

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДВНЗ «УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
Українсько – Угорський Навчально – Науковий інститут
Кафедра фізико – математичних дисциплін

Молнар Альберт Шандорович

**Вивчення впливу опромінення на фотолюмінесценцію азотистих основ
нуклеотидів ДНК у шкільному курсі фізики**

Спеціальність 01408 Середня освіта (фізика)

Дипломна робота на здобуття освітнього ступеня бакалавр

Науковий керівник:

Професор Мікла В.І., доктор фізико-математичних наук

УЖГОРД 2022

Регистрація 2
«14» червня 2022 р. Дз/96 Верес Е.С.

Дипломна робота допущена до захисту

Завідувач кафедри

[Signature] В.І. Мікла

«14» червня 2022 р.

Рецензент [Signature] проф. Бандурин Ю.А.

ЗМІСТ

Вступ. Актуальність, мета, задачі дослідження.....	3
Розділ.1. Огляд літератури та основні відомості про предмет дослідження....	6
1.1.Коротка характеристика структури і функції ДНК, РНК.....	6
1.2.Основні відомості про люмінесценцію складних органічних молекул.....	12
1.3.Радіаційний вплив на біомолекули.....	17
Розділ.2. Експериментальна техніка для вивчення явища фотолюмінесценції в розчинах біологічних макромолекул.....	19
2.1.Принципи спостереження та вимірювання спектрів фотолюмінесценції.....	19
2.2.Основні технічні характеристики спектрофлуорофотометра Shimadzu RF-6000.....	23
Розділ.3. Результати вимірювань та їх інтерпретація.....	31
3.1.Валін.....	31
3.2.Азотисті основи.....	34
Висновки.....	35
Рисунки.....	36
Список використаної літератури.....	46

Вступ

Вивчення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) та рибонуклеїнової кислоти (РНК) відбувається вже більше 70 – ти років з моменту її відкриття Уотсоном і Кріком. Це зрозуміло з огляду на основну функцію цієї сполуки – збереження і передачі спадкової інформації про живий організм. Важливість цих досліджень важко переоцінити – вони мають як суто прикладне, практичне значення (медицина, сільське господарство, а знедавна комп’ютерна техніка тощо) так і фундаментальне – таємниця походження життя на землі, визначення самої сутності живого. Функціонування, будова ДНК, фізичні і хімічні властивості цієї молекули стають все більш зрозумілими. Технології, що використовують знання про ці сполуки використовуються вже в повсякденному житті: від діяльності криміналіста, до роботи фермера. Досягнення останніх десятиліть включають в себе розшифрування геному людини, широкомасштабні дослідження спадковості в біологічних об’єктах, клонування живих організмів і т.ін. Тим не менше – як це часто буває в науці – що більше ми знаємо про механізм біологічної спадковості то більше виникає питань і білих плям у наших знаннях.

Однією з важливих областей дослідження є вплив опромінення на біологічні молекули зокрема на ДНК і РНК та їх структурні елементи. При опроміненні виникає нестабільність ДНК і РНК, що приводить до порушень у їх функціонуванні, що в свою чергу приводить до дисфункції біологічного об’єкту в короткостроковій і довгостроковій перспективі. Відкриття механізмів репарації ДНК привело до постановки питання про роль цих механізмів в функціонуванні як нормальної так і опроміненої біологічної клітини. Вивчення механізмів радіаційного пошкодження ДНК та його структурних елементів а також знаходження шляхів усунення викликаних опроміненням порушень структури і функції ДНК є до цих пір відкритою проблемою досліджень фізиків, хіміків, біологів по всьому світу.

Серед багатьох методів дослідження ДНК, одним із надійних слід вважати вивчення явища фотолюмінесценції в ДНК, РНК її структурних компонентах – азотистих основах - та і взагалі в інших біологічно активних молекулах – білках, амінокислотах, тощо. Такі дослідження дають важливу інформацію про структуру, функціонування та фізичні властивості біологічних молекул. Вкупі з результатами інших досліджень вони дають змогу в’яснити невирішені питання щодо фізичних, хімічних і біологічних властивостей органічних макромолекул.

Виходячи з вищенаведених міркувань слід вважати дослідження фотолюмінесценції в азотистих основах ДНК і РНК та інших макромолекул, що були опромінені різними дозами радіації *актуальною науковою задачею*.

Метою даного дослідження є теоретичне та експериментальне вивчення деяких фізичних властивостей азотистих основ та певних білків, що були піддані опроміненню високоенергетичними електронами. На основі цих даних потрібно зробити висновки відносно впливу опромінення на біомолекули, особливо ДНК та РНК.

Задачею даної роботи є експериментальне дослідження фотолюмінесценції азотистих основ нуклеотидів ДНК і РНК та деяких білків, збір даних по фізичних властивостей цих молекул, теоретичне опрацювання цього матеріалу та інтерпретація результатів дослідження.

Метою викладання представленого матеріалу в середній школі на рівні стандарту полягає у формуванні в учнів знань про закономірності функціонування живих систем, їх початок, розвиток і взаємодію, взаємозв'язок із навколишнім середовищем; розуміння фізичної та біологічної картини світу та цінності таких категорій, як знання, життя, природа, здоров'я, необхідності раціонального використання і відновлення природних ресурсів, усвідомлення біосферної етики; уміння опанувати методологію пізнання живої природи, різноманітними способами пізнавальної діяльності, життєвими навичками, здатністю до саморозвитку й самонавчання в умовах сьогодення, з врахуванням глобальних змін і викликів; свідомого ставлення до природи як безперечної, унікальної цінності; застосування знань з фізики та біології у повсякденному житті та майбутній професійній діяльності, оцінювання їх ролі для збалансованого розвитку людства, науки та технологій.

Досягнення вищеуприведеної мети передбачає вирішення таких завдань:

- оволодіння учнями термінологічним апаратом, засвоєння предметних знань та усвідомлення в повній мірі суті фундаментальних принципів, основних законів і закономірностей, що надають змогу зрозуміти неперервність життя, його фундаментальний та нерозривний зв'язок з довкіллям;

- встановлення міжпредметного, внутрішньоциклового та міжциклового зв'язку фізики з метою створення в учнів гуманістичних поглядів на природу, сучасних уявлень про її цілісність і сталий розвиток;
- набуття досвіду практичної та пошукової науково-дослідницької діяльності, здатності встановлювати причинно-наслідкові зв'язки при застосуванні набутих знань у процесі пізнання світу та уміння інтерпретувати отримані результати;
- використання набутих знань, навичок та умінь у щоденному житті для оцінки впливу факторів навколишнього середовища, наслідків своєї діяльності для збереження власного здоров'я та безпеки інших людей;
- розвиток особистої відповідальності за стан навколишнього довкілля, формування ціннісних орієнтацій для збереження природи, розуміння необхідності узгодження стратегії природи та людини на основі ідеї повноти, універсальності природних зв'язків та відповідної самообмеженості, подолання споживацького ставлення до природи.

Розділ.1. Огляд літератури та основні відомості про предмет дослідження

1.1.Коротка характеристика структури і функції ДНК, РНК

Дезоксирибонуклеїнова кислота – ДНК – є полімерною молекулою, мономерами якої виступають нуклеотиди чотирьох типів: два полінуклеотидні ланцюги закручуються один навкруг одного в подвійну спіраль. З установлення в 1953 р. Уотсоном і Кріком цього добре відомого сьогодні факту розпочалася сучасна молекулярна біологія – структура подвійної спіралі відразу вказувала на те, яким чином ДНК виконує роль носія спадкової інформації. З того моменту стало зрозумілим, що ДНК є "головною" біологічною макромолекулою. Справді, саме навколо неї – заради її збереження та реалізації записаної в ній інформації, її відновлення у двох ідентичних копіях при реплікації та передачі нащадкам – розгортається все розмаїття фізіологічних процесів у всіх живих системах.

Усупереч своїй назві, ДНК не є кислотою – як хімічна сполука вона являє собою сіль того чи іншого металу [1]. У водному розчині відбувається дисоціація на неорганічні катіони та гігантський поліаніон із негативно зарядженою поверхнею. Властивості цього поліаніона та нетривіальний характер його взаємодії з катіонами, а також відповідні наслідки для структури, стабільності та взаємодії ДНК з іншими молекулами є основою для розгляду хімічних та фізичних властивостей розчинів з молекулами ДНК.

Полімерні властивості ДНК: механізм гнучкості та еластичності, особливості утворення довгою молекулою ДНК неупорядкованого клубка, загальним механізми компактизації такого клубка, характер відповіді полімеру на зовнішні механічні впливи, закономірності утворення полімерною молекулою ДНК замкнутого кільця в значній мірі впливають на функціонування ДНК, як носія спадкової інформації. Подвійна спіраль відрізняється жорсткою структурою, однак вона є водночас досить еластичною і здатною до різноманітних деформацій [2].

Насправді лінійна молекула ДНК є лабораторним артефактом – у живих системах ДНК існує й функціонує у вигляді або циркулярних ковалентно замкнених молекул, або петель, кінці яких зафіксовані на скелетних клітинних структурах. Результатом таких обмежень, що накладаються на кінці, є низка унікальних особливостей, яким важко знайти інші аналоги в молекулярному світі. Топологія, енергетика та конформаційна рухливість

циркулярної ДНК розглядаються, як найбільш значимі фактори, що відрізняють ДНК від усіх інших органічних макромолекул і надають їй винятковості.

У живих системах ДНК ніколи не існує сама по собі, завжди взаємодіючи з великою кількістю інших молекул. Загальні закономірності міжмолекулярних взаємодій за участю ДНК, а також механізми зв'язування з ДНК різноманітних молекул малого розміру, від молекул води до олігопептидів, взаємодії ДНК з білками, у тому числі з такими, що специфічно впізнають певні елементи послідовності нуклеотидів, фізичним аспектам існування та функціонування ДНК у складі хроматину – складного білково-нуклеїнового комплексу в ядрах еукаріотичних клітин.

Молекула нуклеїнової кислоти – полімер, мономерними одиницями якого є нуклеотиди. Нуклеотид, у свою чергу, містить три хімічні компоненти – азотисту основу, пентозний цукор, залишок фосфорної кислоти. Ковалентний зв'язок між певними групами цукру та фосфатного залишку з'єднує сусідні нуклеотиди (які розрізняються між собою за типом азотистої основи) у складі полімерного ланцюга. У молекулі ДНК зазвичай два такі полінуклеотидні ланцюги об'єднуються в подвійну спіраль – дволанцюгову структуру (дуплекс), стабільність якої визначається нековалентними взаємодіями між азотистими основами. Просторова структура подвійної спіралі залежить від послідовності нуклеотидів (азотистих основ) і зовнішніх умов. Розглянемо послідовно ці компоненти [3].

1) Азотисті основи

Азотисті основи – це гетероциклічні сполуки (рис. 1), у кільцях яких містяться карбон і азот, а всі зв'язки мають характер частково подвійних. До складу ДНК входять два типи азотистих основ: пурини (загальне скорочене позначення R) – аденін (A) і гуанін (G); та піримідини (Y) – тимін (T) і цитозин (C). Загальне позначення для основи будь-якого типу (якщо тип основи є невідомим або неважливим у конкретному випадку) – N. Крім наведених на рис. 1 стандартних основ, у складі природних ДНК зустрічаються також ковалентно модифіковані: 5-метилцитозин (5mC, найпоширеніша модифікація в ДНК еукаріотів) – метильна група приєднана до п'ятого атома кільця замість атома гідрогену; N4-метилцитозин; N6-метиладенін. Молекули РНК (рибонуклеїнової кислоти) замість тиміну містять урацил (U), що відрізняється від свого аналогу в ДНК відсутністю метильної групи при п'ятому атомі кільця (рис. 1). Крім того, у РНК (передусім це стосується транспортних РНК) зустрічається велика кількість так званих неканонічних (модифікованих) азотистих основ.

Оскільки всі зв'язки в кільці – частково подвійні, навколо них неможливе обертання, і азотисті основи є планарними – усі атоми кільця лежать практично в одній площині. Зрозуміло, що при цьому є можливими коливальні варіації довжини зв'язків кільця та валентних кутів, проте відсутність обертальних рухів робить азотисті основи конформаційно жорсткими конструкціями. Приєднані до кільця (екзоциклічні) аміногрупи, а також метильна група тиміну (рис. 1) обертаються з досить високими швидкостями, залучення аміногруп до водневих зв'язків суттєво гальмує таке обертання.

Атоми азоту кільця та екзоциклічні атоми кисню є акцепторами, а NH₂-групи – донорами водневого зв'язку, відповідно, ці групи здатні взаємодіяти з водою. Разом із тим, площина кільця є гідрофобною і кристали азотистих основ погано розчиняються у воді.

2) Нуклеозиди й нуклеотиди

Пентозний цукор, що входить до складу ДНК (рис. 2), називають дезоксирибозою, сполуку азотистої основи та пентози – нуклеозидом (залежно від типу азотистої основи: аденозин, гуанозин, цитидин, тимідин). Певний атом азоту гетеро циклу основи (N1 піримідинів, N9 пуринів) приєднується у складі нуклеозиду до карбону пентозного цукру глікозидним зв'язком (рис. 3). Цей атом пентози позначається як C1' (символ " ' " прийнято додавати, щоб відрізнити атоми фуранозного кільця пентози від атомів азотистої основи). Інші C'-атомі пентози нумеруються далі за порядком їхнього розташування (рис. 2; 3). Пентоза, у складі якої OH-група розташована не тільки при 3'- (як на рис. 2), а також і при 2'-атомі (замість одного з атомів водню), називається рибозою і входить до складу РНК [3].

