

Утворення негативних іонів молекули цитозину при електронному ударі та його можливе біофізичне значення

М. І. Суховія, М. І. Шафраньош, М. О. Маргітич, І. І. Шафраньош

Ужгородський національний університет
Вул. Волошина, 54, Ужгород, 88000, Україна

E. mail: mshafra@tn.uz.ua

Оригінальним методом електронного та молекулярного пучків, що перетинаються, вперше отримано дані про абсолютні величини перерізів утворення негативних іонів канонічної нуклеотидної основи — цитозину. Показано, що максимальних значень переріз досягає при енергії налітаючих електронів 1,5 eV, і його абсолютна величина становить $4,2 \cdot 10^{-18}$ см². Обговорюється можливе біофізичне значення отриманих результатів.

Ключові слова: цитозин, негативні іони, ефективний переріз, електронний удар, ураження клітин повільними електронами.

Вступ. Інтерес до експериментального вивчення процесів утворення іонів біомолекул внаслідок електронного удару зумовлений, в першу чергу, важливістю проблеми внутрішньоклітинного опромінення біоструктур вторинними електронами, які у значній кількості утворюються в речовині при дії випромінювання різних видів. У зв'язку з цим актуальним стає фізичне моделювання клітинних іонізаційних процесів за рахунок зміни умов лабораторного експерименту, чим можна забезпечити моноенергетичність та однократність електронних впливів на біоструктури у достатньо широкому діапазоні енергій.

Перші дослідження взаємодії повільних моноенергетичних електронів з молекулами азотистих основ нуклеїнових кислот розпочато авторами даної статті ще у 80-х роках минулого століття [1]. У подальших наших роботах [2, 3] показано, що після електронного удару в біомолекулах проті-

кають різні фізичні процеси (збудження, іонізація, дисоціативне збудження та дисоціативна іонізація), і зроблено оцінку ймовірності кожного з процесів при різних енергіях електронів. В останні роки кілька закордонних дослідницьких груп також долучилися до вивчення електронно-молекулярних взаємодій, приділяючи основну увагу резонансним явищам [4, 5].

Важлива кількісна характеристика процесу іонізації молекул — ефективний переріз іонізації, який визначає ймовірність процесу утворення іонів за конкретних умов. У літературі відсутні дані про абсолютні величини перерізів іонізації молекул нуклеотидних основ повільними електронами. У той же час така інформація необхідна для розуміння ролі первинних фізичних процесів у радіаційному ураженні біоструктур та для прогнозування подальших радіобіологічних наслідків, зокрема, при радіотерапії.

Відмітимо, що дискусійним залишається питання стосовно біофізичного значення негативних

іонів. Пряме експериментальне визначення величин абсолютних перерізів утворення негативних іонів молекул цитозину внаслідок електронного удару та їхніх залежностей від енергії налітаючих електронів є метою цього дослідження.

Матеріали і методи. У роботі використано препарат азотистої основи нуклеїнових кислот — цитозину («Sigma-Aldrich», США).

Процес іонізації досліджували в умовах молекулярного і електронного пучків, які перетинаються під прямим кутом, з реєстрацією іонів в аналоговому режимі. Такий експериментальний підхід надійно зарекомендував себе раніше при вивченні іонізації атомів [6]. Пучок молекул цитозину формували за допомогою термічного ефузійного джерела багатоканального типу та системи колімуючих щілин. Складові ефузійного джерела: контейнер з препаратом цитозину, резистивний нагрівник контейнера, прокалібрований термопарний (хромель—алюмель) датчик температури контейнера, теплові екрани. Масивність контейнера разом із стабілізованим джерелом нагріву забезпечували його температурний режим на рівні 384 ± 2 К протягом часу вимірів. Особливістю наших експериментів є те, що, крім прямої детекції утворених іонів цитозину, аналізували кількість молекул, які не вступали у взаємодію з електронами. Такі молекули, пройшовши камеру зіткнень, осідали на дні колектора, охолодженого рідким азотом, утворюючи з часом помітний слід — конденсат. За масою конденсату і часом його утворення визначали інтенсивність молекулярного пучка і відповідно його концентрацію.

