

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
УКРАЇНСЬКО-УГОРСЬКИЙ НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ
КАФЕДРА ФІЗИКО-МАТЕМАТИЧНИХ ДИСЦИПЛІН

БОРОНІ ЕРНЕСТ ЕРНЕСТОВИЧ

**ГЕНЕТИЧНІ БІОСТРУКТУРИ
У ШКІЛЬНОМУ КУРСІ ФІЗИКИ**

014.08 “Середня світа. Фізика та астрономія ”

Дипломна робота на здобуття освітнього ступеня
магістра

Науковий керівник:
д.ф.-м.н. Шафраньош М.І.

Ужгород – 2024

Регістрація 1
(номер)

«02» 12 2024 р. [підпис] Буряк М. І.
(підпис лаборанта кафедри) (прізвище, ініціали)

Дипломна робота допущена до захисту

Завідувач кафедри

[підпис]
(підпис)

Шафраньош М.І.

Доктор фізико-математичних наук, доцент

«09» грудня 2024 р.

Рецензент [підпис] МАРГІТИЧ М.О.

доц.

РЕФЕРАТ

Дипломна робота: ст. 45, рис. 22, джерел 30

За допомогою спектрофотометричної методики в діапазоні 200-750 нм досліджено спектри поглинання ДНК, РНК і азотистих основ. Встановлено, що нуклеїнові кислоти та їх компоненти інтенсивно поглинають ультрафіолетове світло. Максимум молекулярної смуги знаходиться біля 260 нм для ДНК і РНК і при 268-272 нм для основ. Опромінення ультрафіолетом призводить до зменшення поглинання і появи додаткової, менш інтенсивної смуги біля 300 нм. Цей ефект зумовлений утворенням димерів піримідинових основ.

В результаті проведених експериментів було виявлено утворення негативних іонів урацилу при взаємодії його молекул з електронним пучком. Вперше експериментально виміряні абсолютні величини повних ефективних перерізів для негативних іонів урацилу в області енергій електронів від 0,4 до 5 еВ.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: спектри поглинання, ДНК, РНК, гуанін, цитозин, урацил, аденін, тимін.

SUMMARY

Qualifying work: 45 pages, 22 pictures, 30 sources.

The absorption spectra of DNA, RNA and nitrogenous bases were studied using spectrophotometric techniques in the range of 200-750 nm. It has been established that nucleic acids and their components intensively absorb ultraviolet light. The maximum molecular band is about 260 nm for DNA and RNA and at 268-272 nm for bases. Ultraviolet radiation leads to a decrease in absorption and the appearance of an additional, less intensive band of about 300 nm. This effect is due to the formation of dimers of pyrimidine bases. As a result of the performed experiments, the formation of negative uracil ions was revealed during the interaction of its molecules with the electron beam. For the first time, the absolute values of the total effective cross sections for negative uracil ions in the region of electron energies from 0.4 to 5 eV were measured

experimentally. **KEYWORDS:** absorption spectra, DNA, RNA, guanine, uracil, adenine, thymine.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Властивості та будова нуклеїнових кислот	8
1.2. Спектри поглинання біомолекул.....	13
1.3. Взаємодія лазерного випромінювання з біологічними об'єктами	19
.....	19
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ	28
2.1. Експериментальні установки.....	28
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	33
3.1. Результати спектрів поглинання.....	33
3.2.Результати збудження молекул урацилу електронним ударом.....	40
ВИСНОВКИ	42
ЛІТЕРАТУРА	43

ВСТУП

Дослідженню електронної структури і властивостей нуклеїнових кислот ДНК і РНК у даний час приділяється пильна увага. При цьому широко використовуються різні спектроскопічні і теоретичні підходи. Необхідність подібних досліджень зумовлена тим, що нуклеїнові кислоти відіграють центральну роль у живих клітинах, оскільки їх функції пов'язані із зберіганням і передачею генетичної інформації, закодованої послідовністю нуклеотидів.

