

membrane surface due to «diffusion» interaction between single channels regarded as bystable functional elements of the whole system, were investigated. The possibility of control over the spatial structures of a cellular membrane was demonstrated.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гайдидей Ю. Б., Харкянен В. Н., Чинаров В. А. Синергетическая модель функционирования потенциалозависимых ионных каналов в биомембранах.— Киев, 1988.— 40 с. (Препринт / АН УССР. Ин-т теор. физики; № 123Р).
2. Гайдидей Ю. Б., Харкянен В. Н. Нелинейные эффекты электронного транспорта в биомолекулярных системах.— Киев, 1988.— 32 с.— (Препринт / АН УССР. Ин-т теор. физики; № 130Р).
3. Описание функционирования потенциалонаправляемого ионного канала на основе неконформационного взаимодействия / Ю. Б. Гайдидей, И. С. Магура, Н. В. Пивоварова и др. // Биол. мембраны.— 1991.— 8, № 3.— С. 330—338.
4. Николис Г., Пригожин И. Самоорганизация в неравновесных системах.— М.: Мир, 1979.— 512 с.
5. Хакен Г. Синергетика. Иерархия неустойчивостей в самоорганизующихся системах и устройствах.— М.: Мир, 1985.— 419 с.
6. Николис Дж. Динамика иерархических систем.— М.: Мир, 1989.— 486 с.

Межотрасл. науч.-инж. центр по физике живого
и микроволн. резонанс. терапии «Відгук» при СМ УССР,
Киев

Получено 15.04.91

УДК 577.32:539.196

М. И. Суховия, В. Н. Славик, И. И. Шафраньош, Л. Л. Шимон

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОЛЕКУЛ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ЭЛЕКТРОНАМИ МАЛЫХ ЭНЕРГИЙ

Оптическим и масс-спектрометрическим методами исследованы процессы возбуждения, ионизации и диссоциации молекул цитозина в газовой фазе медленными монокинетическими электронами в диапазоне энергий от 0 до 300 эВ. Получены спектры люминесценции цитозина и продуктов его диссоциативного возбуждения в области от 200 до 600 нм. Измерены функции возбуждения молекул. Обсуждаются возможные применения полученных результатов в биофизике и радиобиологии.

Введение. Известно, что в реализации первичных физических стадий различных биологических процессов, таких как биоэнергетические преобразования, синтез биомолекул, радиобиологические реакции, канцерогенез, важную роль играют возбужденные, в частности метастабильные, и ионные состояния молекул биополимеров [1—3]. Азотистые основания нуклеиновых кислот — удобный модельный объект для изучения этих характеристик биомолекул. Эффективным способом передачи молекулярным системам определенных количеств энергии от 0 до 20 эВ, т. е. в области, где находятся нижние синглетные и триплетные возбужденные уровни и потенциалы ионизации оснований, является использование монокинетического пучка низкоэнергетических электронов. В таких экспериментах в отличие от фотовозбуждения можно получить информацию не только об оптически разрешенных переходах между состояниями электронной системы молекул, но и об интеркомбинационных переходах, в результате которых могут эффективно образовываться метастабильные триплетные состояния молекул [4]. Медленные электроны представляют интерес и в связи с тем, что они составляют большую часть (более 90 %, согласно [5]) вторичных электронов, возникающих при взаимодействии излучения разных видов с веществом.

© М. И. СУХОВИЯ, В. Н. СЛАВИК, И. И. ШАФРАНЬОШ, Л. Л. ШИМОН, 1991

Нами проведена апробация данного подхода в экспериментах по возбуждению и ионизации электронным ударом пуринового азотистого основания — аденина [6]. В настоящем сообщении представлены результаты оптических и масс-спектрометрических исследований процессов взаимодействия молекул пиримидинового основания (цитозина) с монокинетическими пучками электронов малых энергий (0—300 эВ).