Фосфорилування нуклеозиду по OH-групі при 5'-атомі пентози (або іноді по інших OH-групах цукру) приводить до утворення нуклеотиду (рис. 3). Таким чином, нуклеотид є нуклеозидфосфатом або нуклеозидмонофосфатом (NMP). Нуклеозид-5'-фосфат позначають також як pN, а нуклеозид-3'-фосфат (фосфатний залишок приєднаний до 3'-атому пентози) – як Np. На відміну від азотистих основ, пентози та фосфатні залишки добре взаємодіють з водою. Крім того, пентоза не містить подвійних зв'язків, тому навколо зв'язків у її складі можливе обертання. Оскільки атоми пентози утворюють кільце, п'ять кутів обертання не є незалежними – для однозначного опису конформації п'ятичленного кільця достатньо двох параметрів. Планарна конформація кільця енергетично не вигідна через стеричні обмеження. У складі нуклеїнових кислот переважно зустрічаються дві конформації, схематично показані на рис. 4. Конформація C2'-ендо (C2'-атом виходить у бік C5'-атому з площини, що задана атомами C4'–O–C1') є переважною для дезоксирибози за

фізіологічних умов. При цьому С3'-атом може виходити з тієї самої площини в протилежний бік (бути в положенні С3'-екзо). Узагалі, конформація пентози не є фіксованою: реалізується динамічна рівновага (у більш широких межах – для нуклеотидів, у вузьких – для впорядкованих полінуклеотидних ланцюгів) навкруг переважної конформації. Крім того, зміна зовнішніх умов може привести до того, що переважною стає інша конформація – С3'-ендо (рис. 4). Саме вона є основною для рибози у складі полірибонуклеотидних ланцюгів: поява ОН-групи замість гідрогену при С2'-атомі робить конформацію С2'-ендо неможливою [4].

Перемикання між двома конформаціями суттєво змінює загальну просторову геометрію нуклеотиду (рис.5) і тому лежить в основі перетворень між структурними формами нуклеїнових кислот. Крім обертання навколо хімічних зв'язків пентозного кільця, конформація нуклеотиду залежить від набору інших кутів обертання у рухливій частині молекули: навколо всіх зв'язків за винятком зв'язків усередині азотистої основи.

3) Полінуклеотидний ланцюг

Дві хімічні групи – ОН-група при 3'-атомі пентози одного нуклеотиду й фосфат при 5'-атомі іншого – використовуються для утворення фосфодієфірного зв'язку між нуклеотидами (рис 6). Отже, полінуклеотидний ланцюг має напрямок: на одному його кінці залишається 5'-фосфат (5'-кінець), на іншому – 3'-ОН група (3'-кінець).

Послідовності нуклеотидів прийнято записувати у напрямку $5' \rightarrow 3'$, у тому ж напрямку відбувається синтез усіх нуклеїнових кислот. Слід також розуміти, що конформаційні особливості ланцюга залежать від напрямку, в якому містяться сусідні нуклеотиди. Наприклад, послідовність СА (її також можна записати як рСрА або СрА) має інші особливості, ніж послідовність АС. Загалом у складі ланцюга може бути 16 типів таких динуклеотидних контактів (16 можливих комбінацій із чотирьох по два).

Полярний остов полінуклеотидного ланцюга являє собою фосфатні залишки (кожен з яких несе на собі один негативний заряд при нейтральних рН) і пентози, що чергуються, – цукрофосфатний остов. Від цього остова відходять азотисті основи як бокові залишки. Конформацію ланцюга визначають сім кутів обертання, асоційованих з кожним нуклеотидом, що показані на рис. 7 (плюс додатковий параметр, від якого залежить конформація пентози): шість кутів визначають конформацію цукрофосфатного остова, кут χ – орієнтацію азотистої основи відносно цукру [4].

Велика кількість зв'язків, навколо яких можливе обертання, робить цукрофосфатний остов досить гнучким, проте не будь-які значення кутів обертання є припустимими. Для кожного кута реалізуються лише значення в певних виділених достатньо вузьких діапазонах – обертальні ізомери, число яких зазвичай не перевищує трьох. У складі одноланцюгових полінуклеотидів їхня кількість для кута α дорівнює 1, $\beta - 3$, $\gamma - 3$, $\delta - 2$, $\epsilon - 3$, $\zeta - 2$, $\chi - 2$, тобто загалом кожен нуклеотид може мати $1 \times 3 \times 3 \times 2 \times 3 \times 2 \times 2 = 216$ конформацій. У регулярних жорстких структурах нуклеїнових кислот реалізується один ізомер для кожного кута і спостерігається наступна тенденція (див. рис.7): кут α приблизно відповідає конформації гош $-$, $\beta -$ транс, $\gamma -$ гош $+$, $\epsilon -$ транс, ζ -гош $-$. Кут δ є одним із п'яти кутів обертання, які визначають конформацію п'ятичленного кільця цукру.

Для кута обертання навколо глікозидного зв'язку (χ) роль атомів 1–4 на рис.7 відіграють атоми O'–C1'–N–C4 для пуринів та O'–C1'–N–C2 для піримідинів. Для цього кута існує два діапазони значень, які позначаються як син ($\chi \sim 45^\circ \pm 45^\circ$) та анти ($\chi \sim -135^\circ \pm 45^\circ$). У син-конформації шестичленне кільце пуринів і атом O₂ піримідинів наближаються до пентозного кільця цукру, що створює стеричні обмеження. Відповідно, переважною є зазвичай антиконформація нуклеотиду (зображена на рис. 5). Переважне значення кута χ суттєво залежить від конформації пентози: конформація C2'-ендо передбачає менші стеричні обмеження для кута χ , ніж конформація C3'-ендо. Відповідно, перша конформація пентози дозволяє ширший діапазон значень для кута χ та менші енергетичні витрати на реалізацію син-конформації. У складі регулярних полінуклеотидних структур нуклеотиди мають здебільшого анти-конформацію: значення кута χ приблизно дорівнює -160° для B-форми ДНК (де реалізується C2'-ендо-конформація пентози) і -100° для A-форми (C3'-ендо); син-конформація властива для частини нуклеотидів у складі Z-форми ДНК.

4) Подвійна спіраль

На ранніх етапах структурних досліджень нуклеїнових кислот велику роль відіграв метод дифракції рентгенівських променів на фібрилах ДНК, який дозволив установити загальні риси структури подвійної спіралі. Детальну інформацію (просторові координати кожного атома) отримують за допомогою рентгеноструктурного аналізу кристалів або двовимірного ЯМР у розчині порівняно невеликих фрагментів ДНК: на рис. 1.8 зображено структуру додекамеру Дікерсона – одного з перших фрагментів ДНК, отриманих у кристалічному вигляді.

Молекула ДНК найчастіше існує у вигляді стабільної дволанцюгової структури (дуплекса), яка утворюється за рахунок нековалентних взаємодій. Два полінуклеотидні

ланцюги (не тільки ДНК, а також РНК або гібридні) об'єднуються в дуплекс за жорсткої умови: певні азотисті основи повинні стояти одна напроти одної А напроти Т (або U), G напроти С. Цей принцип комплементарності, сформульований Уотсоном і Кріком, зумовлений утворенням специфічних водневих зв'язків між названими основами: два зв'язки в парі А-Т, три в парі G-С. Два ланцюги дуплекса спрямовані в різні боки (є антипаралельними), спіралью закручені один навколо одного цукрофосфатні основи розташовані зовні, пари основ – щільно упаковані всередині цієї структури (рис. 8).

1.2. Основні закономірності фотолюмінесценції розчинів багатоатомних органічних молекул

Енергія молекули E складається з кінетичної енергії її руху $E_{кін}$, енергії руху електронів $E_{ел}$, енергії коливань ядер $E_{кол}$ і обертання молекули як цілого:

$$E = E_{кін} + E_{ел} + E_{кол} + E_{об} \quad (1)$$

Формула (1) вірна тільки наближено так як вона не враховує взаємного впливу всіх трьох основних видів внутрішнього руху, який може бути суттєвим в великих багатоатомних молекулах. Однак застосування формули (1) дозволяє будувати енергетичні діаграми, на яких кожному електронному стану відповідає певний енергетичний рівень (терм); при цьому кожний електронний рівень має кілька коливальних підрівнів а у свою чергу кожний коливальний підрівень має набір оберտальних підрівнів (рис.9).

Найменше з можливих значень електронної енергії (E_0 на рис.9) відповідає основному (незбудженому) стану молекули. Електронні стани з більшим запасом енергії (E_1, E_2, \dots, E_n) називають збудженими станами.

Якщо частота (ν) кванта світла, що падає на молекулу відповідає рівнянню :

$$h\nu = E_1 - E_0, \quad (2)$$

де h – постійна Планка, то молекула може поглинути квант $h\nu$ перейшовши при цьому з рівня E_0 на рівень E_1 (часто кажуть про перехід електрона в молекулі з одного електронного стану в інший електронний стан, так як зміна станів молекули пов'язана із зміною конфігурації її електронної хмари) [6].

Зворотній перехід молекули з рівня E_1 на рівень E_0 може супроводжуватися випромінюванням фотону $h\nu$ (люмінесценцією). В залежності від природи збудженого стану і характеру переходу до основного стану люмінесценція поділяється на флуоресценцію і фосфоресценцію. Повернення до основного стану після збудження відбувається за дуже короткий проміжок часу, що становить 10^{-8} - 10^{-9} сек. (флуоресценція) ; однак цей проміжок часу значно перевищує періоду коливань світла.

Це є найбільш характерною ознакою флуоресценції, що відрізняє її від комбінаційного розсіювання та розсіювання редея, свічення Вавилова – Черенкова, відбивання та заломлення світла і т.д. , не пов'язаних з переходом молекул в стаціонарний

збуджений стан і зникаючими за час, що по порядку збігається з періодом коливань світлової хвилі – 10^{-11} сек.

Отже люмінесценція це – випромінювання збудженими молекулами абсорбованої ними енергії з електронного чи коливального збудженого стану, який не є в термічній рівновазі з середовищем. При цьому випромінювання відбувається протягом часу після поглинання енергії молекулою, не коротшого ніж період коливань падаючої світлової хвилі. Речовина у якій спостерігається люмінесценція називається люмінофором. В залежності від типу збуджуючої дії розрізняють фотолюмінесценцію, електролюмінесценцію, хемілюмінесценцію і т.д. В даній роботі розглядається фотолюмінесценція. Флуоресценція (флюоресценція) – короткотривала (від пікосекунд до мілісекунд люмінесценція. В свою чергу фосфоресценція – це довготривала (від мілісекунд до кількох годин люмінесценція [6].

Потік світла люмінесценції можна характеризувати його інтегральною інтенсивністю і спектральним складом. Залежність інтенсивності І свічення від довжини хвилі λ називають спектром випромінювання. Спектр флуоресценції завжди зміщений в сторону більших значень довжини хвилі падаючого світла в порівнянні зі спектром поглинання (закон Стокса). Однак довгохвильова область спектра поглинання і короткохвильова область спектру флуоресценції частково перекриваються, що особливо характерно для складних молекул. Флуоресценція з довжиною хвилі, що менше довжини хвилі збуджуючого світла називається антистоксівською. Додаткова енергія, яка потрібна для її виникнення, забезпечується збудженням молекул із збільшеним запасом коливальної енергії. Тобто енергія теплового руху молекул переходить у енергію випроміненого під час люмінесценції світла. При цьому відбувається охолодження речовини (ефект оптичного охолодження). При зміні довжини хвилі збуджуючого світла спектр антистоксівської люмінесценції не залежить від довжини хвилі збуджуючого світла (при збудженні в довгохвильовій частині спектра частина енергії люмінесценції переноситься в антистоксову область з коротшими хвилями).

Квантовий вихід фотолюмінесценції - це відношення числа випромінених квантів до абсорбованих речовиною, або відношення енергії, випроміненої у вигляді світла, до всієї абсорбованої енергії.

Залежність інтегральної інтенсивності люмінесценції або її інтенсивності при певній довжині хвилі від довжини хвилі збуджуючого світла називається спектром збудження люмінесценції. Експериментально показано, що для ряду речовин квантовий вихід

флуоресценції не міняється в широкому інтервалі довжин хвиль збуджуючого світла. Це часто називають законом Вавилова.

В загальному випадку при електронному переході буде змінюватися також і коливальна і обертальна енергія молекули $E_{кол}$, $E_{об}$. Тому електронний спектр в дійсності є електронно – коливально – обертовим спектром (в спрощеному варіанті електронним або електронно – коливальним). Так як енергетичні рівні мають скінчену ширину і в складних молекулах перекриваються одне з одним утворюючи неперервну послідовність, контур електронних спектрів складних молекул практично немає коливальної структури. Форма смуг поглинання і випромінювання визначається ймовірностями переходу між різними коливальними рівнями основного і збудженого стану і функцією розподілу коливальних рівнів по енергіях верхнього та нижнього електронних станів для поглинання і випромінювання відповідно.

Відсутність чітко вираженої коливальної структури в електронно - коливальних спектрах складних молекул є серйозною перешкодою при практичному використанні молекулярної спектроскопії. Тому постійно робилися спроби знайти такі умови, які би забезпечували виявлення коливальної структури спектрів.