Геометричні розміри конденсату та його відстань до ефузійного джерела використовували для визначення параметрів пучка — перерізу області зіткнення та кутової апертури. Час утворення конденсату у п'яти дослідах змінювали в межах $(1 \div 3) \cdot 10^3$ с.

Джерелом електронів служила п'ятиелектродна гармата з катодом, виготовленим з торованого вольфраму. Виміри проводили при силі струму пучка електронів $\sim 1 \cdot 10^{-6}$ А і енергетичній неоднорідності електронів на піввисоті їхнього енергетичного розподілу $\Delta E_{1/2} \sim 0,3$ еВ. Електронну гармату розміщували у поздовжньому магнітному полі з індукцією $B = 1,2 \cdot 10^{-2}$ Тл. Енергетичну шкалу електронів калібрували за положенням резонансного піку утворення іонів SF_6^- .

Для повного збирання іонів, утворених в області перетину пучків, на шляху молекулярного

пучка встановлювали прохідний колектор, всередині якого містився електрод (зонд) з потенціалом 25 В. Магнітне поле унеможливило попадання на зонд електронів, розсіяних на молекулах цитозину та поверхнях електродів. Система управління і реєстрації складалася з електрометричного підсилювача типу В7-30 з чутливістю $1 \cdot 10^{-14}$ А (для вимірювання струму утворених іонів), блоку перетворення струм—частота (для електронного пучка), блоку дискретної розгортки прискорювального потенціалу електронного пучка, персонального комп'ютера типу IBM-PC-AT з інтерфейсною картою РІО-3232.

Результати і обговорення. Експериментальні виміри проводили в три етапи. На першому — апробували методики досліджень і контрольні досліди. Для цього камеру зіткнень за допомогою прецизійної системи напуску наповнювали газом SF_6 до тиску $\sim 1 \cdot 10^{-5}$ Тор і реєстрували резонанс для процесу утворення іонів SF_6^- . Положення цього резонансу використовували для калібрування енергетичної шкали електронів, а його ширину — для знаходження величини $\Delta E_{1/2}$. На другому етапі при вакуумі $\sim 5 \cdot 10^{-8}$ Тор вимірювали енергетичні залежності перерізів утворення негативних іонів цитозину. При відсутності пучка молекул цитозину детально аналізували шумовий внесок іонізації залишкового газу, який при вимірах становив $\sim 2\%$. На третьому етапі визначали абсолютні величини перерізів утворення негативних іонів цитозину використанням співвідношення

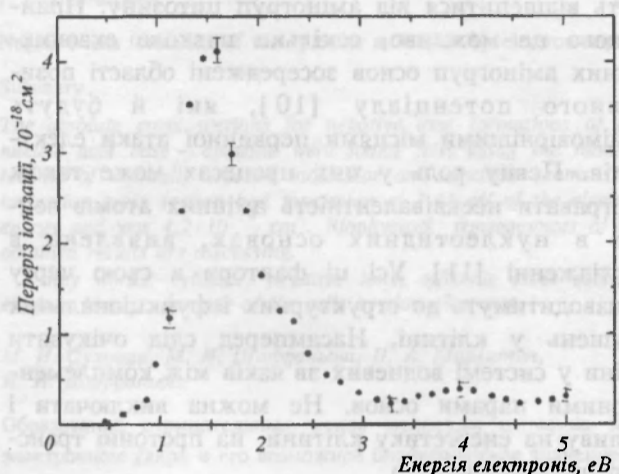
$$Q = i/i_e Nl, \quad (1)$$

де Q — повний переріз утворення негативних іонів молекул цитозину; i — сила струму негативних іонів; i_e — сила струму електронного пучка; N — концентрація молекул цитозину в області перетину пучків; l — шлях електронів у молекулярному пучку. Величини струмів i та i_e визначали електронними, а шлях l — за геометрією молекулярного пучка. У свою чергу, маса конденсату M залежала від параметрів експерименту наступним чином:

$$M = NSmvt, \quad (2)$$

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

У результаті проведених експериментів був виявлено утворення негативних іонів цитозину і