Материалы и методы. В работе использовали препараты оснований нуклеиновых кислот фирмы «Reanal» (ВР). Для исключения влияния среды и межмолекулярных взаимодействий опыты проводили со свободными молекулами в газовой фазе. Возбуждение и ионизация молекул цитозина осуществлялись в пересекающихся молекулярном и электронном пучках.

Экспериментальная установка состояла из следующих основных узлов: источников молекулярного и электронного пучков, камеры столкновений, системы вакуумной откачки, системы детектирования фотонов и ионов. Подробное описание методики и техники эксперимента приведено в [7]. Для получения молекул в газообразном состоянии препарат нагревали до 383 К в специальном тигле с помощью танталовой спирали. Формирование молекулярного пучка осуществлялось системой щелей. Угол раствора пучка 7° . Источником монокинетических электронов служила трехэлектродная электронная пушка с оксидным подогретым катодом. Плотность тока электронного пучка составляла 3 мА/см^2 , энергетическая неоднородность электронов — 0,7 эВ. Сечения возбуждения эмиссии молекулярных полос определяли оптическим методом [8]. Энергетические зависимости сечения возбуждения (так называемые функции возбуждения) находили из соотношения $Q = I/i_e$; где I — интенсивность излучения молекулярной полосы в максимуме; i_e — сила тока электронного пучка. Погрешность в определении величины $Q \sim 7\%$. В этой серии экспериментов относительно низкие интенсивности излучения в припороговой области энергий, обусловленные конструкцией применяемой электронной пушки, не дали возможности надежно определить значения пороговых энергий процессов. Образовавшиеся в камере столкновений ионы улавливались цилиндром Фарадея с последующей их регистрацией.

Масс-спектрометрические исследования оснований проводили на установке, включающей масс-спектрометр МИ-1201 и источник ионов типа Нура, по методике, описанной в [9]. Образовавшиеся в результате электронного удара ионы выводили из камеры столкновений, анализировали по отношению массы к заряду и регистрировали ВЭУ-1. Путем изменения температуры в тигле, давления в камере, а также энергии налетающих электронов были подобраны оптимальные условия для масс-спектрометрии данного препарата ($T = 383 \text{ К}$, $P = 1,07 \text{ мПа}$, $E = 100 \text{ эВ}$).

Результаты и обсуждение. Как известно [8], при взаимодействии электронов определенной энергии с молекулами могут происходить такие основные физические процессы: упругое рассеяние, возбуждение, ионизация, рекомбинация и диссоциация. Мерой вероятности того, что при данных условиях реализуется какой-либо процесс, служит эффективное сечение Q данного процесса. Оно зависит от рода взаимодействующих частиц, типа реакции и энергии столкновения. Переход возбужденных молекул в основное состояние сопровождается высвечиванием квантов света определенной частоты.

В данной работе экспериментально получены спектры излучения (люминесценции) препарата цитозина в области от 200 до 600 нм при различных заданных энергиях налетающих электронов. В спектрах можно выделить несколько широких молекулярных полос, интенсивности и форма которых зависели от энергии электронов. Типичный спектр для энергии электронов $E = 100 \text{ эВ}$ приведен на рис. 1. Видно, что наиболее интенсивные полосы имеют максимумы при 290,6; 392,2; 328,3; 340,5; 429,3; 356,7; 316,8 нм. Полоса с максимумом при длине

волны $\lambda_m = 290,6$ нм оставалась наиболее интенсивной и при энергии электронов 300 эВ.