Можна зменшити число ступенів вільності, що практично реалізуються, якщо заморозити розчин. Однак розчини багатьох органічних речовин в замороженому стані утворюють молекулярні кристали, які при поглинанні світла демонструють ряд специфічних ефектів, які приводять до розширення спектральної смуги пропускання.

Міжмолекулярну взаємодію можна практично повністю виключити переводячи речовину в розріджений газ (пар). Однак в такому стані реалізується великий набір коливальних і обертових станів, причому останні в газах утворюють практично неперервну послідовність станів, що приводить до розмиття структури спектру. Крім того, небагато речовин складної будови можуть бути переведені в газову фазу без розкладу.

Виявилось можливим поєднати переваги, що даються глибоким охолодженням і переводом речовин у газоподібний стан і одночасно позбавитися від ускладнень, що вносяться у спектри особливостями цих фазових станів. Такі умови для одержання близьких до лінійних електронно – коливальних спектрів багатоатомних органічних молекул виникає при розміщенні їх в іншу речовину – матрицю що забезпечує ізоляцію молекул одне від одного і після замороження фіксацію їх в певному чітко визначеному орієнтованому положенні. Молекули у матриці знаходяться в у вигляді «орієнтованого

газу». Шпольський вперше виявив, що в спектрах люмінесценції заморожених розчинів поліаценів, полієнів, полі фенілів в нормальних парафінах як матрицях проявляється квазілінійний характер коливальної структури електронних переходів. Це явище дістало назву ефекту Шпольського. Згідно уявлень Шпольського парафінові матриці надають можливість одержувати досліджувану речовину (активатор) в молекулярно - диспергованому стані, завдяки геометричній подібності форм матриці і активатору [7].

Для того, щоб молекули, що випромінюють утворили «орієнтований газ» матриця повинні їх включати без деформації, в то же час доволі жорстко. Не взаємодіючи з люмінесцентними молекулами вона повинна утворювати з ними однорідний твердий розчин і нарешті матриця має бути прозорою у всій спектральній області збудження і випромінювання люмінесцентних молекул. При використанні в якості матриці n – парафінів квазілінійні спектри виявлені в широкому колі речовин, зокрема у гетероциклічних сполук, для деяких пігментів біологічного походження. Однак одержати квазілінійні спектри білків, нуклеїнових кислот і їх складових поки не вдалося. Слід відмітити, що крім нормальних вуглеводнів в якості матриці можуть бути використані і інші розчинники, наприклад дибензиламіноетанол, циклогексан.

Вплив розчинника на електронні спектри молекул. На основні характеристики люмінесценції – квантовий вихід, інтенсивність і спектри – впливають різні фактори середовища. Звичайно міжмолекулярні взаємодії, що приводять до зміщення електронних спектрів у розчинах поділяють на загальні і специфічні. Загальні полягають у колективному впливі молекул розчинника на молекулу люмінофора. Специфічні полягають у взаємодії молекули люмінофора і молекули розчинника (однією або кількома) шляхом донорно – акцепторної взаємодії, асоціації, утворення водневих зв'язків тощо. Теорія впливу загальної взаємодії на положення електронних спектрів молекул дозволяє пов'язати величину зміщення спектрів з макроскопічними характеристиками розчинника – показником заломлення і діелектричною проникливістю, і властивостями молекули люмінофора – її об'ємом і співвідношенням дипольних моментів в основному і збудженому стані.

Переходи між синглетними і триплетними рівнями. Якщо в молекулі всі спіни електронів попарно протилежно направлені (антипаралельні), то результуючий спін S електронів дорівнює нулю. Якщо один із електронів міняє свій спін на протилежний то сумарний спін стає рівним одиниці. Величина $2S+1$ визначає кратність рівня – число можливих орієнтацій електронного спіну відносно їх сумарного орбітального моменту.

Якщо $C=0$ то $2C+I=1$ і відповідний енергетичний рівень називається синглетним; якщо $C=1$ то $2C+I=3$ і відповідний енергетичний рівень називається триплетним. Звичайно основний не збуджений стан молекули є синглетним. Зміна напрямку спіну одного з електронів приводить до того, що інший електрон у відповідності до принципу Паулі переходить на іншу орбіту – молекула переходить на триплетний рівень. Поява у молекулі двох неспарених електронів в триплетному стані надає їй властивості активного бірадикала. Нехай C_1 , C_2 , C_3 – синглетні рівні а T_1 , T_2 , T_3 . У відповідності до правил квантової механіки переходи між термами бувають дозволені і заборонені. До дозволених відносяться переходи, при яких мультиплетність не змінюється; заборонені – при зміні мультиплетності.

Синглет – синглетні переходи легко виявляються як при поглинанні так і при випромінюванні світла. Випромінювання, що виникає при переході молекули із збудженого синглетного в основний синглетний стан є флуоресценцією.

Електрони зовнішніх оболонок, що визначають оптичні властивості молекул ділять на три типи: σ - електрони, що утворюють одинарний зв'язок, π - електрони, які утворюють разом з σ електронами подвійний і потрійний зв'язок; n – електрони неподілених пар гетеро атомів, які можуть брати участь в донорно – акцепторному зв'язку. Класифікацію спектрів поглинання по приналежності смуг до тим чи іншим електронним переходам для окремих класів хімічних сполук можна знайти у відповідних довідниках.

Збудження молекули може здійснюватися як при безпосередньому поглинанні кванта енергії, так і в результаті без опромінюючого переносу електронного збудження від другої попередньо збудженої молекули. Випромінювання молекули акцептора, збудження якої викликано без опромінюючим переходом енергії від іншої молекули – донора енергії називають сенсibilізованою люмінесценцією.

1.3.Радіаційний вплив на біомолекули

Білки. До фізико-хімічних критеріїв ушкодження макромолекул, тканин і т.п. відносять: зменшення молекулярної маси внаслідок розриву поліпептидних ланцюгів, зміна розчинності, порушення вторинної і третинної структур, утворення зшивок і агрегатів (з'єднань один з одним різних частин білків), а також руйнування амінокислот у ланцюзі. Біохімічним критерієм ушкодження є втрата ферментами здатності здійснювати свої реакції. Для ушкодження ферментів потрібне опромінення у набагато більших дозах, чим для виникнення серйозних змін у клітині, які призводять її до загибелі. Цей факт пояснюють тим, що у клітині є більш чутливі до опромінення мішені, ніж ферменти [8].

ДНК. Іонізація викликає три основних типи ушкодження: одно- та дволанцюгові розриви ДНК і ушкодження азотистих основ. Значна частина енергії клітини витрачається для репарації, тобто відновлення та підтримки сталості у послідовності основ у ДНК. Однак, не всі ушкодження ДНК рівнозначні за наслідками, до яких вони призводять. Число поодиноких розривів лінійно залежить від дози опромінення у дуже широкому діапазоні (від менше ніж 0,2 до 60 кГр). Іншими словами, наскільки б малою не була доза опромінення, виникає певне число розривів однієї з ниток ДНК. Середня енергія на один розрив для випромінювання з низькою ЛПЕ становить близько 2·10¹⁸ Дж. Поодинокі та подвійні розриви ДНК [10]. Значна частина одноланцюгових розривів відбувається за участі ОН- радикалів води. Їх відновлення у клітинах ссавців відбувається досить ефективно внаслідок ексцизійної репарації, яка полягає в ексцизії (вирізання) частини ланцюга, що містить ушкоджені ланки ДНК, і використанні комплементарного (неушкодженого) ланцюга як матриці для повторного синтезу нової ділянки ДНК замість ушкодженої. Цей процес є ферментативним і залежить від температури. За 0°С він значно уповільнюється. У клітинах ссавців швидкість репарації така, що за нормальної температури половина радіаційних одноланцюгових розривів відновлюється протягом ~15 хв. Оскільки одноланцюгові розриви репаруються навіть у летально опромінених клітинах, припускають, що вони не є причиною загибелі клітин на відміну від подвійних розривів або ушкоджень основ. Але такі нерепаровані поодинокі розриви дають свій внесок в утворення дволанцюгових розривів, тому що останні можуть бути або наслідком поодинокі іонізації,

або співпадіння одноланцюгових розривів у комплементарних ланцюгах. Нарешті, існують експериментальні докази того, що і дволанцюгові розриви можуть репаруватися. Число ушкоджень азотистих основ ДНК лінійно залежить від дози. Репарація ДНК – основа нормального функціонування клітини, але повна репарація відбувається не завжди. Встановлено, що вже за дози 1 Гр у кожній клітині людини ушкоджується 5000 основ молекул ДНК та виникає 1000 поодиноких та 10-100 подвійних розривів, кожний з яких може призвести до різних наслідків [11]. Розрізняють три види репарацій. Безпомилкові репарації не викликають подальшого летального результату або мутацій. Вони відбуваються шляхом видалення ушкодженої ділянки ДНК та її заміни неушкодженими нуклеотидами, що призводить до відновлення нормальної структури ДНК. Помилкові репарації можуть викликати нелетальні або летальні мутації. Це відбувається за відсутності швидкої репарації ушкоджень. Вони мають місце під час реплікації ДНК і приводять до утворення пробілів у дочірніх нитках. Потім ці пробіли заповнюються відрізками материнської нитки ДНК під час рекомбінації, а виникаюча у такий спосіб пустота материнської нитки ДНК заповнюється шляхом репаративного синтезу. У цьому випадку ушкоджена ділянка фактично не репарується [11]. Неповна репарація відбувається, коли розриви у нитках ДНК не усуваються і ця нерепарована ДНК може бути не лише мутагенною, але й навіть летальною. Постреплікативна репарація не відіграє значної ролі в усуненні радіаційних ушкоджень ДНК у клітинах ссавців. Ліпіди. Ліпідні радіотоксини (ЛРТ) представляють собою комплекс продуктів окиснення ненасичених жирних кислот, гідроперексидів, альдегідів і кетонів. ЛРТ викликають реакції, характерні для променевого ураження: гальмування клітинного поділу, ушкодження хромосомного апарату і т.д. Тому ЛРТ є природним радіоміметиком – імітатором біологічної дії іонізуючого випромінювання. Вирішальну роль у початкових процесах променевого ураження відіграють ланцюгові реакції вільно-радикального типу, найбільш вдалим субстратом для яких є ліпіди. Оскільки ліпіди є структурними елементами мембран, їх ушкодження порушує хімізм живої клітини аж до її загибелі. Виникненню ланцюгових реакцій сприяє викликане опроміненням руйнування природних антиоксидантних систем, які захищають ліпіди від самодовільного окиснення

Розділ.2.Експериментальна техніка для вивчення явища фотолюмінесценції в розчинах біологічних макромолекул

Для досягнення успіху експерименту по вимірюванню спектру фотолюмінесценції потрібно приділяти увагу до деталей експерименту та до вивчення принципів роботи вимірювальних приладів. Також є багато потенціальних артефактів, які можуть спотворити дані. Світло може бути зареєстровано з високою чутливістю. Як результат, підсиленням у приладі можна звичайно одержати спостережуваний сигнал навіть тоді, якщо зразок взагалі не випромінює люмінесцентне світло. Ці сигнали, що спостерігаються при високих підсиленнях можуть бути пов'язані з ефектами, які до фотолюмінесценції не мають ніякого відношення, натомість вони можуть бути пов'язані з фоновою люмінесценцією з розчинника, відбитому та розсіяному в приладі світлу, емісії з оптичних компонентів, релєївському та раманівському розсіянню в зразку – якщо згадати тільки кілька факторів.

Зрозуміло, що нема ідеального спектрофлуорометра. Серійні прилади не забезпечують одержання дійсного спектру випромінювання або збудження. Це виникає за рахунок неоднорідного спектрального виходу джерела світла а також дисперсії самого монохроматора і детектора випромінювання. Поляризація або анізотропія випроміненого світла також впливає на однорідність ефективності детектування оскільки дисперсія ґратки залежить від поляризації світла. Дуже важливо розуміти і контролювати усі ці фактори. Ці інструментальні фактори можуть впливати на спектри випромінювання і збудження так само, як на вимірювання анізотропії і часу життя флуоресценції. В додаток до цього оптичні властивості зразка – такі як оптична густина і каламутність – також можуть впливати на спектральні дані.

З сучасними спектрофлуорометрами є можливість одержувати як спектри емісії так і спектри збудження. Спектр емісії це залежність інтенсивності люмінесцентного випромінювання від довжини хвилі цього ж випромінювання. Ця залежність вимірюється при одній і тій же довжині хвилі збуджуючого світла. І навпаки, спектр збудження це залежність інтенсивності випромінювання - при одній фіксованій довжині хвилі цього випромінювання – від довжини хвилі збуджуючого світла. Такі спектри можуть бути

представлені як залежні від довжини хвилі так і від частоти (хвильового числа) світла. Світло певної енергії може бути описано як довжиною хвилі λ , так і частотою ν або хвильовим числом. Звичайно довжину хвилі виражають в нанометрах, хвильові числа ж виражаються в обернених сантиметрах. Хвильові числа і довжини хвилі легко конвертуються одне в одне: наприклад 400 нм відповідає $(400 \times 10^{-7} \text{ см})^{-1} = 25000 \text{ см}^{-1}$. Представлення спектрів флуоресценції на шкалі хвильових чисел або довжин хвиль до цих пір є предметом дебатів. Згадаємо, що шкала хвильових чисел лінійна по відношенню до енергії світової хвилі В той же час більшість доступних комерційних спектрофлуорометрів подають спектри на шкалі довжини хвилі і тому ці спектри більш вживані а отже їх легше інтерпретувати візуально. Оскільки скориговані спектри не потрібні при рутинних дослідженнях і оскільки точно скориговані спектри важко знайти багато вчених використовують не кориговані спектри на шкалі довжини хвилі.

