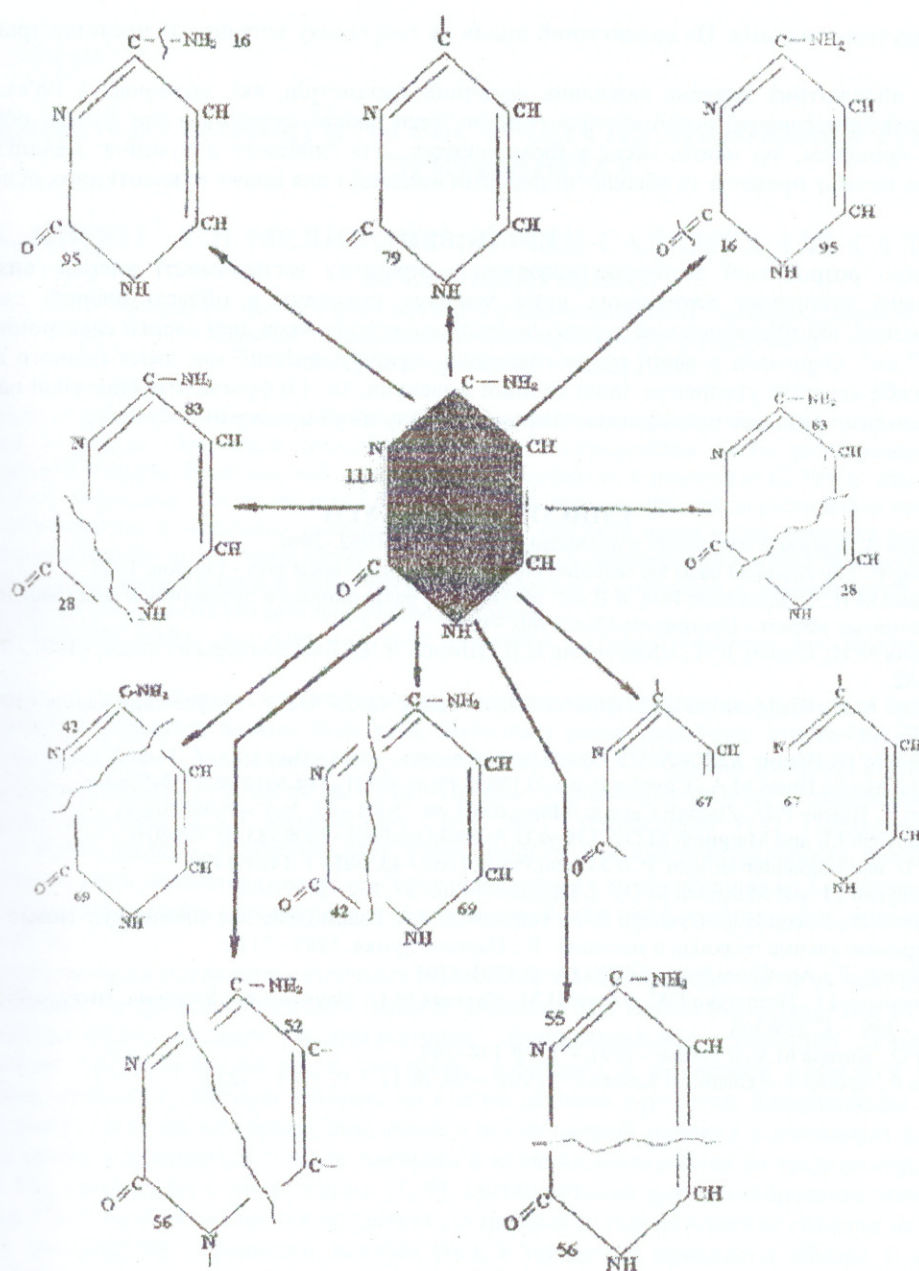


Рис.3. Структурні формули найбільш імовірних іонів молекулярних фрагментів цитозину.

