

УДК 577.3

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

А.И. Гасан, В.Я. Малеев, А.В. Филипский

*Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины,
г. Харьков, 61085, ул. Акад. Проскуры, 12*

Поступила в редакцию 22 декабря 2004 г.

Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии проведено исследование обратимости процессов, происходящих при нагревании D-рибозы, уридина и уридин-5'-трифосфата в интервале температур от 20 до 400°C. Получены индивидуальные кривые ДСК исследуемых веществ, из которых следует, что процессы, соответствующие эндотермическим и экзотермическим пикам выше температуры 200°C, являются необратимыми. Обнаружено, что вид кривых ДСК, полученных с использованием открытых и герметично закрытых кювет существенно отличается. Опыты с сухими и увлажненными образцами показали, что присутствие воды оказало различное влияние на обнаруженные процессы, которое проявилось в отсутствии эндотермического пика выше температуры 200°C для более влажных образцов D-рибозы и уридин-5'-трифосфата, а также в уменьшении температуры максимума экзопиков. Определены температуры наблюдаемых процессов и рассчитаны их эффективные энергии активации и тепловые эффекты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: D-рибоза, уридин, уридин-5'-трифосфат, термическая устойчивость, обратимость, микрокалориметрия.

Проведенные ранее калориметрические исследования тимусной ДНК и ряда гомополинуклеотидов показали, что термическая устойчивость первичной структуры полинуклеотидов с различным типом нуклеотидов существенно отличается [1].

Дальнейший анализ термической стабильности (термический анализ нуклеотидов, нуклеозидов и сахаров) [2] позволил сделать вывод, что термическая деструкция полинуклеотидов связана в основном с процессами, происходящими в структуре D-рибозы. Тем не менее, полученные результаты еще не позволяют полностью представить механизм термического разрушения полинуклеотидов.

Известно, что метод ДСК, регистрирующий температурные изменения, непосредственно указывает на эндотермический или экзотермический характер процессов, но не дает прямого ответа об их молекулярных механизмах. Для определения последних зачастую необходимо совместное использование нескольких методов исследования (масс спектрометрия, гравиметрия и др.). Тем не менее, проведение опытов при различных условиях (давление, среда и т. п.), а также применение различно приготовленных образцов (различная увлажненность, присутствие других веществ и др.), зачастую позволяют сделать определенные выводы о механизме изучаемого процесса на основе результатов, полученных одним методом.

Принимая во внимание вышесказанное, для более глубокого понимания молекулярных механизмов термического разрушения полинуклеотидов проведены калориметрические исследования сухих и увлажненных образцов D-рибозы, уридина и уридин-5'-трифосфата при использовании открытых и герметично закрытых кювет, результаты которых представлены в настоящей работе.

Известно, что термическое разрушение является, как правило, необратимым процессом, однако для однозначного ответа необходимо подтверждение в каждом конкретном случае, для чего также изучена обратимость наблюдаемых процессов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии, который позволяет регистрировать изменения, происходящие в исследуемом образце при нагревании, и сопровождающиеся поглощением или выделением тепла, соответственно, в форме эндо- или экзотермических пиков, независимо от агрегатного состояния.

Термограммы исследуемых веществ получали с помощью дифференциального сканирующего микрокалориметра DSC-101 фирмы "Сетарам" (Франция) в двух одинаковых алюминиевых кюветах, одна из которых служила кюветой сравнения. Масса исследуемых образцов составляла порядка 3-8 мг. Чувствительность прибора при регистрации тепловых эффектов в программируемом режиме составляла ~30 мкВт.

Эксперименты с исследуемыми образцами проводили при скорости сканирования $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Калибровку прибора осуществляли с помощью стандартных образцов индия, олова и дифенила, имеющих различные температуры плавления и энергии переходов.

Исследовали препараты D-рибозы, уридин и уридин-5'-трифосфат (УТФ) фирмы "Serva".

Для получения увлажненных образцов с помощью насыщенного раствора соли BaCl в герметично закрытой камере задавали относительную влажность 90% и в течение 48 часов выдерживали предварительно высушенные образцы, что являлось достаточным условием для достижения равновесия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1-а, б, в (кривые 1 и 2) представлены результаты экспериментов, полученных с применением герметично закрытых и открытых кювет, из которых видно, что различная герметичность существенно отразилась на форме термограмм.

При использовании герметично закрытых кювет на термограммах для всех образцов присутствуют, как и в случае исследованных ранее полинуклеотидов, экзотермические пики выше 200°C , которые мы связываем с процессами термического разрушения [1].