На рис.10 зображена схематична діаграма спектрофлуорометра загального призначення% цей прилад має ксенонову лампу за джерело збуджуючого випромінювання. Така лампа в загальному випадку часто використовується оскільки забезпечує високу інтенсивність випромінювання на всіх довжинах хвиль аж до 250 нанометрів. Зображений прилад має два монохроматори: один для виділення необхідної енергії збуджуючого світла, а другий для виділення смуги спостереження для випроміненого зразком світла. В цій схемі збуджуючий монохроматор має дві ґратки для того, щоби ефективніше виділяти необхідну довжину хвилі і ефективніше запобігати потраплянню на зразок світла від ксенонової лампи, що має інші значення довжини хвилі. До того ж, у цих монохроматорах застосовуються дифракційні ґратки з увігнутою поверхнею, що ще краще запобігає потраплянню прямого світла непотрібної довжини хвилі на зразок. Монохроматори оснащені моторами для забезпечення автоматичного сканування вибраного діапазону довжин хвиль. Люмінесценція реєструється фото помножувачем, сигнал якого після відповідної обробки його в електронних схемах дає інтенсивності світла на відповідних довжинах хвиль. Прилад, схема якого зображена на рисунку містить ряд оптичних модулів, що оточують комірку для зразка. Затвори служать для обмеження або взагалі перекриття доступу збуджуючого світла на зразок. На шляху збуджуючого світла може бути напівпрозоре дзеркало для відведення частини падаючого на зразок світла в еталонну комірку з стандартним стабільним флуорофором. Напівпрозорим дзеркалом служить оптичний кварц, що відбиває приблизно 4% падаючого на нього світла. Цієї кількості як правило достатньо для еталонного вимірювання. В еталонному каналі зазвичай міститься квантовий лічильник. Випромінювання від стандартного розчину обмежується смуговим фільтром і є пропорційним інтенсивності збуджуючого світла. Зміни в інтенсивності

дугової лампи можна виправити шляхом поділу інтенсивності випромінювання від зразка на інтенсивність випромінювання від еталонного флуорофору. Поляризатори присутні як на шляху збуджуючого, так і на шляху випроміненого світла. Як правило, поляризатори є знімними, так що їх можна вставляти коли потрібно вимірювання для дослідження анізотропії люмінесцентного випромінювання. Точне вимірювання анізотропії флуоресценції вимагає точного кутового розташування поляризаторів. Оптичний модуль, показаний на рис.10 має додатковий оптичний шлях з правого боку комірки для зразка. Цей шлях дозволяє вимірювати анізотропію флуоресценції методом T-формату. Існує багато випадків, коли цей додатковий світловий шлях є необхідним або зручним для виконання експериментів, але з використанням сучасної електроніки, як правило, не потрібно використовувати T-формат для вимірювання анізотропії. Сучасна тенденція полягає в тому, щоб використовувати невеликий компактний спектрофлуорометри з усіма оптичними компонентами в одному

корпусі. Такі інструменти прості в обслуговуванні, тому що є мало можливостей змінити конфігурацію. Однак модульний прилад має деякі переваги в спектроскопічній лабораторії. Наприклад, якщо ксенонова лампа та збуджуючий монохроматор можуть зніматися, то замість дугової лампи можна використовувати лазер в якості джерела збуджуючого випромінювання. У деяких випадках бажано обійти емісійний монохроматор і використовувати смугові фільтри для збору якомога більше випроміненого люмінесцентного світла. Такі експерименти можливо виконати, якщо емісійний монохроматор можна замінити. Якщо монохроматор не можна видалити, решітки можуть діяти як дзеркала, якщо встановлено нульовий порядок дифракції або нульову довжину хвилі. Якщо довжина хвилі встановлена на нуль, то монохроматор передає всі довжини хвилі. Можна використовувати фільтри для виділення потрібного діапазону довжин хвиль. Зручно, якщо інструмент має універсальний тримач зразка. Якщо дослідження передбачає вимірювання анізотропії, то часто потрібно вимірювати фундаментальне значення анізотропія (r_0) за відсутності обертальної дифузії. Це досягається при низькій температурі, як правило, $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ в гліцерині. Низька температура може бути досягнута тільки в тому випадку, якщо тримач зразка має відповідний розмір для високої швидкості потоку охолоджуючої речовини, має хороший тепловий контакт з кюветою та ізольований від решти інструменту. Багато тримачів кювет можуть підтримувати температуру близької кімнатної, але не в змозі підтримувати температуру набагато вище або нижче цього значення. Ще одна корисна функція - це можливість розміщення оптичних фільтрів на шляху збуджуючого або випроміненого світла. Фільтри часто потрібно для видалення

небажаної довжини хвилі в промені збудження, або видалити розсіяне світло з емісійного каналу.

Дамо основні вимоги до спектрофлуориметрів. В ідеальному випадку записані характеристики збудження та випромінювання представлятиме відносно інтенсивність фотонів на певному діапазоні довжин хвиль. Для отримання таких «виправлених» спектрів випромінювання окремі компоненти повинні мати такі характеристики:

- 1) джерело світла має давати постійний фотонний вихід на всіх довжинах хвиль;
 - 2) монохроматор повинен пропускати фотони всіх довжин хвиль з однаковою ефективністю;
 - 3) робота монохроматора має бути незалежною від стану поляризації;
- і нарешті
- 4) детектор (фотопомножувач) повинен виявляти фотони всіх довжин хвиль з рівною ефективністю.

Ці характеристики ідеальних оптичних компонентів показано на рисунку 11. На жаль, джерела світла, монохроматори та фотопомножувачі з таким ідеальним характеристиками не існують. В результаті експериментатор змушений йти на компроміс щодо вибору компонентів і корекції неідеальної реакції приладу. Цікаво відмітити, що абсорбційний спектрофотометр містить ті ж самі компоненти, то чому можливо одержувати коректні спектри поглинання? При реєстрації спектру поглинання кількість світла, що пропускається зразком, вимірюється відносно того, що передається еталоном. Порівняльні вимірювання виконуються одними і тими самими компонентами на одній і тій же довжині хвилі світла. Не ідеальна поведінка компонентів компенсується під час таких вимірювань. Напроти, вимірювання інтенсивності флуоресценції – виконуються абсолютні вимірювання, а не відносні. Порівняння флуоресценції зразка з еталонним флуорофором не є корисним, оскільки еталонний флуорофор, в принципі, не відображає сигнал. Крім того, слабкий сигнал фону має невідомий спектральний розподіл, і таким чином, не може використовуватися для корекції залежності оптичних компонентів від довжини хвилі світла. В той же час, доступна – взагалі то – обмежена кількість стандартних спектрів, що можуть бути використані для корекції.

2.2. Основні технічні характеристики спектрофлуорофотометра Shimadzu RF-6000

В даному дослідженні вимірювання фотолюмінесценції водних розчинів азотних основ і пресованих твердих зразків валіну здійснювалися спектрофлуорофотометром Shimadzu RF-6000 (рис.12). Поєднуючи нові технології з тими, які розвивалися протягом тривалої історії Shimadzu, спектрофлуорофотометр Shimadzu RF-6000 одержав певні переваги у порівнянні з продукцією інших фірм. Програмне забезпечення LabSolutions RF, розроблене для досягнення високої точності вимірювань і простоти роботи, RF-6000 пропонує максимальну продуктивність для фотолюмінесцентних вимірювань. При цьому забезпечується розширена чутливість і динамічний діапазон вимірювань, є можливість досліджувати хемілюмінесценцію та електролюмінесценцію. У приладі є функція високошвидкісного 3D-сканування для швидкого отримання 3D-спектрів. Можна сканувати спектри збудження та випромінювання зі спектральною корекцією. Доступні вимірювання квантового виходу флуоресценції та квантової ефективності флуоресценції. Прилад забезпечує найвищий рівень SNR у своєму класі: 1000 або більше (RMS) /350 або більше (P-P). Також доступне високошвидкісне сканування 60 000 нм/хв., що мінімізує час сканування. Ксенонова лампа з тривалим терміном служби до 2000 годин є економним джерелом випромінювання. Розширений діапазон PMT забезпечує діапазон довжин хвиль сканування до 900 нм. Просте у використанні програмне забезпечення LabSolutions RF спрощує аналіз результатів вимірювань: включені в програму процедури перевірки, рядок стану в LabSolutions RF вказує на стан лампи та аксесуарів, велика комірка для зразків для всіх аналітичних потреб.

Для вимірювання квантової ефективності флуоресценції світловипромінювального шару використовували інтегруючу сферу Spectralon діаметром 100 мм (рис.13) Використання програми для вимірювання квантової ефективності: програмне забезпечення LabSolutions RF дозволяє визначити квантову ефективність флуоресценції легко використовуючи інтуїтивно зрозумілі програмні команди.

На додаток до твердих зразків і порошку, в інтегруючій сфері може закріпити кювету для вимірювання рідких зразків.

В приладі забезпечена функція спектральної корекції (включено стандартно), що дозволяє відображати виправлені спектри в режимі реального часу! Функція спектральної

корекції для отримання істинних спектрів збудження та флуоресценції визначається шляхом коригування функції приладу для характеристик приладу, наприклад емісійні характеристики джерела світла і спектральні характеристики оптичної системи, є включений стандарт. Оскільки справжні спектри можна отримати в режимі реального часу, отримані спектри можна легко порівняти зі спектрами, виміряними за допомогою інших приладів. Функції спектральної корекції визначаються за допомогою каліброваного стандартного джерела світла та запатентованими методами корекції Shimadzu. Якщо в якості аксесуара встановлена інтегруюча сфера, функція створення спектральної корекції функції включені стандартно; це позбавляє від необхідності встановлення спеціального джерела світла. Розглянемо спектральну корекцію. Нехай певний зразок мав два піки флуоресценції. Коли цей зразок вимірювали за допомогою приладів А і В, пік інтенсивності флуоресценції був вище для лівого піку з інструментом А, тоді як правий пік був вищим для інструменту В. Насправді інтенсивність спектрального піку та позиції відрізнялися, оскільки прилади А та В мали різні характеристики випромінювання джерела світла та спектральні характеристики оптичної системи. Виправлення спектрів шляхом віднімання різниці в характеристиках джерела світла та оптичної системи призвело до тих самих спектрів, що показує, що два піки послідовно збільшуються в міру збільшення довжини хвилі. Порівнюючи спектри, виміряні різними приладами, не можна ігнорувати ефекти відмінностей в характеристиках приладів. Також визначення істинного спектру відбувається з врахуванням наступного: спектр флуоресценції і спектр збудження, записані спектрофотометром є результатом збудження зразка монохроматичним світлом, що виходить від джерела світла (ксенонової лампи) і монохроматора збудження, а також вимірювання флуоресценції, що випромінюється зразком за допомогою емісійного монохроматора та детектора. Це означає, що спектр флуоресценції містить обидві спектральні характеристики: емісійного монохроматора і спектральної характеристики чутливості детектора. Спектр збудження включає в себе як спектральні характеристики джерела світла та спектральні характеристики монохроматора збудження. Тому спектр, що складається з спектральних характеристик монохроматорів і інші компонент, що містяться в спектрофотометрі, та перекриваються називаються видимим спектром. Якщо не зазначено інше, спектри, що виводяться зі спектрофотометрів, як правило, є видимими спектрами. Для таких видимих спектрів виникають перераховані нижче проблеми, навіть якщо відбувається повторне вимірювання того самого зразка:

- спектри будуть відрізнятися між інструментами від різних виробників і між різними моделями одного виробника;
- спектри будуть змінюватися з часом навіть для одного і того ж інструменту.

Тому при порівнянні даних, представлених у дослідженнях або на наукових конференціях, або порівнюючи дані, виміряні за допомогою інших приладів, порівняння необхідно виконувати за допомогою істинних спектрів, які виключають усі ці небажані спектральні характеристики.

В приладі RF-6000 є вбудована функція корекції різних спектральних характеристик під час вимірювання, щоб забезпечити одержання істинних спектрів. Це означає, що інструмент призначений для негайного отримання істинних спектрів шляхом виконання автоматичної корекції після вимірювання за допомогою відповідної функції корекції (Рис.14).

Основні технічні характеристики приладу такі:

Таблиця 1. Технічні характеристики приладу Shimadzu RF-6000.

