

РЕЗОНАНСНЕ УТВОРЕННЯ НЕГАТИВНИХ ІОНІВ МОЛЕКУЛ УРАЦИЛУ

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

Ужгородський національний університет, 88000, Ужгород, вул. Волошина, 54

Методом електронного та молекулярного пучків, що перетинаються, вперше отримані дані про абсолютні величини перерізів утворення негативних іонів азотистої основи нуклеїнових кислот – урацилу. Показано, що максимальних значень переріз утворення негативних іонів досягає при енергії бомбардуючих електронів 1.1 eV, і його абсолютна величина становить $5.0 \cdot 10^{-18} \text{ см}^2$. Обговорюються біофізичні наслідки отриманих результатів.

Вступ

Експериментальне вивчення процесів непружних взаємодій біомолекул з повільними електронами зумовлене, в першу чергу, важливістю проблеми внутріклітинного опромінення біоструктур вторинними електронами, які утворюються у значній кількості в речовині при дії випромінювання різних видів. У зв'язку з цим стає актуальним фізичне моделювання клітинних іонізаційних процесів умовами лабораторного експерименту, при яких 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 розпочаті авторами даної статті ще у 80-х роках минулого століття [1]. В подальших наших експериментах [2,3] показано, що внаслідок електронного удару в біомолекулах протікають різні фізичні процеси: збудження, іонізація, дисоціативне збудження та дисоціативна іонізація, оцінено ймовірності кожного із процесів при різних енергіях електронів. В останні роки кілька закордонних дослідницьких груп також долучилися до вивчення електрон-молекулярних взаємодій, приділяючи основну увагу резонансним явищам [4, 5].

Важлива кількісна характеристика процесу іонізації молекул – ефективний

переріз іонізації, який визначає ймовірність процесу утворення іонів при конкретних умовах. В літературі наявні суперечливі дані про абсолютні величини перерізів іонізації молекул нуклеотидних основ повільними електронами. В 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 про біофізичне значення негативних іонів. Пряме експериментальне визначення величин абсолютних перерізів утворення негативних іонів молекул урацилу електронним ударом та їх залежностей від енергії бомбардуючих електронів є метою даного дослідження.

Експериментальна установка та методика досліджень

Основою експерименту є методика пучків електронів та молекул, що перетинаються, яка була успішно застосована раніше [6]. Пучок молекул урацилу (див. рис. 1) отримується за допомогою термічного ефузійного джерела багатоканального типу та системи колімуючих щілин. Складовими частинами ефузійного джерела є наступні: мідний контейнер з препаратом урацилу, резистивний нагрівник контейнера, прокалібрований термопарний (хромель-

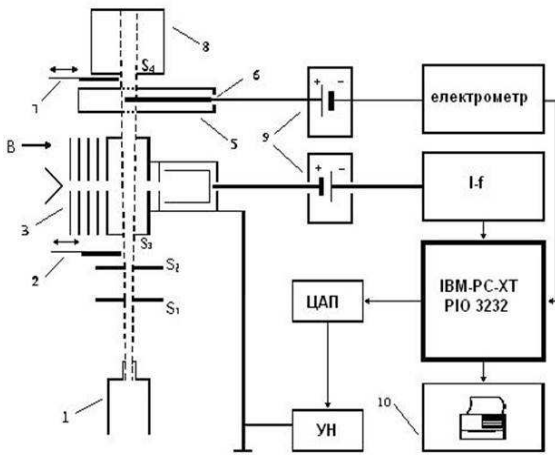


Рис.1. Блок-схема експерименту: 1- тигель; $S_1 - S_4$ - колімуючі щілини; 2,7 - засувки молекулярного пучка; 3 - електронна гармата; 4 - колектор електронів; 5 - колектор іонів; 6 - зонд; 8 - колектор молекул; 9 - гальванічні джерела потенціалів; 10 - друкуючий пристрій; $I - f$ - перетворювач струм - частота; ЦАП - цифро - аналоговий перетворювач; УН - підсилювач напруги.

алюмель) датчик температури контейнера, теплові екрани. Сам контейнер був виконаний у вигляді порожнистого циліндра, на одному з кінців якого монтувався елемент із ефузійними каналами (100 каналів на площі $1.5 \times 1.5 \text{ мм}^2$), а на протилежному - герметична закривка. На ній розміщався препарат урацилу (фірма Sigma-Aldrich, чистота 99%) та датчик температури. Конструкція нагрівника була такою, що температура елементу з мікроканалами була на 10°C вище температури закривки (93°C). Таким чином не допускалось залипання мікроканалів під час експерименту. Молекули проходили через область взаємодії з електронним пучком і в кінці свого шляху осідали на дні колектора, утворюючи з часом помітний слід - конденсат. Сам колектор представляв собою мідну камеру циліндричної форми із вхідною щілиною S_4 та плоским дном і мав температуру рідкого азоту. Вимірювання маси конденсату і часу його утворення давали змогу визначити інтенсивність молекулярного пучка, а відповідно, і його концентрацію.