В то же время для образцов D-рибозы и уридина в опытах с открытыми кюветами на термограммах

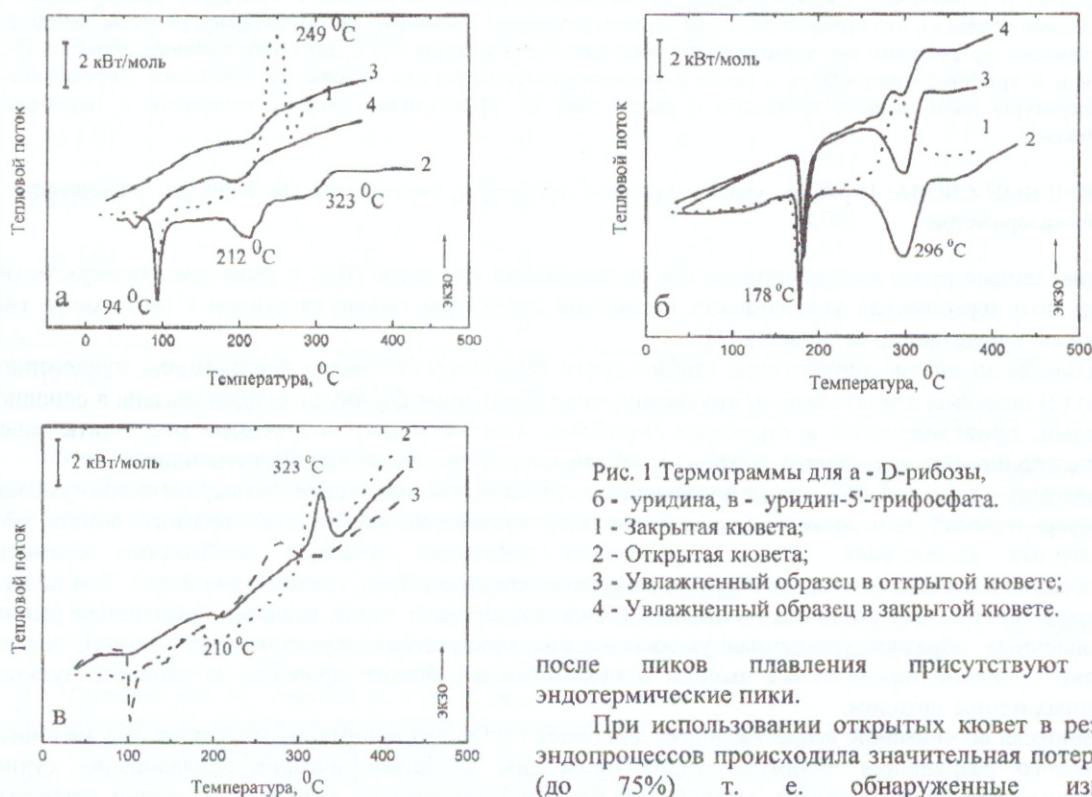


Рис. 1 Термограммы для а - D-рибозы, б - уридина, в - уридин-5'-трифосфата.
1 - Закрытая кювета;
2 - Открытая кювета;
3 - Увлажненный образец в открытой кювете;
4 - Увлажненный образец в закрытой кювете.

после пиков плавления присутствуют только эндотермические пики.

При использовании открытых кювет в результате эндотермических процессов происходила значительная потеря массы (до 75%) т. е. обнаруженные изменения сопровождаются образованием газообразных продуктов

реакции, чем, возможно, и объясняется отсутствие следующих экзотермических пиков.

В отличие от D-рибозы и уридина для уридин-5'-трифосфата на термограммах, полученных для открытых и закрытых кювет, существенных отличий нет. Эта особенность, а также внешний вид образцов после эндотермического процесса позволяет предположить, что данный процесс имеет одну природу для D-рибозы и уридина, но отличен для уридин-5'-трифосфата. Так, если исходный образец в виде порошка в случае D-рибозы и уридина "сплавлялся", то у образца уридин-5'-трифосфата видимых изменений не происходило. На данное отличие также указывает отсутствие уменьшения массы кюветы с образцом УТФ после нагрева до начала экзопика.