Показник	Значення
Джерело збуджуючого випромінювання	150 W ксенонна дугова лампа.
Комірка для ксенонової лампи	Самостійна деозонація
Монохроматори	Бік випромінювання: увігнуті голографічні дифракційні ґратки, 1300 штрихів на мм, F/2.5 Бік збудження: Off-plane оптична система, Максимальна ефективність дифракційної ґратки: 350 нм. Випромінювання: In-plane оптична система, Максимальна ефективність дифракційної ґратки: 400 нм.
Діапазон довжин хвиль	200 – 900 нм (0 – пряме світло)
Інтервал вимірювання довжини хвиль світла	200 – 900 нм
Спектральна ширина щілини	Збудження: 1.5, 3, 5, 10, 15, 20 нм Випромінювання: 1.0, 3, 5, 10, 15, 20 нм
Роздільна здатність, Випромінювання	1.0 нм
Точність установки довжини хвилі	±1.0 нм
Повторюваність установки довжини хвилі	±0.2 нм

Швидкість сканування	Приблизно від 60,000 до 20 нм/хв., Вибір з 9-ти значень.
Відношення сигнал /шум	S/N відношення для Раманівського піку дистильованої води: 350. (p-p), 1,000. (RMS). Довжина хвилі збудження: 350 нм. Спектральний діапазон: 5 нм як для збудження так і випромінювання. Відгук: 2 секунди.
Компенсація джерела світла	Метод операції порівняння моніторингу монохроматичного світла
Детектори	Сторона моніторингу збуджуючого світла: силіконовий фотодіод Сторона випромінювання: фотопомножувач R928
Вибір чутливості 2 – кроковий вибір	Висока, низька чутливості, та автоматичний вибір

Важливі моменти, які потрібно враховувати під час флуориметричного аналізу. По – перше це вплив температури зразка. В ряді випадків, у багатьох зразках кожне підвищення температури зразка на 1 °С призводить до втрати на від 1% до 2% в інтенсивності флуоресценції, хоча це залежить від типу зразка. Повідомляється, що в деяких біохімічних зразках ця зміна флуоресценції приблизно на 10%, інтенсивність у відповідь на зміну температури на 1 °С. Зразки, фотолюмінесценція яких сильно залежить необхідно перевірити в тримачі кювети із стабілізованою температурою. *По – друге* це фотохімічна реакція зразків. Під впливом світла збудження в певних зразках виникають фотохімічні реакції, що призводить до зміни інтенсивності флуоресценції. Випробування таких зразків повинно відбуватися разом з регулюванням затвору, щоб піддавати зразок впливу світла збудження лише на час вимірювання. Інші методи також включають в себе вибір найшвидшої доступної швидкості сканування для вимірювання спектру та вибору вузької спектральної смуги збуджуючого світла. *По – третє*, це флуоресценція домішок. Піки, викликані флуоресцентними компонентами, відмінними від компонента, що є предметом дослідження. Так вимірний спектр флуоресценції називають флуоресценцією від домішок. Флуоресценція від домішок пов'язана з (1) розсіяним світлом і його світлом

другого порядку, (2) Раманівське розсіяне світло розчинника і (3) флуоресценція від розчинника або комірки. (1) і (2) обговорюються в далі. Для (3), комерційно доступних сортів реагентів часто виявляють флуоресценцію, викликану наявністю домішок у розчиннику. Треба мати на увазі, що тестування з високою чутливістю в ультрафіолетовій області особливо чутливе до впливу флуоресценції розчинника. Нефлуоресцентні розчинники для флуоресцентного аналізу є комерційно доступними. Потрібно або придбати такі розчинники, або очистити будь-які застосовувані розчинники самостійно. Кварцові кювети загального користування продукують слабку флуоресценцію, коли вони збуджені світлом довжиною хвилі близько 260 нм через домішки (алюміній), властиві кварцу. Тому зокрема, при вимірюванні зразків зі слабкою флуоресценцією, при збудженні в ультрафіолетовій області, рекомендується використовувати кювети виготовлені із синтетичного кварцу. По – четверте: необхідно враховувати ефекти розсіяного світла. Під час зняття спектральних кривих флуоресценції можуть спостерігатися піки, викликані розсіяним світлом і раманівським розсіюванням, на додаток до компонентів флуоресценції, що представляють основний інтерес. Розсіяне світло пов'язане з розсіюванням світла молекулами розчинника (розсіювання Релея) або частинками або бульбашками повітря; все це світло зрештою потрапляє у вхідну щілину емісійного монохроматора. Розсіяне світло особливо проявляється при дослідженні твердих зразків. Ці піки легко розрізнити, оскільки вони з'являються на довжина хвилі світла збудження. Завдяки характеристикам монохроматорів, які використовують дифракційні решітки, це розсіяне світло також з'являється в областях довжини хвилі, що кратні основній довжині хвилі збудження (порядки дифракційної ґратки збуджуючого монохроматора) – ці піки мають назву світло другого порядку, третього порядку іт.д. Наприклад, коли довжина хвилі збудження становить 220 нм, світло другого порядку з'являється на 440 нм, а світло третього порядку на 660 нм на спектрі флуоресценції. Щоб фільтрувати це світло, вимірювання виконують за допомогою короткохвильового обрізаючого фільтру, що встановлюється в тримач фільтрів на стороні монохроматора випромінювання, який блокує світло близьке до 220 нм. Якщо такі ефекти розсіяного світла стають проблемою, то слід використовувати додатковий набір оптичних фільтрів. Комбінаційне розсіювання з'являється, коли розчин має раманівську активність. Хоча пік в результаті від раманівського розсіювання також з'являється на довжинах хвиль, більших, ніж світло збудження, однак інтенсивність піку від раманівського розсіювання істотно не змінюється коли змінюється концентрація розчину. Також, коли довжина хвилі збудження зміщується, положення піку від комбінаційного розсіювання змінюється, але положення піку флуоресценції при цьому не змінюється. Тому можна розрізнити пік флуоресценції

і пік у результаті раманівського розсіювання. В таблиці 2 представлені дані по раманівському розсіянню деяких розчинників, що часто використовуються на практиці.

Таблиця 2. Дані по комбінаційному розсіюванню деяких розчинників

Довжина хвилі збуджуючого світла (нм)	Розчинники і довжини хвиль Раманівських піків (нм)				
	Вода	Етанол	Циклогексан	Тетрахлорид вуглецю	Хлороформ
248	271	267	267	-	-
313	350	344	344	320	346
365	416	409	408	375	410
405	469	459	458	418	461
436	511	500	499	450	502

По – п’яте. При дослідженні зразків з високою концентрацією флуоресцентної речовини у розчині треба враховувати можливість появи певних похибок вимірювання. Звичайні спектрофотометри призначені для виявлення флуоресценції, що випромінюється з центру вимірювальної комірки (кювети). Це означає, що якщо концентрація зразка занадто висока, то збуджуюче світло може поглинатися навколо входу в комірку (тобто на поверхні зразка), тим самим перешкоджаючи тому, щоб збуджуюче світло поглиналося в його об’ємі – тобто в центрі вимірювальної комірки. Це призводить до зниження інтенсивності флуоресценції. Крім того, короткохвильове світло флуоресценції, що випромінюється з центру зразка може повторно поглинатися зразком, викликаючи видиме зміщення спектру у напрямку до більших довжин хвиль. Ці явища зазвичай не виникають, коли поглинання зразка становить 0,05 абс. одиниць, у вимірювальній комірці з довжиною оптичного шляху 10 мм або менше. Якщо вимірювання зразків у високих концентраціях неминуче, необхідно проводити вимірювання з використанням трикутної комірки (кювети у вигляді трикутної призми), або шляхом приєднання тонкої комірки до тримач твердих/порошкових зразків. За Фостером співвідношення між інтенсивністю люмінесценції на певній довжині хвилі, що випромінюється з однієї точки розчину і концентрацією флуорофору в цій точці виражається формулою:

$$dB(\lambda') = \frac{\rho}{4\pi n^2} E_{\lambda} F_{\lambda}(\lambda') K_{\lambda} d\lambda' \quad (3)$$

$dB(\lambda')$: Інтенсивність флуоресценції, з певної точки розчину на довжині хвилі λ' – інтегральна інтенсивність люмінесценції $B(\lambda') = \int dB(\lambda')$;

n : індекс рефракції;

ρ : коефіцієнт відбивання;

E_{λ} : Інтенсивність збуджуючого світла на довжині хвилі λ ;

$F_{\lambda}(\lambda')$: Істинна інтенсивність флуоресценції з точки розчину на довжині хвилі λ' при збудженні на довжину хвилі λ ;

K_{λ} : Поглинання в точці розчину на довжині хвилі λ ;

$d\lambda'$: Диференціальний інтервал довжин хвиль λ' .

Оскільки поглинання пропорційна концентрації C то інтегруючи рівняння $B(\lambda') = \int dB(\lambda')$ одержимо: $B(\lambda') = KC$. Отже калібрувальна крива – пряма лінія: Рис.15 а). Коли концентрація зростає то калібрувальна крива має вигляд як на Рис.15 б). По - шосте. Внаслідок забруднення вимірювальної комірки (кювети), або тримача твердих/порошкоподібних зразків може виникнути додаткова систематична похибка вимірювань. Зокрема, якщо зразок залишити в камері, він може прилипнути до внутрішніх поверхонь кювети під час випаровування розчинника. При вимірюванні сильно розведених зразків, зовнішні поверхні, а також внутрішні поверхні комірки стають проблемними. Якщо речовина флуорофору прилипла до зовнішньої поверхні комірки, то треба ретельно очистити кювету перед виконанням. По – сьоме. Про вплив розчиненого кисню. Розчинений кисень у розчиннику зазвичай має ефект гасіння флуоресценції. Деякі зразки виявляють значне гасіння. Для уникнення цього ефекту розчинник перед розчиненням в ньому матеріалу флуорофору слід піддати дегазації. До методів дегазації відноситься введення газоподібного азоту в розчинник або зниження тиску у розчиннику за допомогою вакуумного насосу.

Для ілюстрації наведених факторів по кажемо результати вимірювання спектру збудження і випромінювання для водного розчину саліцилату натрію (Рис.16). На Рис.16 а) показаний спектр флуоресценції водного розчину саліцилату натрію вимірюного з довжиною хвилі збудження, встановленою на 282 нм. Як правило, спектри флуоресценції розведених розчинів містять перекриття різноманітних спектрів випромінювання на додаток до флуоресценції зразка. На рисунку 16 а) показано спостережуване світло збудження, яке було розсіяне (релеївське розсіювання) за рахунок молекул і домішок в розчиннику, відповідне світло другого і третього порядку, також видно Раманівське

розсіювання світла розчинника, флуоресценція розчинника і домішок, і флуоресценція саліцилату натрію. На наступному рисунку (Рис.16 б)) показаний спектр збудження водного розчину саліцилату натрію вимірної з довжиною хвилі флуоресценції, встановленою на 405 нм. Пікова довжина хвилі 302 нм - це довжина хвилі, при якій збудження призведе до найвищої ефективності збудження та найсильнішої флуоресценції. Пік 405 нм свідчить про розсіювання світла збудження.

Розглянемо коротко будову апарату Shimadzu RF-6000 та його оптичну схему. Структурна схема приладу зображена на Рис.17. З ксенонової лампи світло потрапляє в 1 — монохроматор збудження. Збуджуюче світло отримують шляхом обрізання спектральної смуги навколо конкретної довжини хвилі від світла ксенонової лампи. Так як збуджуюче світло повинно бути щонайяскравішим для підвищення чутливості спектрофлуорофотометра тому монохроматор містить дифракційну ґратку з максимальною величиною апертурою для збору щонайбільшої кількості світла. 2 — вимірювальна комірка. 3 — емісійний монохроматор. Інтенсивність флуоресценції, що випромінюється з зразка вимірюється за допомогою фотопомножувача. Цей монохроматор має дифракційну ґратку розмір якого такий же, як у монохроматора збудження, для того щоб зібрати найбільшу можливу кількість світла. 4 — кремнієвий фотодіодний детектор, який використовується для контролю інтенсивності світла збудження, яким опромінюється зразок. Звичайно в спектрофлуорофотометрі використовуються ксенонові дугові лампи. Можуть також бути використаними дейтерієві лампи та деякі інші. Ксенонові лампи випромінюють дуже інтенсивне світло і забезпечують опромінення зразка світлом, що включає довжини хвиль в ультрафіолетовому і видимому діапазоні. Однак, оскільки є фактор нестабільності в емісії світла від ксенонової лампи, флуоресценція, записана емісійним монохроматором на 3, містить коливання інтенсивності випромінювання ксенонової дугової лампи, що реєструється як шум. Щоб дещо пом'якшити таку проблему, вимірювані значення завжди визначаються за допомогою операції порівняння між вимірним значенням флуоресценції, записаним на 3, і вимірним значенням, що фіксується монітором інтенсивності світла. На рисунку 18 зображена оптична схема приладу. Дугова ксенонова лампа 150 Вт (1) використовується як джерело світла, а в корпусі лампи використовується система деозонування, яка затримує озон і для цього використовує тепло, що виділяється всередині корпусу. Яскрава пляма світла ксенонової лампа збільшується еліпсоїдним дзеркалом (2) і дзеркалом (3) направляється на вхідну щілину (4) емісійного монохроматора. Світло збудження, розсіяне увігнутою дифракційною ґраткою (5) проходить через вихідну щілину і зосереджується на центр тримача зразка, що знаходиться у вимірювальній комірці для

вимірювання зразка за допомогою сферичного дзеркала (6). Увігнута дифракційна ґратка, що використовується в монохроматорі, є високоефективною голографічною ґраткою, розробленою за власною технологією Shimadzu. Дифракційна ґратка такої ж форми також використовується на стороні випромінювання. Між сферичним дзеркалом (6) і вимірювальною коміркою знаходиться кварцова пластина (7) для наведення світла збудження до детектора, що здійснює моніторинг інтенсивності збуджуючого світла з метою виконання компенсації джерела світла. В якості пристрою, що здійснює цей моніторинг використовується кремнієвий фотодіод. Флуоресценція, що випромінюється з зразка, конденсується сферичним дзеркалом (8) у вхідній щілині (9) емісійного монохроматора. Флуоресцентне світло потім диспергується увігнутою дифракційною ґраткою (10) і зосереджується увігнутим дзеркалом (11) на поверхню прийому світла фотопомножувача (12). У RF-6000 використовується оптична система off-plane для того, щоб монохроматор збудження виключав якомога більше зайвого світла. Ні в монохроматорі збудження, ні випромінювання не використовуються будь-які лінзи. Це дозволяє зменшити хроматичну аберацію і реалізує оптичну систему, яка може ефективно вимірювати флуоресцентне світло на всіх довжинах хвиль.