Нами исследованы энергетические зависимости относительных сечений возбуждения (функции возбуждения) излучения при энергиях электронов от 0 до 300 эВ для десяти полос. Функции возбуждения для разных полос отличались как по виду, так и по величине пороговых энергий, что может служить предварительным указанием на различие в механизмах образования соответствующих возбужденных

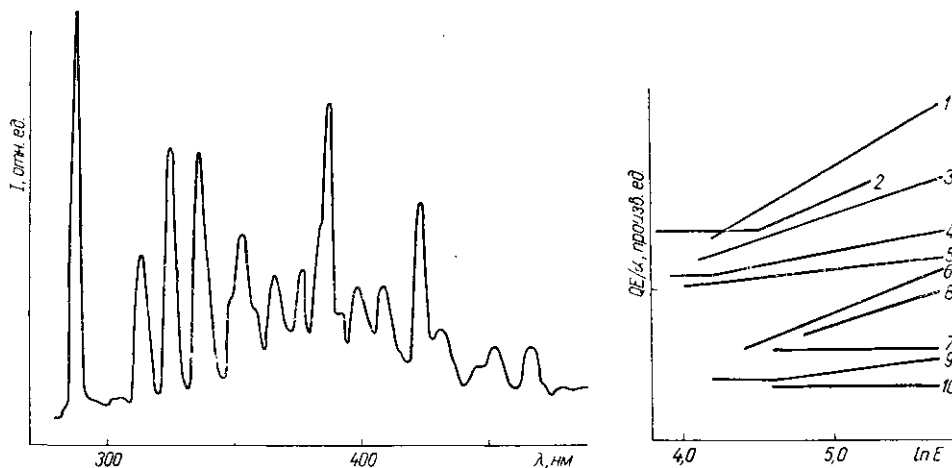


Рис. 1. Спектр люминесценции препарата цитозина при энергии электронов 100 эВ

Рис. 2. Линейные анаморфозы функций возбуждения молекулярных полос с максимумами при 290,6 (1); 316,8 (2); 328,3 (3); 340,5 (4); 356,7 (5); 370,9 (6); 381,2 (7); 392,2 (8); 415,5 (9); 429,3 нм (10)

состояний. Для выяснения этого вопроса проведен качественный анализ функций возбуждения в приближении Бете—Борна с использованием зависимостей Фано [10]. Он основывается на том, что сечения процессов возбуждения оптически разрешенных (Q) и оптически запрещенных переходов (Q') описываются различными зависимостями от энергии электронов. В первом случае

$$Q = \frac{4\pi a_0^2 R}{E} M^2 \ln CE,$$

где a_0 — радиус атома водорода в основном состоянии (по Бору); R — постоянная Ридберга; E — энергия возбуждающих электронов; C — постоянная, связанная со свойствами молекулы; M — матричный элемент дипольных переходов. Во втором случае $Q = \beta/E$, где β — величина, зависящая от обобщенной силы осцилляторов. Однако следует иметь в виду, что данные соотношения можно использовать, лишь начиная с энергий, равных нескольким значениям пороговой. При выполнении этого условия функции возбуждения, представленные в координатах QE/α от $\ln E$, где α — постоянная для данной молекулы или фрагмента, для оптически разрешенных переходов будут иметь вид прямой с положительным наклоном, а для оптически запрещенных — прямой с нулевым наклоном.

Линейные анаморфозы экспериментально полученных в нашей работе функций возбуждения приведены на рис. 2. Видно, что имеют место оба механизма возникновения эмиссии молекул, а также их суперпозиция (например, анаморфозы 2, 4, 9, рис. 2). Однако, основываясь только на этих данных, нельзя сделать вывод о природе излучателей — целые молекулы или их фрагменты и какие именно. Для выяснения этого вопроса проведены масс-спектрометрические исследования данных препаратов.

Анализ масс-спектров, полученных в этом же диапазоне энергий электронов и при близких других экспериментальных условиях, показал, что в результате электронного удара образуются как ионы целой молекулы цитозина, так и ионы ее фрагментов. Наиболее интенсивные линии масс-спектра цитозина при энергии электронов 100 эВ и соответствующие им ионы приведены в таблице. Как видно, самая интенсивная линия (отношение массы m к заряду e равно 111) соответствует молекулярному иону цитозина. Наблюдаются также ионы молекулы без одной из боковых групп (NH_2 или CO) и ион пиримидинового кольца. С увеличением энергии электронов увеличивается выход диссоциативных процессов, приводящих к образованию различных молекулярных фрагментов. Низкомолекулярные ионы типа CN , CN_2 , NH , CN , CNH также присутствовали, однако в незначительных количествах. В отличие от масс-спектров оснований, полученных методом полевой масс-спектрометрии [11], ассоциаты молекул цитозина нами не наблюдались. Лишь при достаточно высоких температурах появлялась линия, соответствующая $m/e=112$. При определенных экспериментальных условиях замечено образование двукратного иона молекулы.