Залежність абсолютного перерізу утворення негативних іонів цитозину у вакуумі від енергії налітаючих електронів (похибка по осі ординат становить 9 %)

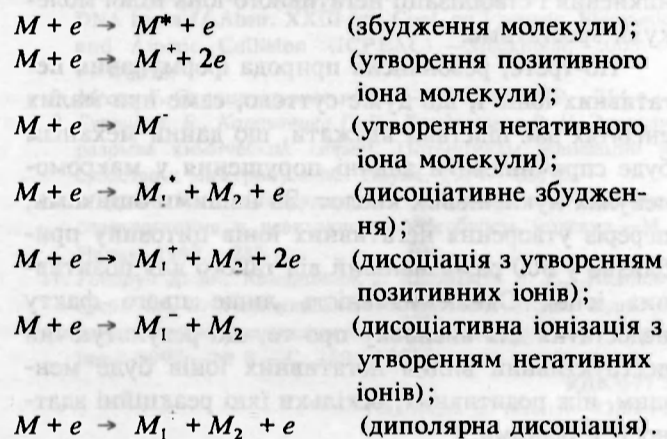
взаємодії його молекул з електронним пучком. Вперше вдалося експериментально виміряти абсолютні величини повних ефективних перерізів для негативних іонів цитозину в області енергій електронів від 0,4 до 5 еВ. Отримані результати наведено на рисунку, з яких випливає, що процес утворення від'ємних іонів цитозину має резонансний характер з його максимальним проявом при енергії електронів 1,5 еВ. Відмітимо, що порогові значення енергій збудження і утворення позитивних іонів молекул нуклеотидних основ, а також максимуми відповідних функцій іонізації спостерігаються при більших енергіях [2, 3].

Окремо варто зупинитися на абсолютній величині перерізу утворення негативних іонів цитозину. Максимальне значення цього перерізу, за нашими вимірами, становить $4,2 \cdot 10^{-18} \text{ см}^2$. Це означає, що при попаданні електрона в молекулярну мішень з такою площею перерізу обов'язково відбудеться елементарний акт взаємодії, наслідком якого буде утворення негативних іонів. Вимірний ефективний переріз має зміст повного перерізу, тобто включає в себе перерізи утворення негативних іонів як цілої молекули, так і її фрагментів (так звані парціальні перерізи). Зауважимо, що наведено у роботі [7] значення перерізу утворення негативних іонів цитозину дає на два порядки більші величини. Оскільки, на відміну від [7], у наших дослідженнях безпосередньо визначали кон-

центрацію молекул у молекулярному пучку, а інші деталі методики є надійно апробованими [6], то ми вважаємо, що дані, подані в роботі [7], є завищеними.

Відкритим залишається питання про роль негативних іонів у біоструктурах. Однак виходячи з фундаментальних фізичних закономірностей і базуючись на отриманих нами результатах, можна прогнозувати кілька основних напрямків перебігу процесів.

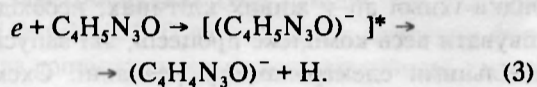
По-перше, з'ясовуючи механізми виникнення негативних іонів у біомолекулах і можливі наслідки їхньої дії у живих клітинах, необхідно враховувати весь комплекс процесів, які запускаються повільними електронами у речовині. Схематично сукупність основних фізичних процесів з участю молекули M у непружних взаємодіях з електроном e можна зобразити таким чином:



Можливі і складніші перетворення. Наприклад, крім збуджених та іонізованих продуктів, можуть формуватися і нейтральні фрагменти, які досить важко ідентифікувати. Як правило, в експериментах для вивчення збуджених молекул використовують оптичні методи, а іонізацію досліджують за допомогою електричних методів. Відмітимо, що вищезазначені процеси протікають практично одночасно, з великими швидкостями і з різними ймовірностями.