Актуальною є проблема абіогенного походження життя на Землі і визначення можливих причин дисфункції впізнавання на макромолекулярному рівні [1]. Важливою структурою нуклеотидів, що визначає їх фізичні властивості і біологічну значимість, є азотисті основи похідні гетероциклічних молекул пурину і піримідину. Розрізняють пуринові основи аденін і гуанін, а також піримідинові основи - цитозин, урацил і тимін. Зміни у просторовій та енергетичній структурах нуклеотидних основ виникають при їх непружних зіткненнях з електронами [2,3]. У результаті таких зіткнень

Відбувається збудження електронно-коливальних станів молекул з їх подальшим розпадом, з різною ймовірністю, по різних каналах. Це, перш за все, радіаційні переходи в молекулах і їх дисоційованих фрагментах, а також електронні переходи з утворенням позитивних і негативних іонів. Отже, люмінесцентні

властивості азотистих основ суттєво доповнюють фізичну картину процесів збудження органічних молекул. Відмінною рисою люмінесценції азотистих основ є низький квантовий вихід через складну структуру цих молекул і прояви різних процесів гасіння, які залежать від фазового стану молекул.

Нуклеїнові кислоти – це високомолекулярні біополімери, які є основою зберігання, передачі та реалізації генетичної інформації в усіх живих організмах. До них належать дві основні форми: дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) та рибонуклеїнова кислота (РНК). Нуклеїнові кислоти складаються з мономерів, які називаються нуклеотидами. Кожен нуклеотид включає азотисту основу (пурини — аденін (А), гуанін (G); піримідини — цитозин (С), тимін (Т) або урацил (U) в РНК),

пентозний цукор (дезоксирибоза в ДНК або рибоза в РНК) та фосфатну групу. До типів нуклеїнових кислот відносяться: ДНК: Зберігає генетичну інформацію. Має двоспіральну структуру, стабілізовану водневими зв'язками між комплементарними основами (А-Т, G-C) та РНК: виконує функції передачі генетичної інформації (мРНК), транспорту амінокислот (тРНК), каталізу (рибозими) тощо. Зазвичай має односпіральну структуру. До функцій відносяться: зберігання генетичної інформації (ДНК), передача інформації для синтезу білків (мРНК), регуляція біохімічних процесів (некодуючі РНК), виконання каталізаторної функції (рибозими). Нуклеїнові кислоти утворюють комплекси з білками, наприклад, нуклеопротейди, які формують хроматин у клітинах. Біологічна роль: визначають спадкові ознаки, беруть участь у реплікації (подвоєнні ДНК) та транскрипції (синтез РНК) та задіяні в процесі трансляції для утворення білків. Використання в науці та медицині: гена інженерія, розробка вакцин на основі РНК (наприклад, мРНК-вакцини), діагностика генетичних захворювань.

Сучасний науково-технічний прогрес пов'язаний з пошуком і розробкою нових екологічно чистих матеріалів для нанотехнологій. Зараз розвиваються такі перспективні наукові напрямки, як молекулярна електроніка, біосенсорика та біоніка [9-11]. Для ефективного використання нових технологічних елементів необхідна інформація про фізичну структуру важливих біомолекул.

Метою даної роботи є вивчення збудження біомолекул тиміну та урацилу а також аналіз особливостей структури та фізичних властивостей біомакромолекул ДНК і РНК та їх складових.

Для досягнення даної мети необхідно виконати наступні завдання:

- ознайомитися із науковою літературою про структуру, фізико-хімічні та біологічні властивості молекул нуклеїнових кислот;
- проаналізувати основні оптичні методи вивчення структури біомолекул;
- провести спектральні дослідження макромолекул нуклеїнових кислот та їх компонентів.