Характеристики масс-спектра цитозина

m/e	Интенсивность, отн. ед. ($E=100$ эВ)	Ион	m/e	Интенсивность, отн. ед. ($E=100$ эВ)	Ион
111	1,00	$\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O}$	42	0,30	CNO , CN_2N_2
95	0,20	$\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_3\text{O}$, $\text{C}_4\text{N}_3\text{H}_5$	41	0,49	CHN_2 , $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$
83	0,22	$\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2\text{O}$, $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_3$	40	0,36	$\text{C}_2\text{H}_2\text{N}$
69	0,41	$\text{C}_3\text{H}_3\text{NO}$, $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_2$	28	0,48	CO , CH_2N
67	0,29	C_3HNO , $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2$	16	0,30	NH_2 , O

Основываясь на данных масс-спектрометрии, можно провести предварительный анализ спектров излучения цитозина. Как видно, полученные нами спектры люминесценции молекул, возбуждаемых электронным ударом, заметно отличаются по форме и количеству полос от спектров при фотовозбуждении [12—14]. Эти различия естественны, поскольку мы наблюдаем, кроме свечения целой молекулы, и люминесценцию ее фрагментов. В структуру спектра вносит свои особенности и агрегатное состояние исследуемого объекта — пленки в [12, 13], замороженные растворы в [14] (когда проявляются межмолекулярные взаимодействия) и свободные молекулы в газообразном состоянии в нашем случае. Для полной идентификации наблюдаемых полос в спектре излучения цитозина необходимо провести дополнительные исследования, а именно: точное измерение пороговых энергий возникновения эмиссий (в настоящее время идет апробация созданной для этих целей модифицированной электронной пушки), а также сравнение спектров химически близких соединений, в первую очередь других пиримидиновых оснований, полученных в таких же экспериментальных условиях. Однако на основе нашего экспериментального материала, приняв во внимание данные по электронным спектрам молекул и энергиям связей [15—17], уже сейчас можно сделать определенные предположения. Видно, что некоторые полосы, например, с $\lambda_m=316,8$; 340,5; 415,5 нм отражают суперпозицию нескольких процессов. Так, в возникновение полосы с $\lambda_m=316,8$ нм могут вносить вклад два процесса: высвечивание пиримидинового кольца, переход $\tilde{A}-\tilde{X}$ и иона CO^+ , резонансный переход $\text{V}^2\Sigma-\text{V}^2\Sigma$. Свечение группы CN может наблюдаться в области около 380 нм (переход $\text{V}^2\Sigma-\text{A}^2\Pi$), а иона CN^+ — вблизи 328 нм (переход $\text{e}^1\Sigma-\text{a}^1\Sigma$). В этой же области излучает группа NCN (переход $^3\Pi_u-\text{V}^2\Sigma_g^-$). Полоса с $\lambda_m=415,1$ нм может формироваться за счет переходов $\text{V}^1\Sigma-\text{A}^1\Pi$ и $\tilde{A}-\tilde{X}$ групп CO и N_2CN_2 соответственно, а также за счет фосфоресценции пиримидинового кольца. Группа HNCHN может при-