Розділ.3. Результати вимірювань та їх інтерпретація

3.1.Валін

Валін ($C_5H_{11}NO_2$) – це проста аліфатична неполярна α -амінокислота, яка є однією з незамінних амінокислот та головних компонентів росту і синтезу тканин тіла людини. Він може існувати у вигляді різних конформерів за рахунок наявності асиметричного атому вуглецю C_α . Належить до гідрофобних сполук. Валін містить амінну групу і дві метильні групи – CH_3 , однак не має характерної для більшості амінокислот ланцюжкової структури. Деструкція валіну може відбуватися по лінії зв'язків N-C та C-C, залишаючи незмінними структурні сегменти CH_3 і NH_2 [23].

Аліфатичні амінокислоти можуть бути використані як модельні системи у задачі дослідження процесів взаємодії іонізуючого випромінювання з більш складними біомолекулярними комплексами (білками, пептидами). Кінцевий дефектний стан опроміненої речовини визначається як конкуруючими процесами їх поелементної деструкції під дією високоенергетичних ядерних частинок, так і відновленням структури внаслідок самоорганізації, хімічної взаємодії, кластеризації структурних сегментів. На цьому шляху можливим є утворення нових структурних комплексів із вихідних компонент та реалізації нових хімічних і біологічних властивостей модифікованих матеріалів. Крім того, в результаті такої взаємодії завжди виникають вторинні частинки, зокрема хімічні радикали або електрони з енергією до 20 eV, які можуть спричинити появу структурних дефектів в біоб'єктах, якщо їх енергії буде достатньо для збудження, іонізації або дисоціації, що може спричинити додаткові пошкодження [24].

Враховуючи складну кінетику радіаційного дефектоутворення біоорганічних сполук та наявність різних каналів відновлення структури можна сподіватися, що кінцевий стан опроміненої речовини буде залежати від поглинутої дози, температури та способу деструкції речовини. Останнє визначається багатьма параметрами, серед яких

інтенсивності пучків іонізуючої радіації, тип ядерних частинок та умови опромінення. Умовно це можна зобразити у вигляді конфігураційної діаграми (Рис.19), що відображає наявність набору метастабільних станів органічного полімеру з конфігураційними координатами $\{R_n\}$, що фіксують стан його структурної доскональності. Потенціальні бар'єри, що розділяють метастабільні стани, визначаються енергією перемикання хімічних зв'язків щоб реалізувати новий метастабільний стан, який буде мати свій час життя τ . Тому можна стверджувати, що після опромінення стан біоорганічного об'єкту характеризується набором часів релаксації $\{\tau_i\}$, кожен із яких залежить від його хімічного складу та структури. Роль радіації зводиться до формування масиву дискретних елементарних сегментів, атоми у яких з'єднані сильними іонно – ковалентними зв'язками. Зворотні процеси самоорганізації молекули схожі на відомий ефект Лего – використання структурних сегментів як пазлів для відновлення структури опромінених органічних полімерів. Раніше це було встановлено в радіаційних експериментах на мікротроні М-30 для водних розчинів глюкози / сахарози [34].

При цьому може порушитися відоме правило «доза – ефект», коли при однаковій дозі опромінення кінцевий дефектний стан речовини буде різний. Це зумовлено тим, що в процесах самоорганізації опромінених органічних матеріалів існують різні канали релаксації їх дефектного стану та набір метастабільних станів зі спектром часів життя $\{\tau_i\}$. В даній роботі представлено результати вимірювання спектрів люмінесценції валіну у порошкоподібній формі для запобігання можливих структурних змін його молекул під час виготовлення наприклад водних розчинів. Як об'єкт досліджень використано Л-валін марки «ЧДА» виробництва КНР чистотою 99,3%ю Зразки були виготовлені методом пресування у вигляді таблеток діаметром 25 мм і товщиною речовини 1 мм. Збуджували зразок світлом довжиною хвилі 275 нм. При цьому на вихідну щільність випромінюючої частини приладу встановлювали світлофільтр U-340 (смуга пропускання світла 200-400 нанометрів, коефіцієнт пропускання 45%). Для запобігання потрапляння відбитого світла та розсіяного від зразків світла перед світлоаналізуючою частиною встановлювався світлофільтр L-42. (пропускання світла 92%). На рис. 20 показані спектри люмінесценції в діапазоні довжин хвиль 500-700 нм для зразків Л-валіну, фруктози та чорної поверхні тримача зразка, який входить до комплекту приладу РФ-6000. Видно, що спектр люмінесценції Л-валіну має найбільший квантовий вихід та містить широку смугу з максимумом поблизу 622 нм, на відміну від спектру порошкоподібного зразку фруктози. Прояв невеликого максимуму поблизу 557 нм на всіх спектрах пов'язане з розсіянням світла лампи. Для вивчення впливу можливих змін спектрів люмінесценції під дією

високоенергетичного опромінення зразки валіну були опромінені на мікротроні М-30 прискореними електронами при кімнатній температурі. Поглинуті дози склали 11,2 кГр, 46 та 76,7 кГр. Результати показані на рис.21. Видно, що опромінення валіну електронами загалом приводить як до зміни інтенсивності випромінювання так і до зміни форми спектру, особливо в його довгохвильовій частині. Звертає на себе увагу той факт, що найменша інтенсивність випромінювання в максимумі при 622 нанометри спостерігається для зразка з отриманою дозою 46 кілогрей а не 78,7 кілогрей. Це свідчить про складну залежність конфірмаційних змін у Л-валіні від величини отриманої дози, що потребує подальшого дослідження. На підставі цього факту нами висунуто припущення, що можлива реалізація різних кінцевих дефектних станів валіну після релаксації при отриманні однієї дози опромінення за різні проміжки часу. Для дослідження цього питання на мікротроні М-30 був проведений радіаційний експеримент зі зразками валіну. Опромінення відбувалося при кімнатній температурі. Енергія прискорених електронів становила 12,5 МеВ, а інтегральний потік частинок - $5,625 \cdot 10^{13}$ електронів на см^2 , що відповідає поглинутій дозі 14 кГр. Експеримент проводиться у два етапи, при різних щільностях потоків частинок: $4,37 \cdot 10^{11}$ та $6,25 \cdot 10^{10}$ ел./ см^2 , тобто, їх щільності відрізняються в понад 7 разів! Температура зразків контролювалася термopарою та залишалася незмінною. На рис. 22 наведені спектри люмінесценції зразків, опромінених дозою 14 кГр за три хвилини та 12 хвилин.

Видно, що суттєвої зміни структури інтенсивності випромінювання не спостерігається, проте має місце зміна форми довгохвильової частини спектру. Це свідчить про те, що кінцевий дефектний стан опроміненого валіну визначається не лише поглинутою дозою, але і умовами опромінення, зокрема, щільністю потоку ядерних частинок. Потрібно виконати подальші дослідження.

3.2. Азотисті основи

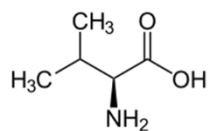
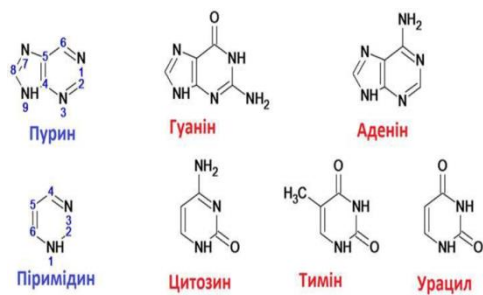
Наступним кроком дослідження впливу опромінення на біоорганічні молекули стало дослідження фотолюмінесценції азотистих основ нуклеотидів ДНК/РНК. Квантовий вихід фотолюмінесценції ДНК складає $10^{-4} - 10^{-5}$, тобто суттєво нижче ніж у більшості ароматичних люмінофорів внаслідок складної структури цієї сполуки і прояв різних процесів гасіння фотолюмінесценції. У зв'язку з цим відчутну фотолюмінесценцію вдавалося зафіксувати тільки при низьких температурах. Край фундаментального поглинання в ДНК/РНК та нуклеотидів складає 266 нм. Цією довжиною хвилі характеризується і край фундаментального поглинання нуклеотидів та азотистих основ. Зареєстровані до цих пір спектри фотолюмінесценції ДНК при низьких температурах спостерігається на довжинах хвиль 400-600 нм. Слід відмітити, що фотолюмінесценція в азотистих основах спостерігається також в цьому інтервалі довжин хвиль. Це свідчить про те, що в фотолюмінесценцію ДНК/РНК основний вклад вносять саме ці азотисті основи. Результати наших вимірювань фотолюмінесценції азотистих основ показані на Рис. 23,24,25,26. Збудження зразків здійснювалося на довжинах хвиль 250,0 нм, 275,0 нм, 300,0 нм, 325,0 нм, 350,0 нм. Вимірювання здійснювались при кімнатній температурі. Це наклало певні обмеження на фотолюмінесценцію, спричинюючи її достатньо інтенсивне температурне гасіння. Велика кількість спектральних досліджень присвячено пуриновим та піримідиновим основам, що входять до складу ДНК і РНК. Ці дослідження спрямовані на глибше вивчення будови основ нуклеїнових кислот і природи хімічних зв'язків і міжмолекулярної взаємодії. Важлива інформація міститься в електронно-вібраційних спектрах. Виражена вібраційна структура вібронних спектрів урацилу, тиміну (5-метилурацил), і цитозину в експериментальних спектрах. Вони демонструють появу однієї (урацил і тимін) або двох (цитозин) вібраційних коливань, що відповідають абсолютно симетричним коливанням піримідинового кільця. Як можливе пояснення складної

структури смуги поглинання цитозину, висуваються дві гіпотези: або дві таутомерні форми можуть виникати одночасно, або в цьому діапазоні спостерігається перехід $n \rightarrow \pi$. Спостережувані електронно-вібраційні смуги мають значну напівширину (~200 нм) що. Крім того, значення інтервалів між максимумами смуг мають дуже великий розкид (наприклад, для урацилу – 250 – нм). Це примушує сумніватись щодо інтерпретації спектральних ознак як однієї (або двох) вібрацій і наводить на думку що спостережувану закономірність можна пояснити комплексом коливальна структура кожної з цих смуг.

ВИСНОВКИ

- 1. Освоєно експериментальну методику для вивчення явища фотолюмінесценції в твердих та рідких зразках за допомогою приладу Shimadzu RF-6000.**
- 2. Для вивчення модельного випадку виконані експериментальні дослідження валіну, що був підданий різним дозам радіації на протязі різного часу.**
- 3. Дослідження свідчить про складну залежність конформаційних змін у L-валіні від величини отриманої дози, що потребує подальшого дослідження. На підставі цього факту нами висунуто припущення, що можлива реалізація різних кінцевих дефектних станів валіну після релаксації при отриманні однієї дози опромінення за різні проміжки часу. Експеримент проведений на мікротроні М-30 підтверджує це припущення.**
- 4. Виконані експериментальні дослідження фотолюмінесценції водних розчинів азотистих основ. Дослідження необхідно продовжити опроміненням цих молекул та подальшого дослідження в них явища фотолюмінесценції.**

Рисунки



Валін

Рис. 1. Пуринові (А, G) і піримідинові (С, Т) азотисті основи, що входять до складу ДНК.

Наведено стандартну нумерацію атомів [1].

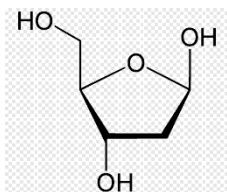


Рис. 2. Дезоксирибоза [3].

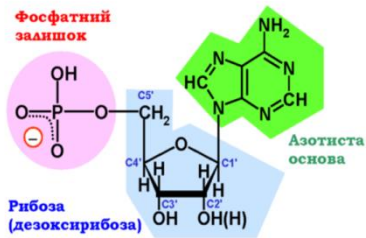


Рис. 3. Нуклеотид (дезоксиденозинмонофосфат, АМР). Зображено стан іонізації фосфату при $\text{pH} > 6$ [3].

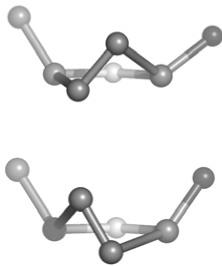


Рис. 4. Дві переважні конформації пентозного кільця у складі нуклеїнових кислот [5].

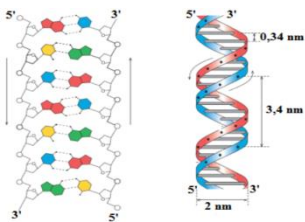


Рис. 5. Схематична будова первинної та вторинної структури ДНК за моделлю Френсіса Кріка і Джеймса Уотсона [5].

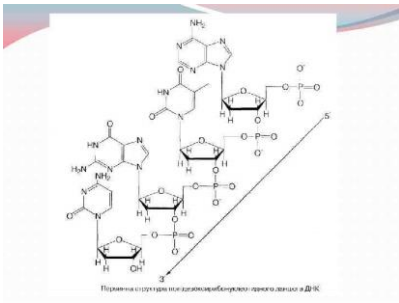
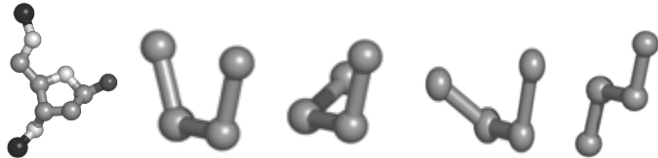


Рис. 6. Полінуклеотидний ланцюг [5].