Кривые 3 и 4 на рис. 1, полученные для образцов с различной влажностью, указывают, что большее содержание воды в образце оказывает различный эффект на происходящие при нагревании изменения. Так на кривых ДСК увлажненного образца D-рибозы при использовании открытой и закрытой кювет вместо экзопиков выше 200°C присутствуют слабо выраженные эндопики. Очевидно, что полученные изменения связаны с присутствием в образце воды. Кроме того, влияние воды проявляется в отсутствии пика плавления (при увлажнении твердый образец становился гелеобразным и, следовательно,

кристаллической структуры уже не было), а также в присутствии широкого эндотермического пика при использовании герметично закрытой кюветы, связанного с дегидратацией.

Видно, что для уридина (рис.1, б) существенных изменений не наблюдается, что согласуется с отсутствием воды, поскольку после увлажнения масса образца не изменялась. Наложение эндопика на более широкий экзопик в случае увлажненного образца в герметично закрытой кювете, связано вероятнее всего с тем, что даже в герметично закрытой кювете из-за возникающего давления происходит выход газообразных продуктов реакции.

При увлажнении уридин-5'-трифосфата (рис.1, в), как и в случае D-рибозы на термограмме проявлялся острый пик дегидратации около 100°C , после которого следует еще один эндопик. Проведенные ранее исследования свидетельствуют о том, что они связаны с различными процессами [2]. Особенностью уридин-5'-трифосфата является присутствие экзопика во всех случаях, однако, большая влажность приводила к значительному уменьшению температуры максимума экзопика и к отсутствию эндопика.

Одна из возможностей метода ДСК заключается в определении обратимости процессов, происходящих при нагревании.

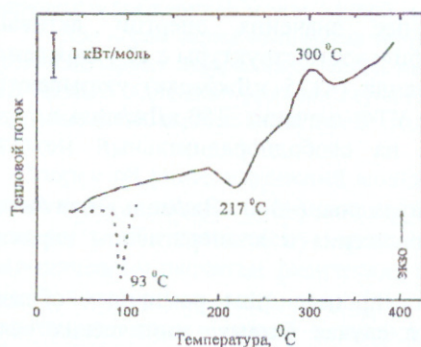


Рис. 4 Термограммы для D-рибозы. Закрытая кювета. Первый нагрев до 110°C .

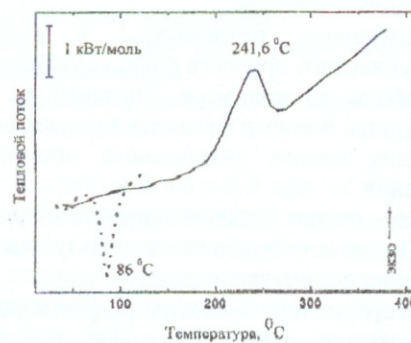


Рис. 5 Термограммы для D-рибозы. Первый нагрев до 130°C .

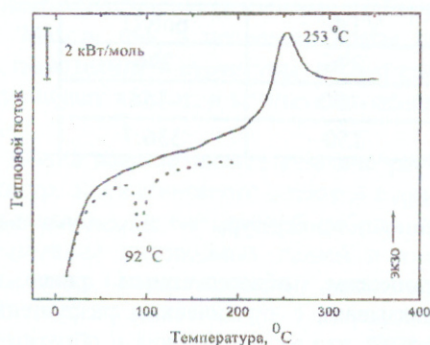


Рис. 6 Термограммы для D-рибозы. Первый нагрев до 200°C .

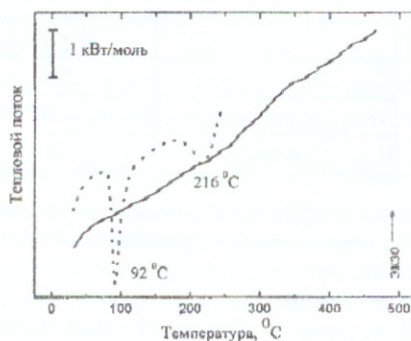


Рис. 7 Термограммы для D-рибозы. Первый нагрев до 245°C .

Для проверки обратимости процесса обычно используется процедура повторного прогрева: образец охлаждается, после чего заново снимается зависимость теплоемкости от температуры. Если при этом полностью воспроизводится исходная кривая, очевидно, что процесс обратим. Если при повторном сканировании не наблюдается поглощения или выделения тепла, (кривая воспроизводит базовую линию) делается вывод о необратимом характере изменений [3, 4, 5]. Следует, однако, иметь в виду, что величина процента обратимости зависит от ряда факторов: температуры, до которой образец нагревался в первом эксперименте, скорости сканирования, скорости (режима) охлаждения.