По-друге, відповідно до загальних фізичних уявлень [8], при малих концентраціях взаємодіючих частинок практично неможливе утворення помітних кількостей негативних іонів цілих молекул. Така ситуація буде мати місце і в наших експериментах, де реалізується газовий стан молекул. Енергетична стабілізація негативних молекулярних іонів імовірна лише за рахунок їхніх зітк-

нень з частинками третього типу. Тому утворений негативний іон цілої молекули, який, за законами збереження, повинен знаходитися у збудженому стані (електронному чи коливному), буде, швидше за все, дисоціювати на нейтральний і заряджений фрагменти. В області малих енергій налітаючих електронів, як у нашому випадку, найвірогіднішими незарядженими фрагментами можуть бути атоми водню, які мають найменшу величину енергії зв'язку в піримідиновому кільці молекули цитозину [9]. Таким чином, формування негативних іонів буде протікати у дві стадії:



Однак при великих концентраціях частинок (наприклад, в умовах живої клітини) ймовірність виникнення і стабілізації негативного іона цілої молекули зростатиме.

По-третє, резонансна природа формування негативних іонів і, що дуже суттєво, саме при малих енергіях дає підстави вважати, що даний механізм буде спричинювати значні порушення у макромолекулах нуклеїнових кислот. За нашими оцінками, переріз утворення негативних іонів цитозину приблизно у 500 разів менший від такого для позитивних іонів. Однак наявність лише цього факту недостатня для висновку про те, що результуючий деструктивний вплив негативних іонів буде меншим, ніж позитивних, оскільки їхні реакційні здатності є різними.

По-четверте, потрібно врахувати, що в результаті непружних взаємодій повільних електронів з молекулами можливе (на відміну від фотопроцесів) пряме збудження метастабільних триплетних станів. Можна припустити, що саме через такі довшоїснуючі збуджені стани створюються умови для резонансного формування негативних іонів. Пряме утворення триплетних збуджених станів молекул цитозину і свічення збуджених молекулярних іонів показані в наших попередніх роботах, наприклад у [2]. Таким чином, пояснюючи конкретні експериментальні результати, необхідно зважати на внесок багатьох каналів.

І, накінець, важливим є те, що із співвідношення (3) випливає, що в клітині низькоенергетичні електрони будуть продукувати, крім негативних іонів цитозину та його фрагментів, ще й атомарний водень. Первинна локалізація атомів

водню невідома, але не виключено, що вони можуть відщепитися від аміногруп цитозину. Принципово це можливо, оскільки навколо екзоциклічних аміногруп основ зосереджені області позитивного потенціалу [10], які й будуть найімовірнішими місцями первинної атаки електронів. Певну роль у цих процесах може також відігравати нееквівалентність аміних атомів водню в нуклеотидних основах, виявлена в дослідженні [11]. Усі ці фактори в свою чергу призводитимуть до структурних і функціональних зрушень у клітині. Насамперед слід очікувати зміни у системі водневих зв'язків між комплементарними парами основ. Не можна виключати і впливу на енергетику клітини, на протонні транспортні системи тощо.

Таким чином, моделювання процесів у клітині за рахунок зміни умов фізичного експерименту дозволяє забезпечити моноенергетичність співударів електронів з біомолекулами у широкому діапазоні енергій (від порогу процесу до сотень еВ). Реалізуючи методику перетину пучків частинок, реально також досягти однократності та контактності взаємодій. Такий підхід дає змогу визначити абсолютні значення важливих фізичних параметрів, які водночас є об'єктивними біофізичними характеристиками, що дозволяє зробити не лише якісну, але й об'єктивну кількісну оцінку процесів, які відбуваються у біомолекулах. Для глибшого розуміння вищезгаданих механізмів слід отримати дані щодо перебігу процесів та абсолютні перерізи іонізації і для інших нуклеотидних основ.

Висновки. За допомогою розробленої авторами методики вивчено процеси утворення негативних іонів азотистих основ нуклеїнових кислот при взаємодії з повільними монохроматичними електронами. Вперше у прямому експерименті визначено абсолютний переріз утворення негативних іонів молекул цитозину в області енергій електронів 0,4—5,0 еВ: максимальна його величина спостерігається при енергії електронів 1,5 еВ і дорівнює $4,2 \cdot 10^{-18}$ см². Показано, що основний внесок у переріз робить процес дисоціативної іонізації. Обговорюється можливе біофізичне значення отриманих результатів. Так, відмічено, що внаслідок резонансного механізму формування негативних іонів цитозину і саме при малих електронних енергіях очікуються найімовірніші порушення у макромолекулах нуклеїнових кислот.