цис (0°) гош+ ($+60^\circ$) гош- (-60°) транс ($\pm 180^\circ$)

Рис. 7. Кути обертання (за номенклатурою IUPAC), що визначають конформацію нуклеотиду в складі полінуклеотидного ланцюга. Праворуч показано кілька конформацій, що відповідають різним значенням кута обертання навколо зв'язку між атомами 2 і 3: у цис-конформації кут дорівнює 0° , позитивне значення кута відповідає обертанню атома 4 відносно атома 1 за годинниковою стрілкою, якщо дивитись у напрямку від атома 2 на атом 3 [5].

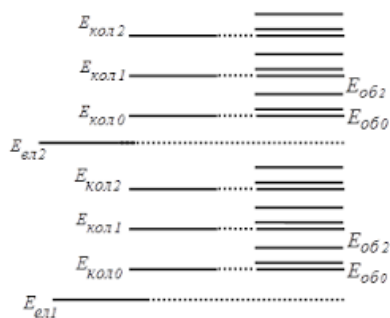
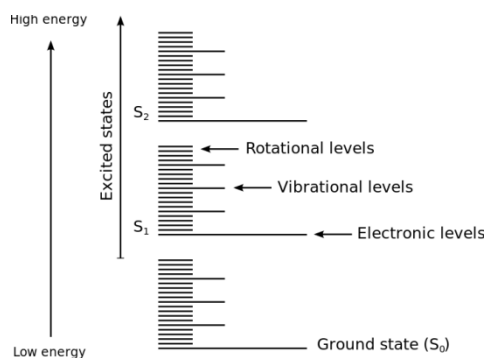


Цукрофосфатний остов

Пари азотистих основ

Рис. 8. Приклад подвійної спіралі ДНК: кристалічна структура додекамеру d(CGCGAATTCGCG) 2 (код PDB 355D).

а)



б)

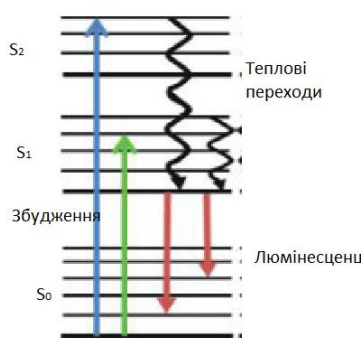


Рис. 9. Енергетичні рівні молекули а), та діаграма Яблонського б)

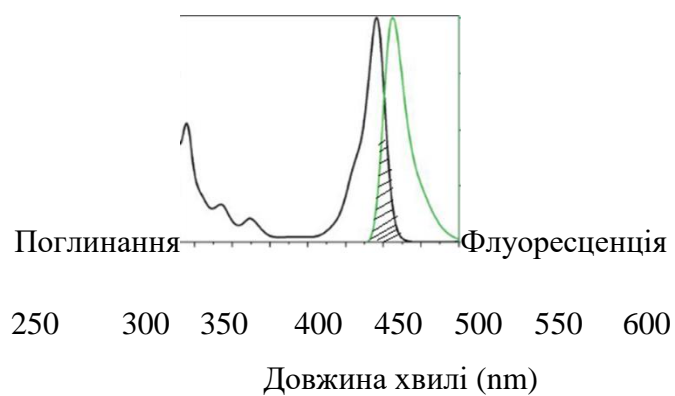


Рис. 10. Правило Стокса. Чорна лінія – спектр поглинання, зелена лінія – спектр флуоресценції. Заштрихована ділянка – антистоксівська область.

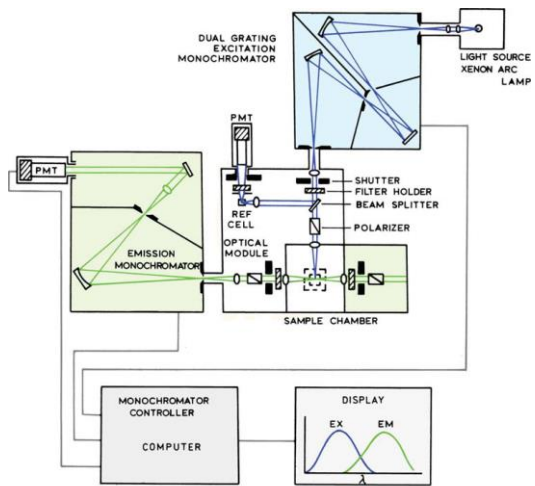


Рис. 11. Схема узагальненого спектрофлуорометра.



Рис. 12. Спектрофотофлуориметр Shimadzu RF-6000



Рис.13. Інтегруюча сфера Spectralon діаметром 100 мм.

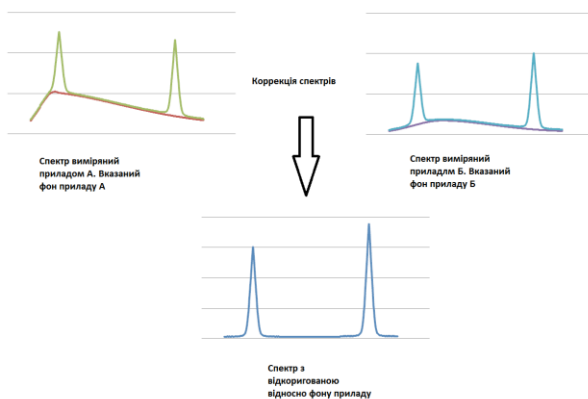


Рис.14. Корекція спектру відносно спектральної характеристики приладу.

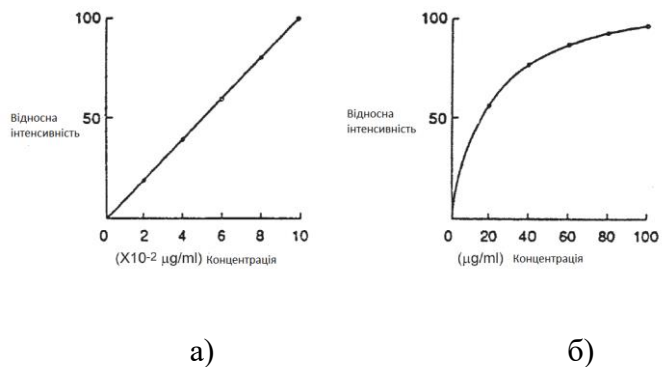
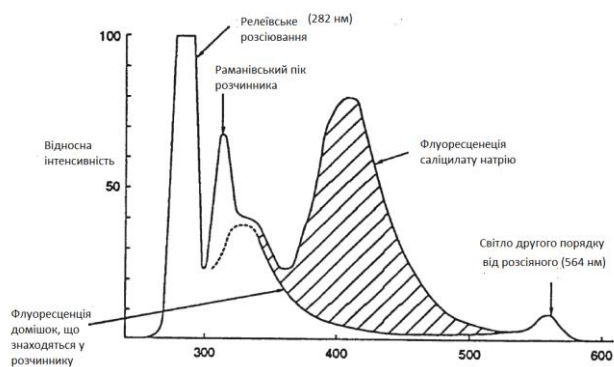


Рис.15. Залежність інтенсивності флуоресценції від концентрації а) при малій концентрації, б) при високій концентрації.



а)

б)

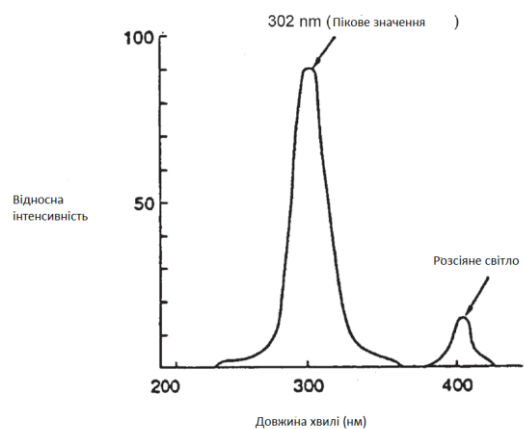


Рис. 16. Спектр флуоресцентного випромінювання а) і спектр збудження б) саліцилату натрію.

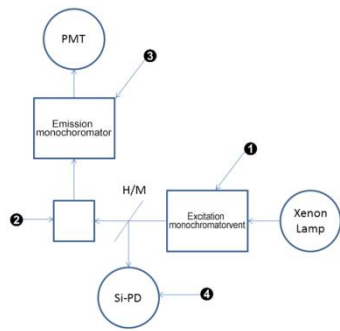


Рис. 17. Схема приладу Shimadzu RF-6000.

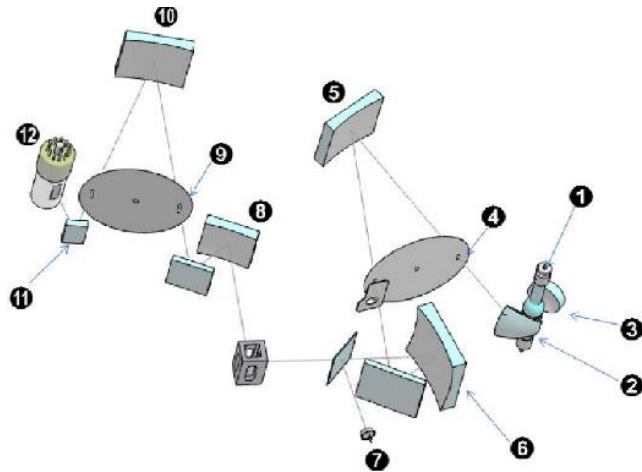


Рис. 18. Оптична схема приладу Shimadzu RF-6000.

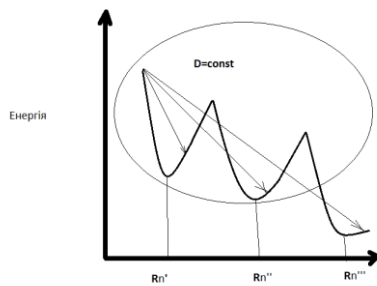


Рис.19. Багатоконфігураційна діаграма релаксації стану умовної опроміненої біологічної молекули, що демонструє можливість різних кінцевих метастабільних станів.

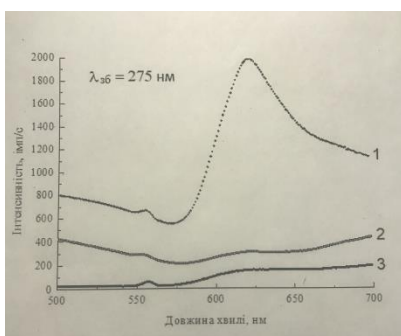


Рис.20. Спектри люмінесценції 1 – валіну, 2 – фруктози та 3 – чорної поверхні (фон).

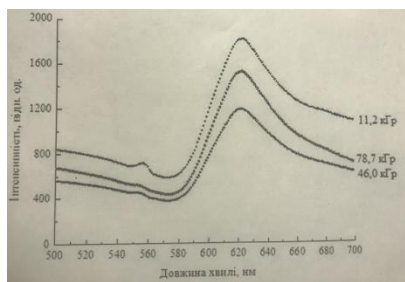


Рис.21. Спектри люмінесценції валіну опроміненого на мікротроні М-30.

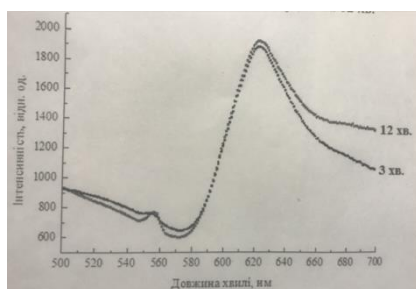
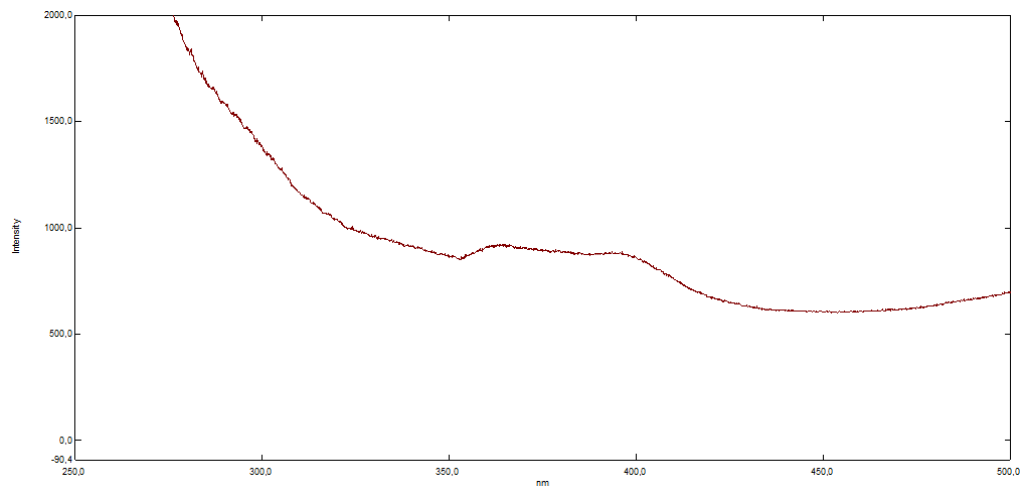
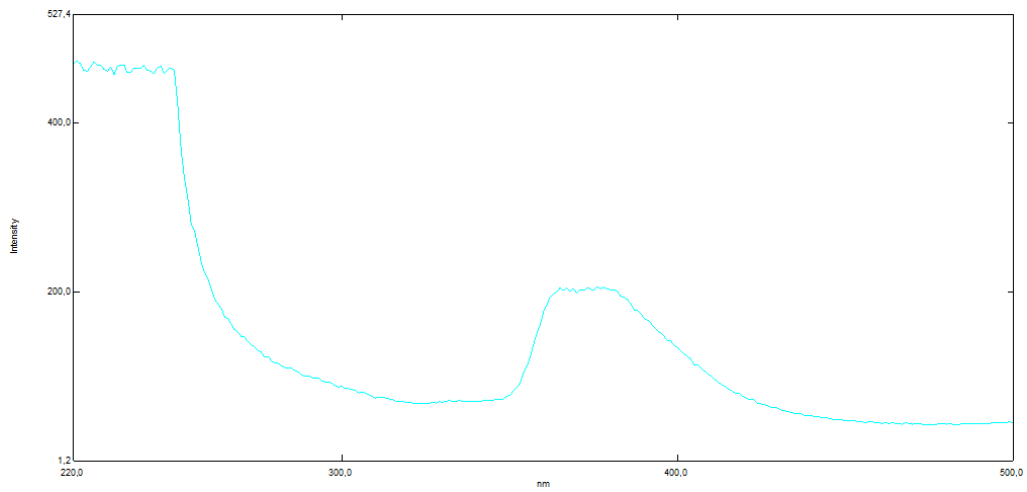


Рис.22. Спектри люмінесценції валіну, опроміненого на мікротроні М-30 дозою 14 кГр. Набір дози здійснювався протягом різного часу та з різними щільностями потоку ядерних частинок.