нимать участие в образовании полосы с $\lambda_m = 356,7$ нм (переход $\tilde{A} - \tilde{X}$), а SNC — полос, имеющих максимумы при 370,9 и 381,2 нм (переходы ${}^2\Sigma - {}^2\Pi$; ${}^2\Delta - {}^2\Pi$). Фрагмент C_2H_3N , количество которого по данным масс-спектрометрии относительно большое, не участвует в формировании спектра в данной области, поскольку его люминесценция находится в вакуумном ультрафиолете. Полосы в области 340—360 нм, вероятно, принадлежат молекуле цитозина или пиримидиновому кольцу с одной боковой группой, а выше 420 нм — можно ожидать их фосфоресценцию с метастабильных триплетных состояний. Интерес представляет наиболее интенсивная в спектре полоса, находящаяся в коротковолновой области ($\lambda_m = 290,6$ нм). Учитывая ее положение в спектре и распределение интенсивностей в масс-спектрах, можно предположить, что она образовывается за счет молекул цитозина или их ионов. Не исключено также, что спектр люминесценции молекул цитозина в газовой фазе может иметь ультраструктуру с несколькими максимумами в области около 290—360 нм, как это показано в [18] для некоторых гетероциклических соединений. Однако более полный ответ могут дать лишь дополнительные исследования, в первую очередь, измерение пороговых энергий.

Таким образом, при взаимодействии монокинетических электронов, энергия которых изменяется от 0 до 300 эВ, с молекулами цитозина в зависимости от энергии электронов будет происходить с большей эффективностью тот или иной физический процесс. Учитывая данные по электронным состояниям оснований нуклеиновых кислот и спектрам энергетических потерь [19—21], можно ожидать в диапазоне от нескольких до десяти электронвольт возбуждение $\pi - \pi^*$ и $n - \pi^*$ -переходов электронов пиримидинового кольца с заселением как синглетных, так и триплетных уровней молекул. В этой же области находится первый потенциал ионизации цитозина (8,9 эВ, согласно [20]). Выше 10 эВ включается процесс фрагментации молекул основания, возбуждение и ионизация фрагментов. Около 20 эВ наиболее вероятны переходы типа $\sigma - \sigma^*$ с образованием сверхвозбужденных состояний и прямая ионизация молекул. При энергиях электронов выше 200 эВ начинаются процессы возбуждения К-оболочки атомов и ионизация атомов углерода. На некоторых измеренных нами функциях возбуждения около 150 эВ имеется второй, достаточно интенсивный максимум, однако о природе его пока ничего нельзя сказать.

Следует еще раз подчеркнуть, что данные физические процессы будут иметь место и при взаимодействии медленных (вторичных) электронов с молекулами нуклеиновых кислот в живых клетках. В конечном итоге они могут приводить к структурным изменениям нуклеотидных оснований, вызывающим деградацию нуклеиновых кислот и мутации.

Резюме

Оптичним та мас-спектрометричним методами досліджено процеси збудження, іонізації та дисоціації молекул цитозину в газовій фазі повільними монокинетичними електронами в діапазоні енергій від 0 до 300 еВ. Одержано спектри люмінесценції цитозину та продуктів його дисоціативного збудження в області від 200 до 600 нм. Виміряно функції збудження молекул. Обговорюється можливе використання одержаних результатів в біофізиці та радіобіології.