M. I. Sukhoviya, M. I. Shafranyosh, M. O. Margitich,
I. I. Shafranyosh

Negative ions formation of the cytosine molecule by electron impact

Summary

The absolute cross sections for negative ions formations of the nucleic acid base — cytosine were found first using the modern technic of normally crossed molecular and electron beams. The ionization cross section had maximum at 1,45 eV of the electron energy and was $4,2 \cdot 10^{-22}$ cm². Biophysical consequences of the obtained results are discussing.

Key words: cytosine, negative ions, effective cross section, electron impact, damage of the cells by slow electrons.

М. И. Суховия, М. И. Шафранюш, Н. А. Маргитич,
И. И. Шафранюш

Образование отрицательных ионов молекулы цитозина при электронном ударе и его возможное биофизическое значение

Резюме

Оригинальным методом пересекающихся электронного и молекулярного пучков впервые получены данные по абсолютным величинам сечений образования отрицательных ионов канонического нуклеотидного основания — цитозина. Показано, что максимальных значений сечение образования отрицательных ионов достигает при энергии налетающих электронов 1,5 эВ и его абсолютная величина составляет $4,2 \cdot 10^{-22}$ см². Обсуждается возможное биофизическое значение полученных результатов.

Ключевые слова: цитозин, отрицательные ионы, эффективное сечение, электронный удар, повреждение клеток медленными электронами.

PERELIK LITERATURY

1. Суховия М. И., Шафранюш И. И. О возбуждении азотистых оснований нуклеиновых кислот низкоэнергетическими электронами // Механизмы радиационного пораже-

ния и восстановления нуклеиновых кислот.—Пушино-на-Оке, 1980.—С. 51.

2. Суховия М. И., Славик В. Н., Шафранюш И. И., Шимон Л. Л. Особенности взаимодействия молекул оснований нуклеиновых кислот с электронами малых энергий // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 6.—С. 77—82.
3. Sukhoviya M. I., Shafranyosh M. I., Shafranyosh I. I. Spectral investigation of the electron-impact excitation of the nucleic acid base molecules // Spectroscopy of biological molecules: New directions.—Dordrecht etc.: Kluwer Acad. publ., 1999.—P. 281—282.
4. Afatoon K., Gallup G. A., Burrow P. D. Electron attachment energies of the DNA bases // J. Phys. Chem. A.—1998.—102.—P. 6205—6207.
5. Hanel G., Gstir B., Denifl S., Scheier P., Probst M., Farizon B., Farizon M., Hlenberger E., Mark T. D. Electron attachment to uracil: Effective destruction at subexcitation energies // Phys. Rev. Lett.—2003.—90.—P. 188104-1—188104-4.
6. Shafranyosh I. I., Margitich M. O. Electron-impact ionization cross section for metastable Ca atoms // J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.—2000.—33.—P. 905—910.
7. Denifl S., Hanel G., Gstir B., Probst M., Ptasinska S., Hlenberger E. Site selective electron attachment to RNA and DNA bases // Abstr. XXIII Int. Conf. on Photonic, Electronic and Atomic Collision (ICPEAC).—Stockholm, 2003.—P. We096.
8. Мессе Г. Отрицательные ионы.—М.: Мир, 1979.—754 с.
9. Гурвич Л. В., Карачевцев Г. В., Кондратьев В. Н. Энергии разрыва химических связей. Потенциалы ионизации и сродство к электрону.—М.: Наука, 1974.—351 с.
10. Морозов Ю. В., Бажулина Н. П. Электронное строение, спектроскопия и реакционная способность молекул.—М.: Наука, 1989.—288 с.
11. Говорун Д. М., Кондратьюк І. В., Міщук Я. Р., Желтовський М. В. Нееквівалентність аміних атомів водню в канонічних нуклеотидних основах // Доповіді НАН України.—1995.—№ 8.—С. 130—132.

УДК 577.3

Надійшла до редакції 22.03.05