Джерелом електронів служила п'ятиелектродна гармата із катодом, виготовленим із торованого вольфраму. Температура електронної гармати була на рівні 110°C , що забезпечувало стабільність параметрів гармати при роботі. Перший електрод гармати знаходився при невеликому негативному потенціалі, який затримував низькоенергетичну частину потоку електронів із катоду. Електрони пучка, що пройшли область зіткнень, уловлювалися циліндром Фарадея, який знаходився під додатнім потенціалом. Виміри проводилися при силі струму пучка електронів $1 \cdot 10^{-7} \text{ A} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ A}$ і енергетичній неоднорідності електронів на піввисоті їх енергетичного розподілу $\Delta E_{1/2} \sim 0,3 \text{ eV}$. Електронна гармата розміщався у поздовжньому полі індукцією $B = 1.2 \cdot 10^2 \text{ Тл}$. Калібрування енергетичної шкали електронів здійснювалося за резонансним піком утворення іонів SF_6 , енергетичне положення якого визначало нуль шкали.

Для повного збору іонів, що утворилися в області перетину електронного та молекулярного пучків, на шляху молекулярного пучка встановлюється прохідний колектор, всередині якого міститься осьовий електрод (зонд). Повнота збору іонів забезпечується потенціалом зонду 25 В, полярність якого визначається знаком заряду іонів, що реєструвалися. Магнітне поле унеможливило попадання на зонд електронів, розсіяних на молекулах урацилу та поверхнях електродів.

Система реєстрації та керування процесом вимірів складалася із таких пристроїв: електрометричного підсилювача іонного струму, перетворювача "струм - частота" пучка електронів, блоків ступінчастої розгортки прискорюючого потенціалу електронного пучка (ЦАП, УН), персонального комп'ютера (ІМ-РС-АТ) з інтерфейсною картою паралельного вводу/виводу, друкуючого пристрою. Описана система працювала в режимі вимірювань струмів іонів та електронів при фіксованій енергії електронного пучка (при визначенні абсолютної величини перерізу іонізації)

або у режимі вимірювань відношень струму іонів до струму електронів при ступінчастому скануванні енергії пучка електронів (при визначенні енергетичної залежності перерізу іонізації). Експерименти проводилися при вакуумі $\sim 1 \cdot 10^{-5}$ Па.

Експериментальні виміри здійснювалися за три етапи.

На першому етапі проводилась апробація методики досліджень та контрольні досліди. З цією метою камера зіткнень за допомогою прецизійної системи напуску наповнювалася газом SF₆ до тиску $1,3 \cdot 10^{-3}$ Па. Потім вводилася в дію електронна гармата, і реєструвався резонанс для процесу утворення негативних іонів молекул SF₆. Енергетичне положення резонансу використовувалося для калібрування енергетичної шкали електронів, а його ширина на напіввисоті - для визначення величини $\Delta E_{1/2}$ електронного пучка. Потім камера відпомпувалася і наповнювалася газом N₂ до тиску $1,3 \cdot 10^{-3}$ Па і вимірювалася енергетична залежність повного перерізу утворення іонів N₂. Співставлення отриманих нами даних із літературними вказує на їх задовільну узгодженість.

На другому етапі камера відпомпувалася до тиску $1 \cdot 10^{-5}$ Па, і вводилося в дію джерело молекулярного пучка (засувка 2- відкрита, засувка 7 – закрита). Вимірювалася енергетична залежність перерізу утворення негативних іонів урацилу (проводилось вимірювання відношення струму іонів до струму електронів при ступінчастому скануванні енергії пучка бомбардуючих електронів).

На третьому етапі визначаються абсолютні величини повних перерізів утворення негативних іонів урацилу. Для цього використовується співвідношення:

$$\sigma = i / i_e n l, \quad (1)$$

де σ - повний переріз утворення іонів; i - сила струму іонів відповідного знаку; i_e - сила струму електронного пучка; n - концентрація молекул урацилу в області перетину пучків; l - шлях електронів у молекулярному пучку. Абсолютний переріз іонізації визначався при енергії 4.5 eV.

Відносна похибка у визначенні величини n не перевищує 17%. Експерименти проводили при $n \sim 8 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-3}$. Відносні похибки вимірів становили: 9% - для енергетичних залежностей перерізів іонізації; 21% - для абсолютних величин перерізів іонізації.