Метою викладання даного матеріалу в середній школі на рівні стандарту освіти полягає у формуванні в учнів знань про закони функціонування живих

систем, їх початок, розвиток і взаємодію, взаємозв'язок із довкіллям; розуміння фізичної та біофізичної картини світу та розуміння цінності таких категорій, як знання, життя, здоров'я, природа, необхідності правильного використання і відновлення природних ресурсів, уміння опановувати методологію пізнання живої природи, життєвими навичками, здатністю до саморозвитку й самонавчання в сьогоденних умовах, з врахуванням глобальних змін; свідомого ставлення до природи як унікальної цінності; застосування знань з фізики та біофізики у повсякденному житті та у майбутній професійній діяльності, оцінювання їх ролей для збалансованого поступу людства, науки та технологій.

Досягнення вищенаведеної мети передбачає рішення таких завдань:

- оволодіння учнями термінологічним апаратом, освоєння предметних знань та усвідомлення суті фундаментальних принципів, базових законів і закономірностей, що надають змогу порозуміти неперервність життя, його фундаментальний та нерозривний взаємозв'язок з довкіллям;
- встановлення міжпредметного та міжциклового зв'язку фізики з метою формування в учнів гуманістичних поглядів на природу, сучасних уявлень про її цілісність та сталий розвиток;
- набуття досвіду практичної та науково-дослідницької діяльності, здатності встановлювати причинно-наслідкові взаємозв'язки при застосовуванні отриманих знань у процесі пізнання світу та уміння інтерпретації отриманих результатів;
- використання здобутих знань, навичок та умінь у повсякденному житті для оцінки впливу факторів довкілля, наслідків своєї діяльності з метою збереження власного здоров'я і безпеки інших людей;
- розвиток особистої відповідальності за стан навколишнього середовища, створення ціннісних орієнтацій для збереження природи, порозуміння необхідності узгодження стратегій природнього довкілля та людини на основі ідеї повноти, універсальності природних взаємозв'язків та відповідної самообмеженості, подолання невірною споживацького ставлення до природи.

ОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Властивості та будова нуклеїнових кислот

Нуклеїнові кислоти — це полімери, що складаються з повторюваних мономерних одиниць, званих нуклеотидами.

Кожен нуклеотид включає три основні компоненти:

1. Азотиста основа:

- Пурины: аденін (A), гуанін (G).
- Піримідини: цитозин (C), тимін (T) (у ДНК) або урацил (U) (у РНК).

2. Цукор (пентоза):

- Дезоксирибоза в ДНК (без одного атома кисню на 2'-вуглеці).
- Рибоза в РНК (з гідроксильною групою на 2'-вуглеці).

3. Фосфатна група:

- Зв'язує нуклеотиди між собою за допомогою фосфодіестерних зв'язків.

Первинна структура

Це послідовність нуклеотидів, з'єднаних фосфодіестерними зв'язками. Вона записується від 5'-кінця (з вільною фосфатною групою) до 3'-кінця (з вільною гідроксильною групою).

Вторинна структура

- У ДНК вторинна структура — це подвійна спіраль, утворена двома комплементарними ланцюгами, що сполучені водневими зв'язками:

- Аденін (A) — Тимін (T): 2 водневі зв'язки.
- Гуанін (G) — ****Цитозин (C)****: 3 водневі зв'язки.

- У РНК зазвичай односпіральна структура, але можливі вторинні структури у вигляді шпильок або стебел-петель.

Третинна структура- У ДНК: компактизація в хроматин та хромосоми.

- У РНК: складні просторові форми, наприклад, у рибозимів чи тРНК.

Властивості нуклеїнових кислот

Фізичні властивості:

1. Розчинність:

- Добре розчиняються у воді завдяки іонізованим фосфатним групам.
- Нерозчинні в органічних розчинниках.

2. Поглинання світла:

- Азотисті основи поглинають ультрафіолетове світло з максимумом при 260 нм, що використовується для кількісного аналізу.

3. Термостабільність:

- ДНК має високу стабільність, особливо за рахунок водневих зв'язків та стекування основ.

- РНК менш стабільна через чутливість до гідролізу (гідроксильна група на 2'-вуглеці рибози).

Хімічні властивості:

1. Гідроліз:

- У кислому середовищі ДНК та РНК розпадаються на нуклеотиди.
- У лужному середовищі РНК деградує швидше через наявність гідроксильної групи на 2'-вуглеці.