З використанням даних [16] про геометричні параметри молекули цитозину (довжини зв'язків, величини кутів тощо) була розрахована площа піримідинового кільця цитозину. Отримане значення геометричної площі є за величиною того ж порядку, як і визначений повний переріз фізичного процесу. Це означає, що при попаданні електрону в молекулярну мішень з площею перерізу $\sim 10^{-16} \text{ см}^2$ обов'язково відбудеться елементарний акт взаємодії. До речі, переріз іонізації біомолекули в кілька разів більший перерізу іонізації молекул води H_2O ($1,5 \cdot 10^{-16} \text{ см}^2$, згідно [15]), на долю яких припадає $\sim 70\%$ маси живих клітин. Звідси випливає, що протекуючі властивості молекул води щодо азотистих основ за іонізаційним критерієм в умовах клітини будуть виражені не досить істотно. Іонізація нуклеотидних основ, а особливо дисоціативна іонізація, під впливом вторинних низькоенергетичних електронів, у свою чергу, приводитимуть до структурних і функціональних зрушень у живих клітинах. Насамперед слід очікувати порушень стабільності системи водневих зв'язків між комплементарними парами основ,

генотоксичних і мутагенних змін. Не виключений вплив на енергетику клітини, на протонні транспортні системи.

Визначення абсолютних значень важливих фізичних параметрів, які, водночас, є об'єктивними біофізичними характеристиками, дозволяє провести не лише якісні судження, але й дати об'єктивну кількісну оцінку процесам, які мають місце у біомолекулах. Для глибшого розуміння механізмів слід отримати дані про перебіг процесів та абсолютні перерізи іонізації і для інших нуклеотидних основ.

ВИСНОВКИ

За допомогою розробленої авторами методики у прямому експерименті вперше визначений абсолютний переріз утворення позитивних іонів молекул цитозину в області енергій електронів 0-200 еВ. Встановлено, що максимальний переріз іонізації спостерігається при енергії електронів 78 еВ і дорівнює $7,8 \cdot 10^{-16}$ см². Отримане у даній роботі значення перерізу іонізації має зміст повного перерізу, тобто включає в себе перерізи утворення іонів як цілої молекули, так і її фрагментів (так звані парціальні перерізи). Домінуючим процесом є утворення позитивного іону цілої молекули.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Чердзби А. Ядерные излучения и полимеры. -М.: Наука, 1962.-290с.
2. Sonntag C. The chemical basis for radiation biology // Taylor&Francis pres.- London, 1987.
3. Суховія М.І., Шафраньош І.І. // В кн.: Механізми радіаційного поразення і відновлення нуклеїнових кислот.- Пушчино-на-Оке, 1980. - С.51.
4. Суховія М.І., Славик В.Н., Шафраньош І.І., Шимон Л.Л.// Біополимери и клетка, - 1991.- 7. вып.6. – С.77-82.
5. Суховія М.І., Шафраньош І.І., Шимон Л.Л. // Вісник ХДУ.- №434.- Біофізичний вісник.- 1999.- Вип.3.- С.39-41.
6. Суховія М.І.// Вісник ХДУ.- №525.- Біофізичний вісник.- 2001.- Вип.1(8).- С.34-36.
7. Penhoat M.-A., Huels M.A., Cloutier P. e.a.//J.Chem.Phys.-2001.-**114**,№13.-P.5755-5763.
8. Martin F., Burrov P.D., Zhongli Cai e.a. // Phys.Rev.Lett.- 2004.- **93**, №6. – P.068101(4).
9. Shafranyosh I.I. and Margitich M.O.// J.Phys.B:At.Mol.Opt.Phys.-2000.-**33**-P.905-910.
10. Rapp D. and Englander-Golden P. // J.Chem.Phys.-1965.- **43**, №5.- P.1464-1479.
11. Shafranyosh I.I. and Margitich M.O.// Z.Phys.D. –1996.- **37**, №2.- P.97-103.
12. Веркин Б.И., Янсон И.К., Суходуб Л.Ф., Теплицкий А.Б. Взаимодействие биомолекул. Новые экспериментальные подходы и методы. – К.: Наукова думка, 1985.- 317 с.
13. Steenken S. // J.Am.Chem.Soc.- 1993.-**114**.- P.4701-4704.
14. Шафраньош І.І., Петрушко І.А., Славик В.М., Суховія М.І.// Наук. вісник Ужгород. ун-ту, с.Фізика.- 2000. - №6. – С.259-363.
15. Viktor G., Kurepa M.V. // Fizika.– 1991.– **8**.– P.134–147.
16. Hobza P., Šponer J. // Chemical Reviews. – 1999. – 99, № 11. – P. 3247 – 3276.