Результати досліджень та їх обговорення

В результаті проведених експериментів було виявлено утворення негативних іонів урацилу при взаємодії його молекул з електронним пучком. Вперше експериментально вдалося виміряти абсолютні величини повних ефективних перерізів для негативних іонів урацилу в області енергій електронів від 0,4 до 5 eV. Отримані результати приведені на рис.2, де по осі ординат відкладено переріз іонізації в см^2 , а по осі абсцис – енергію іонізуючих електронів в одиницях електронвольт (eV).

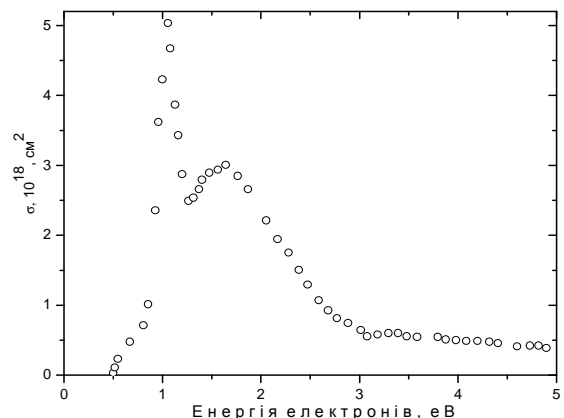


Рис. 2. Залежність абсолютної величини перерізу утворення негативних іонів урацилу від енергії електронів.

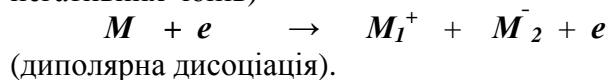
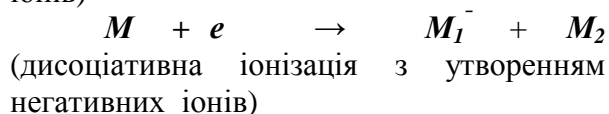
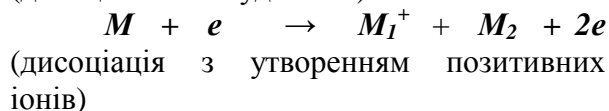
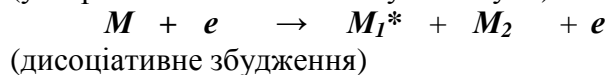
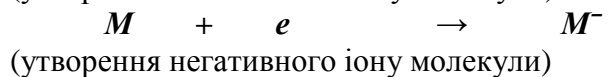
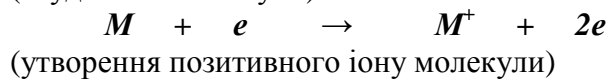
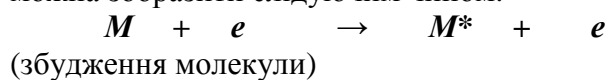
Як видно із рис.2, процес утворення негативних іонів урацилу має резонансний характер з його максимальним проявом при енергії електронів 1.1 eV. Відмітимо, що порогові значення енергій збудження і утворення позитивних іонів молекул нуклеотидних основ, а також максимуми відповідних функцій іонізації знаходяться при більших енергіях [2, 6].

Окремо слід зупинитися на абсолютній величині перерізу утворення негативних іонів урацилу. Максимальне значення

цього перерізу, за нашими вимірами, становить $5 \cdot 10^{-18}$ см². 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 приведена у роботі [4] оцінка перерізу утворення негативних іонів урацилу дає на два порядки більші значення. Оскільки, на відміну від [4], в наших дослідженнях безпосередньо визначалась концентрація молекул у молекулярному пучку, а інші деталі методики є надійно апробованими [6], то ми вважаємо оціночні дані роботи [4] завищеними.

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

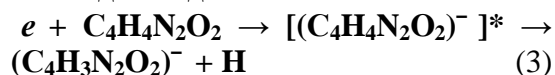
По-перше, з'ясовуючи механізми виникнення негативних іонів в біомолекулах і можливі їх наслідки в живих клітинах, необхідно враховувати весь комплекс процесів, які запускаються повільними електронами у речовині. Схематично сукупність основних фізичних процесів з участю молекули M у непружних взаємодіях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



Можливі і складніші перетворення. Наприклад, крім збуджених та іонізованих продуктів, можуть формуватися і

нейтральні фрагменти, які досить важко ідентифікувати. В експериментах, звичайно, для вивчення збуджених молекул використовують оптичні методи, а іонізацію досліджують за допомогою електричних методів. Відмітимо, що вищенаведені процеси протікають практично одночасно, з великими швидкостями і з різними ймовірностями.