В нашем случае проверку обратимости проводили следующим образом. В начале каждый образец сканировали, а затем охлаждали в интервале температур от 20 до 400°C для обнаружения изменений. Затем проводили нагрев исходного образца до температуры меньшей на $5-10^{\circ}\text{C}$ окончания пика того процесса, обратимость которого исследовалась, и через сутки вновь нагревали тот же образец до температуры выше окончания пика.

Была исследована обратимость эндотермических и экзотермических процессов, следующих за плавлением.

Полученные при исследовании обратимости экзотермических процессов кривые ДСК (не приведены в настоящей работе), указывают на необратимый характер этих процессов для всех образцов.

Из полученных результатов (рис. 4-7) видно, что обратимость исследуемых процессов для D-рибозы существенно зависит от температуры, до которой образец нагревали первоначально. Если первое сканирование прекращали сразу после пика плавления, то при повторном нагреве проявлялись как эндотермический, так и экзотермический пики, следующие за ним (рис.4). Однако при увеличении температуры первого нагрева (в нашем случае на 20⁰С и выше пика плавления) регистрировался лишь экзотермический пик (рис.5, б).

Для экзотермического процесса наблюдалась подобная ситуация: если образец вначале нагревали, не доходя до температуры максимума эндотермического пика, то следующий за ним экзопик обнаруживался, иначе – нет (рис.6 и 7). Таким образом, изменения, связанные с эндотермическими и экзотермическими пиками, напрямую связаны с предыдущими процессами.

Обратимость процессов в случае уридина также как и для D-рибозы зависела от предварительного нагрева, однако для уридин-5'-трифосфата проявление экзотермического пика не зависело от предыдущих процессов.

Полученные температуры и рассчитанные эффективные значения энергии активации экзотермического процесса (табл.1) указывают на увеличение стабильности структуры с её усложнением от D-рибозы до полимера. Значения E_a для D-рибозы и уридина (<125 кДж/моль) указывают на преобладание ионного механизма разрушения, в то время как для УТФ значение 150 кДж/моль в случае протекания одного химического процесса может указывать на свободнорадикальный механизм разрушения.

Существенно большее значение энергии активации для полиуридина (~340 кДж/моль), полученное ранее [1], может говорить в пользу сделанного ранее предположения о кооперативном характере разрушения полинуклеотидов.

Вместе с тем значения эффективного теплового эффекта процесса для различных образцов приблизительно равны. Поскольку именно тепловой эффект в случае разрыва химических связей характеризует их энергию, то полученные результаты могут указывать на единый механизм термического разрушения.

Табл. 1 Термодинамические параметры экзотермического процесса.

	D-рибоза	уридин	УТФ	polyU
$T_{разр}, ^\circ\text{C}$	224	256	296	276
$\Delta H_{эфф}, \text{кДж/моль}^*$	-150	-133	-150	-154
$E_{эфф}, \text{кДж/моль}^{**}$	43	72	150	336.7

*Тепловой эффект рассчитывали из площади экзотермического пика.

** Энергию активации определяли методом Киссинджера (из зависимости температуры максимума пика от скорости нагрева).

Таким образом, получено, что экзотермическим процессам, обнаруженным ранее для полинуклеотидов и их структурных элементов, которые мы связываем с термическим разрушением, предшествуют необратимые эндотермические изменения, а также то, что их проявление и обратимость зависит от присутствия воды и условий герметичности кювет.

Термическая устойчивость и энергия активации увеличивается для рассмотренных структур в порядке их усложнения, но, скорее всего, итогом их деструкции является разрыв одних и тех же химических связей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гасан А.И., Малеев В.Я., Филипский А.В.//Вісник ХДУ, №568, Біофізичний Вісник, вип. 2, 2002 (11), Р. 20 – 24.
2. Филипский А.В.//Вісник ХДУ, №593, Біофізичний Вісник, вип. 1, 2003 (12), Р. 24-28.
3. Макаров А.А., Протасевич И.И., Гришина И.Б., Лобачев В.М., Бажулина Н.П., Есипова Н.Г.//Молекул. биология. 1994. Т. 28. С. 1346–1353.
4. Galisteo M.L., Conejero-Lara F., Nun-éz J., Sanchez-Ruiz J.M., Mateo P.L. //Thermochim. Acta. 1992. Vol. 199. P. 147–157.
5. Makarov A.A., Protasevich I.I., Frank E.G., Grishina I.B., Bolotina I.A., Esipova N.G. //Biochim.Biophys. Acta. 1991. Vol. 1078. P. 283–288.