2. Денатурація:

- Поділ подвійної спіралі ДНК на окремі ланцюги при нагріванні або зміні рН.
- Зворотній процес — ренатурація, коли ланцюги знову сполучаються при охолодженні.

3. Гібридизація:

- Комплементарне з'єднання одноланцюгових молекул ДНК або РНК, що використовується у молекулярній біології.

Біологічні властивості:

1. Збереження інформації:

- ДНК містить інформацію про синтез білків та регуляцію генів.

2. Передача інформації:

- РНК забезпечує перенесення інформації від ДНК до рибосом (мРНК), амінокислот (тРНК), а також виконує каталіз (рРНК).

3. Мутації:

- Нуклеїнові кислоти можуть зазнавати змін у послідовності нуклеотидів, що впливає на функції організму.

Ці властивості та будова є основою всіх життєвих процесів на молекулярному рівні.

1.2.Збудження молекул нуклеїнових кислот

Збудження молекул нуклеїнових кислот — це процес переходу їхніх електронів із основного стану в збуджений під дією зовнішніх факторів, наприклад, ультрафіолетового (УФ) випромінювання. Це явище має велике значення для дослідження властивостей нуклеїнових кислот і розуміння механізмів їх пошкодження.

Природа збудження.

1. Азотисті основи як хромофори:

- У нуклеїнових кислотах азотисті основи (аденін, гуанін, цитозин, тимін або урацил) є основними хромофорами, які поглинають УФ-випромінювання.

- Основи мають π -електрони, що беруть участь у процесах поглинання енергії.

2. Діапазон поглинання:

- Максимум поглинання УФ-світла нуклеїновими кислотами — близько 260 нм.

- Це використовується для кількісного визначення концентрації ДНК та РНК у розчині (метод спектрофотометрії).

Результати збудження.

1. Перехід електронів:

- Поглинання енергії викликає перехід електронів з основного енергетичного рівня на вищий (збуджений) рівень.

2. Фотохімічні реакції:

- У результаті збудження можливі фотохімічні процеси:

- Димеризація піримідинових основ (тимінових у ДНК або урацилових у РНК): утворення ковалентних зв'язків між сусідніми основами, що призводить до

структурних пошкоджень.

- Розриви ланцюга або зміна конформації нуклеїнової кислоти.

3. Міграція енергії:

- Частина енергії збудження може бути втрачена у вигляді тепла або випромінювання (флуоресценція).

4. Мутації та пошкодження:

- Збудження може спричинити утворення мутацій у ДНК, які передаються під час реплікації.

- Зміни структури молекул можуть порушувати їхню функцію, наприклад, блокувати транскрипцію чи реплікацію.

Фактори впливу на збудження.

1. Тип випромінювання:

- Найчастіше молекули ДНК і РНК збуджуються під дією УФ-променів з довжиною хвилі 200–300 нм.

2. Навколишнє середовище:

- Розчинники, іонна сила розчину, температура та рН можуть змінювати спектр поглинання.

3. Конформація молекули:

- Подвійна спіраль ДНК поглинає УФ менш інтенсивно, ніж одноланцюгова молекула через ефект стекування основ.

Застосування в науці.

1. Спектроскопія нуклеїнових кислот:

- Аналіз поглинання УФ-світла для оцінки чистоти та концентрації ДНК і РНК.
- Визначення конформаційних змін, наприклад, денатурації або ренатурації.

2. Флуоресцентний аналіз:

- Вивчення флуоресценції азотистих основ після збудження для моніторингу молекулярних взаємодій.

3. Дослідження мутацій:

- Вивчення фотохімічних реакцій та їхнього впливу на стабільність і функцію генетичного матеріалу.

Захист від УФ-збудження.