По-друге, відповідно до загальних фізичних уявлень, при малих концентраціях взаємодіючих частинок практично неможливе утворення помітних кількостей негативних іонів цілих молекул. Тому утворений негативний іон цілої молекули, який за законами збереження повинен знаходитися у збудженому стані (електронному чи коливному), буде швидше всього дисоціювати на нейтральний і заряджений фрагменти. В області малих енергій налітаючих електронів, як у нашому випадку, найбільш імовірними незарядженими фрагментами можуть бути атоми водню, які мають найменшу величину енергії зв'язку в піримідиновому кільці молекули урацилу [7]. Таким чином, формування негативних іонів буде протікати двостадійно:



Однак, слід мати на увазі, що при великих концентраціях частинок (наприклад, в умовах живої клітини) ймовірність виникнення і стабілізації негативного іону цілої молекули буде зростати.

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 урацилу приблизно у 500 разів менший від перерізу для позитивних іонів. Однак цей факт не є достатньою підставою для висновку про те, що результуючий деструктивний вплив негативних іонів буде меншим, ніж позитивних іонів, оскільки їх реакційні здатності є різними.

По-четверте, врахуємо, 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 довгоживучі 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 в [2]. Таким чином, пояснюючи конкретні експериментальні результати, необхідно враховувати вклад багатьох каналів.

І, накінець, важливо, що із співвідношення (3) слідує, що у клітині низькоенергетичні електрони будуть продукувати, крім негативних іонів урацилу, його фрагментів, також атомарний водень. Первинна локалізація атомів водню невідома, але не виключено, що вони можуть відщепитись з С5, С6 піримідинового кільця. В принципі, це

можливо, оскільки тут зосереджені області позитивного потенціалу [8], які й будуть найбільш ймовірними місцями первинної атаки електронів. Ці всі фактори, в свою чергу, приведуть до структурних і функціональних зрушень у клітині. Насамперед слід очікувати змін у системі водневих зв'язків між комплементарними парами основ. Не виключений вплив на енергетику клітини, на протонні транспортні системи тощо.

Висновки

Експериментально встановлено, що електрони з енергіями кілька еВ (нижче енергетичних порогів електронного збудження та позитивної іонізації) ефективно руйнують молекулу урацилу, продукуючи рухливий радикал водню і негативно заряджений фрагмент урацилу. Новоутворені частинки, у свою чергу, спричиняють генотоксичні зміни у біоструктурах.

Література

1. Суховия М.И., Шафраньш И.И. О возбуждении азотистых оснований нуклеиновых кислот низкоэнергетическими электронами // В кн.: Механизмы радиационного поражения и восстановления нуклеиновых кислот. – Пушино-на-Оке, 1980. – С. 51.
2. Суховия М.И., Славик В.Н., Шафраньш И.И., Шимон Л.Л. Особенности взаимодействия молекул оснований нуклеиновых кислот с электронами малых энергий // Биополимеры и клетка. – 1991. – 7, вып.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 // In: Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions. – Kluwer Acad. Publ. – Dordrecht/Boston/London, 1999. – P. 281-282.
4. Hanel G., Gstir B., Denifl S. et al. Electron attachment to uracil: Effective destruction at subexcitation energies // Phys. Rev. Lett. – 2003. - 90, №18. - P.188104-1 – 188104-4.
5. Aflatooni K., Scheer A.M., Burrow P.D. Total dissociative electron attachment cross sections for molecular constituents of DNA // J. Chem. Phys., 2006. – V. 125. – P. 054301-1 – 054501-5.
6. Shafranyosh I.I., Sukhoviya M.I., Shafranyosh M.I. Absolute cross sections of positive and negative ion production in electron collision with cytosine molecules. J. Phys.B., 2006. – V.39. – P. 4155- 4162.
7. Гурвич Л.В., Карачевцев Г.В., Кондратьев В.Н. Энергии разрыва химических связей. Потенциалы ионизации и сродство к электрону. – М.: Наука, 1974. – 351 с.
8. Морозов Ю.В., Бажулина Н.П. Электронное строение, спектроскопия и реакционная способность молекул. – М.: Наука, 1989. – 288 с.

NEGATIVE IONS RESONANT FORMATIONS OF URACIL MOLECULES

M.I. Shafranyosh, M.I. Sukhoviya, L.L. Shimon, I.I. Shafranyosh

Uzhhorod State University, 88000, Uzhhorod, Voloshin st. 54

The absolute cross sections for negative ions formations of the nucleic acid base - uracil were found first using the modern technic of normally crossed molecular and electron beams. The ionization cross section had maximum at 1.1 eV of the electron energy and was $5 \cdot 10^{-18}$ cm². Biophysical consequences of the obtained results are discussing.