а)



б)

Рис. 23. Результати вимірювання спектрів люмінесценції аденіну

а) Збудження: 250,0 нм

б) Збудження: 275,0 нм

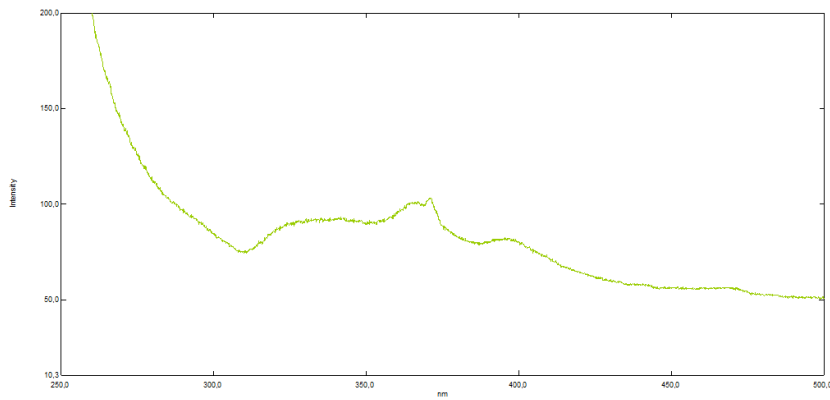
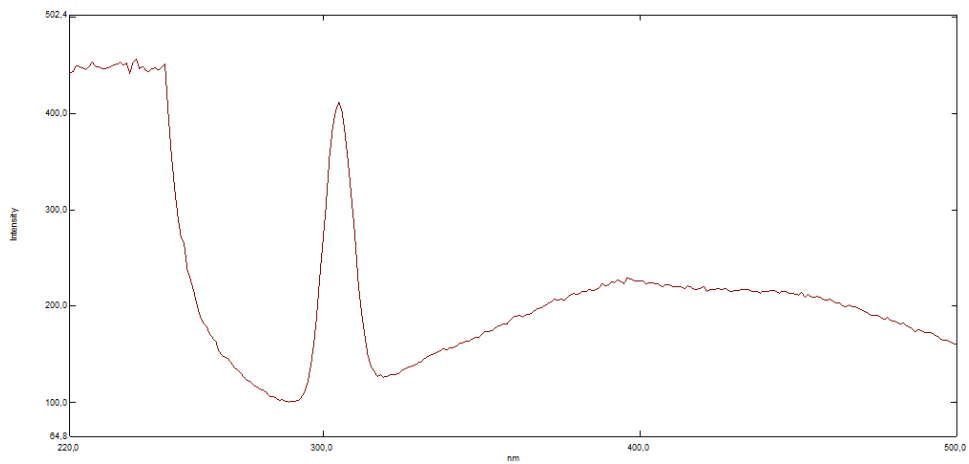
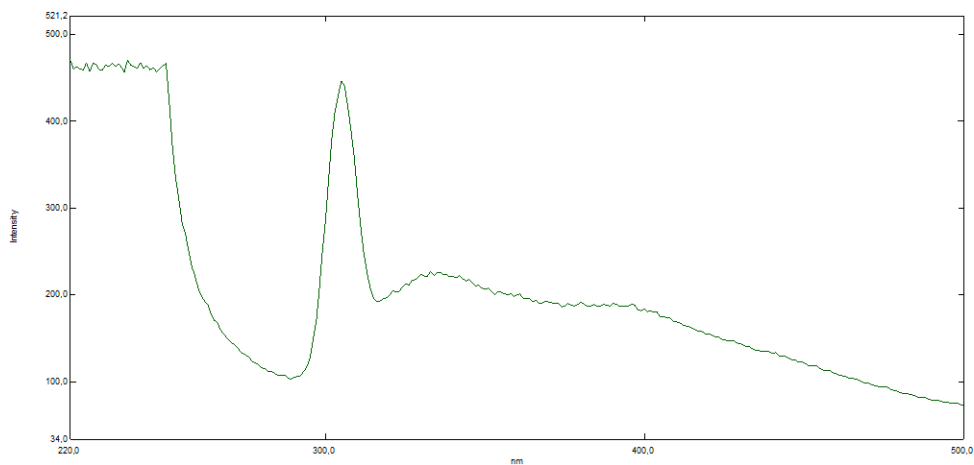


Рис. 24. Результати вимірювання спектрів люмінесценції тиміну

Збудження: 250,0 нм



а)



б)

Рис. 25. Результати вимірювання спектрів люмінесценції цитозину

а) Збудження: 250,0 нм

б) Збудження: 275,0 нм

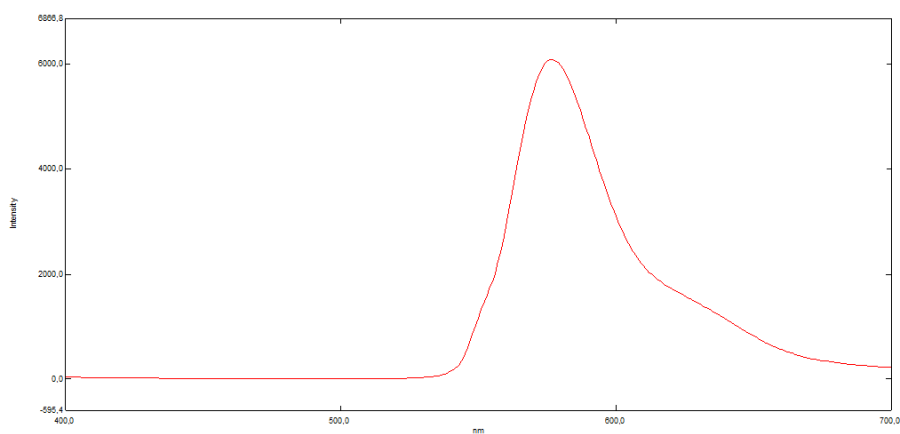


Рис. 26. Результати вимірювання спектрів люмінесценції урацилу

Збудження: 250,0 нм

Список використаної літератури

1. Банку даних білкових структур (PDB – Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>), коди PDB наведено в підписах до рисунків.
2. 3DNA (Lu, X. -J., Olson, W. K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures // Nucl. Acids Res. – 2003. – Vol. 31. – P. 5108–5121; <http://rutchem.rutgers.edu/~olson/3DNA>).
3. Байрон Дж. Мас-спектрометрія і її застосування в органічній хімії. Переклад з англійської- М.Хімія, 1964.
4. Л. І. Остапченко, Д. М. Гребіник. Біохімія нуклеїнових кислот : навч. посіб. / Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2013. – 290 с.
5. Ю. Свида, М.І. Шафраньош, Е. Шамудовський, І.І. Перчак, М.О. Маргітич, М.І. Суховія, М.М. Чаварга, І.І. Шафраньош Люмінесценція молекул гуаніну в газовій фазі під дією пучка електронів// - Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Фізична. – 2016. - Випуск 39. – с.106-112.
6. А. В. Сиволоб. Молекулярна біологія : підручник /Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. –384 с.

7. А. В. Сиволоб, С. Р. Рушковський, С. С. Кир'яченко та ін. Генетика : підручник / ; за ред. А. В. Сиволоба. – Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. – 320 с.
8. Спирін А.С. Сучасна біологія та біологічна безпека // Вісник РАН. 1997. № 7.
9. Рафальсон А.Э, Шерешевский А.М., Масспектрометричні прилади.- М.Хімія,1968
10. Б. Альбертс, Д. Брей, М. Льюис, Дж. Рефф и др. Молекулярная биология клетки / Москва ; Ижевск : НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2012. - 2000 с.
11. Бенуэлл К. Основы молекулярной спектроскопии. М.: Мир,1985.
12. Берштейн И.Я., Каминский Ю.Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии. - Л.: Химия, 1986. - 200 с.
13. Булатов М.И., Калинин Н.П. Практическое руководство по фотометрическим и спектрофотометрическим методам анализа. –5-е изд. перераб. - Л. Химия, 1986. – 432 с.
14. Васильев В.П. Физико-химические методы анализа. М.: Высшая школа, 1989 – 384 с.
15. Вилков Л. В., Пентин Ю. А. Физические методы исследования в химии (Структурные методы и оптическая спектроскопия). М. : Высш.школа, 1987, 367 с.
16. Громова Ю. А., Мартыненко И.В., Орлова А. О. Практическое использование наноструктур. – СПб: НИУ ИТМО, 2014. – 93 с.
17. Ельяшевич М.А. Атомная и молекулярная спектроскопия. М.:Физматгиз, 1962.
18. Мальцев А.А. Молекулярная спектроскопия. М.: Изд.МГУ,1980. 285 с.
19. З. Марченко. Фотометрическое определение элементов. Москва, «Мир», 1971.- 178с.
20. Л. И. Патрушев. Искусственные генетические системы. Т. 1. Генная и белковая инженерия / Москва : Наука, 2004. – 526 с.
21. М. Сингер, П. Берг перевод с англ. Гены и геномы : в 2 т. / Москва : Мир,2002. – 764 с.
22. Д. М. Фаллер, Д. Шилдс. Молекулярная биология клетки: руководство для врачей / Москва : Бином-Пресс, 2003. – 272 с.

23. <https://analit-spb.ru/oborudovanie/po-tipu-oborudovaniya/molekulyarnaya-spektroskopiya/spektrofotometri-v-uf-vid-i-blizhnem-ik-diapazone/spektrofotometr-uv-3600-plus/>.
24. Brisdon A. K. , Inorganic Spectroscopic Methods, Oxford University Press, Oxford, UK, 1998.
25. Crick FHC origin of genetic code // Journal of Molecular Biology. 1968. V. 38. P. 367-379.
26. Zhang S., Guo J., Ma X., et al (2017) Smart PDMS sponge with switchable pH-responsive wetting surface for oil/water separation. [Электронный ресурс] New J Chem 41 : 8940–8946. Режим доступа: <https://doi.org/10.1039/C7NJ01067B>.
27. V.V. Kuzma, M.I. Shafranyosh , I.E. Mitropolsky, M.I. Sukhoviya. LUMINESCENCE OF THE NUCLEIC ACID BASES URACIL MOLECULES IN DIFFERENT PHASE STATES UNDER THE ELECTRON BEAM Uzhhorod University Scientific Herald. Series Physics. Issue 43. – 2018.
27. Minaev B.F., Shafranyos M.I., Svida Yu.Yu., Sukhoviya M.I., Baryshnikov G.V., Minaeva V.A. Fragmentation of the adenine and guanine molecules induced by electron collisions// J.Chem. Phys. – 2014. – V.140. - №17. – pp.175101-15.
28. Nakamoto K., Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part A, Theory and Applications in Inorganic Chemistry, Wiley, New York, 1997.
29. Sukhovija M.I., Slavik V.N., Shafranyosh I.I., Shimon L.L. Interaction of nucleic acid bases molecules with low-energy electrons // Biopolym. Cell. – 1991. – V. 7. – № 6. – pp. 77-82.
30. Ulysse Pedreira-Segade, Cécile Feuillie, Manuel Pelletier, Laurent J. Michot, Isabelle Daniel Adsorption of nucleotides onto ferromagnesian phyllosilicates: Significance for the origin of life // Geochimica et Cosmochimica Acta. – 2016. – V. 176. – pp. 81-95.
31. Watson JD, Crick FHC Genetic implications of structure of deoxyribose nucleic acid // Nature 1953 V. 171. P. 964-967.
32. Watson JD, Crick FHC Molecular structure of nucleic acids // Nature. 1953. V. 171. P. 738-740.
33. Woese 3. The evolution of the genetic code // The Genetic Code. New York: Harper & Row, 1967. P. 179-195.

34. Synkanych O.I, Maslyuk V.T., *et al.* Time evolution of chemical, physical parameters and biological activity of glucose and sucrose aqueous solutions irradiated on a M-30 Microtron with an energz of 12.5 MeV//Наук.вісник УжНУ (Сер.Хімія).-2020.-№1(43).-С.92-101.