Summary

Electron impact excitation, ionization and dissociation of gas-phase cytosine molecules were studied by optical and mass-spectrometric methods in the energy range of 0 to 300 eV. The luminescence spectra of cytosine and its dissociative excitation products were obtained within the region of 200 to 600 nm. Excitation functions for molecules in question were measured. Possible biophysical and radiobiological applications of the obtained results are discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fielden E. M., Lillicrap S. C. Excited states and energy transfer in biomolecular systems // *Curr. Top. Radiat. Res.*—1974.—7.—P. 138—180.
2. Ladic J., Suhai S., Seel M. Electronic structure of biopolymers and possible mechanisms of chemical carcinogenesis // *Int. J. Quant. Chem.*—1978.—N 5.—P. 35—49.
3. Грибова Э. П., Каюшин Л. П. ЭПР триплетного возбужденного состояния биологически важных молекул // *Успехи химии.*—1972.—41, № 2.—С. 287—293.
4. Kupperman A., Raff L. M. Excited states produced by low energy electrons // *Phys. processes in radiat. biol.* / Ed. G. G. Augenstein.—New York: Acad. press, 1964.—P. 161—182.
5. Чердэби А. Ядерные излучения и полимеры.—М.: Наука, 1962.—290 с.
6. Суховия М. И., Шафраньш И. И., Запесочный И. П. Возбуждение молекул аденина электронами // IX Всесоюз. конф. по физике электрон. и атом. столкновений: Тез. докл.—Рига, 1984.—Ч. 2.—С. 63.
7. О возбуждении висмута электронным ударом / И. И. Шафраньш, Б. П. Стародуб, Т. А. Шишова, И. С. Алексахин // *Оптика и спектроскопия.*—1981.—50, № 4.—С. 658—662.
8. Фриш С. Э. Оптические спектры атомов.—М.: Физматгиз, 1963.—640 с.
9. Масс-спектрометрические исследования оснований нуклеиновых кислот / С. Е. Волкова, В. Н. Славик, М. И. Суховия и др. // Всесоюз. конф. по применению масс-спектрометрии в биологии и медицине: Тез. докл.—Харьков, 1989.—С. 109—110.
10. Fano U. Collective effects in absorption of energy from ionising radiation // *Comparative effects of radiation.*—New York: Wiley, 1961.—P. 14—21.
11. Суходуб Л. Ф. Масс-спектрометрические исследования взаимодействия и гидратации нуклеотидных оснований в вакууме // *Биофизика.*—1987.—32, № 6.—С. 994—1005.
12. Виноградов И. П., Земских В. В., Додонова Н. Я. Спектры поглощения оснований нуклеиновых кислот (110—300 нм) и их люминесценция, возбуждаемая в вакуумно ультрафиолетовой области // *Оптика и спектроскопия.*—1974.—36, № 3.—С. 596—599.
13. Investigations of the excited states of nucleic acid bases in thin films / V. Prosser, E. Subertová, E. Silinsh, F. Zaloudek // *Stud. Biophys.*—1973.—39, N 2.—P. 113—122.
14. Об ультрафиолетовой флуоресценции нуклеиновых кислот и полифосфатов / Л. С. Агроскин, Н. В. Королев, И. С. Кулаев, М. Н. Мейсель // *Докл. АН СССР.*—1960.—131, № 6.—С. 1440—1443.
15. Pearse R. W., Gaydon A. G. The identification of molecular spectra.—London: Chapman, 1963.—562 p.
16. Герцберг Г. Электронные спектры и строение многоатомных молекул.—М.: Мир, 1969.—772 с.
17. Энергии разрыва химических связей. Потенциалы ионизации и сродство к электрону / Л. В. Гурвич, Г. В. Карачевцев, В. Н. Кондратьев и др.—М.: Наука, 1974.—351 с.
18. Борисевич К. А. Возбужденные состояния сложных молекул в газовой фазе.—Минск: Наука и техника, 1967.—360 с.
19. Желтовский Н. В., Данилов В. И. Квантовомеханическое изучение УФ-спектров поглощения нуклеотидных оснований // *Биофизика.*—1974.—19, № 5.—С. 784—789.
20. Isaacson M. C. The energy loss of fast electrons in biological molecules // *Radiat. Res.*—1975.—62, N 3.—P. 547—551.
21. Johnson D. E. The interaction of 25 keV electrons with guanine and cytosine // *Ibid.*—1972.—49, N 1.—P. 63—84.
22. Lifschitz Ch., Bergmann E. D., Pullman B. The ionization potentials of biological purines and pyrimidines // *Tetrahedron Lett.*—1967.—N 46.—P. 4573—4586.

Ужгород. гос. ун-т

Получено 15.04.91