Організми мають спеціальні механізми захисту від пошкодження нуклеїнових кислот:

- Репарація ДНК: виправлення пошкоджень, викликаних УФ-випромінюванням.
- Антиоксиданти: зменшення рівня активних форм кисню, що можуть утворюватися під впливом випромінювання.
- Меланін: поглинання УФ-променів у шкірі людини, запобігаючи пошкодженню клітин.

Ці процеси забезпечують стабільність генетичної інформації та захист від мутацій.

1.2.1. Будова ДНК та РНК

Історія вчення про будову ДНК і РНК — це багатовіковий процес відкриттів, який поступово привів до розуміння молекулярної основи життя. Вона включає роботи багатьох вчених, які зробили ключові внески в ідентифікацію, аналіз та структуру нуклеїнових кислот.

XIX століття: відкриття нуклеїнових кислот.

1. 1869 р. —Фрідріх Мішер:

- Виділив речовину з ядер клітин, яку назвав "нуклеїн".
- Виявив, що вона містить фосфор і не є білком.

2. 1889 р. —Ріхард Альтман:

- Розвинув термін "нуклеїнова кислота".

3. 1891 р. —Альбрехт Коссель:

- Визначив, що нуклеїнові кислоти містять азотисті основи: аденін, гуанін, цитозин, тимін та урацил.

Початок XX століття: структура нуклеїнових кислот.

1. 1919 р. —Фібус Левін:

- Встановив, що нуклеїнові кислоти складаються з трьох компонентів: азотистої основи, цукру (рибози або дезоксирибози) та фосфатної групи.

- Запропонував модель нуклеотиду.

2. 1930-ті роки:

- Левін помилково вважав, що ДНК має структуру "тетрануклеотиду" — простого повтору чотирьох основ.

3. 1944 р. —Освальд Ейвері, Колін Маклеод, Маклін Маккарті:

- ДНК було визначено як матеріал, що несе генетичну інформацію, у дослідах із трансформацією бактерій.

Середина ХХ століття: відкриття структури ДНК.

1. 1950 р. —Ервін Чаргафф:

- Виявив "правила Чаргаффа":
 - Кількість аденіну (А) дорівнює кількості тиміну (Т).
 - Кількість гуаніну (G) дорівнює кількості цитозину (С).
 - Співвідношення пуринів і піримідинів є сталим для кожного виду.

2. 1951-1953 рр. —Розалінд Франклін і Моріс Вілкінс:

- Використання рентгеноструктурного аналізу для вивчення ДНК.
 - Франклін отримала знімки, які підтвердили спіральну структуру молекули.

3. 1953 р. —Джеймс Вотсон і Френсіс Крік:

- На основі даних Франклін і Вілкінса побудували модель подвійної спіралі ДНК.

- Відкриття показало, що ДНК складається з двох ланцюгів, зв'язаних комплементарними основами (А-Т, G-С).

Подальші відкриття в ХХ столітті.

1. 1960-ті рр.:

- Розшифровано роль РНК у синтезі білків:
 - мРНК (інформаційна) переносить генетичну інформацію.
 - тРНК (транспортна) доставляє амінокислоти.
 - рРНК (рибосомна) є складовою частиною рибосом.

2. 1966 р.— Маршалл Ніренберг, Гар Гобінд Корана, Роберт Холлі:

- Розшифровано генетичний код: відповідність між триплетами нуклеотидів (кодонами) та амінокислотами.

3. 1970 р. —Гамільтон Сміт:

- Відкриття рестрикційних ферментів, що дозволило працювати з фрагментами ДНК та розвивати генно-інженерні технології.

4. 1977 р. —Фредерік Сенгер:

- Розробив метод секвенування ДНК, що дозволило визначати послідовності нуклеотидів.

Сучасні досягнення (XXI століття).

1. 2003 р. — Завершено проект "Геном людини":

- Розшифровано повну послідовність геному людини.

2. Розвиток РНК-технологій:

- Розробка мРНК-вакцин (наприклад, проти COVID-19).

- Дослідження некодуючих РНК, які виконують регуляторні функції.

3. Редагування геному:

- Технологія CRISPR-Cas9, заснована на системах РНК-залежної редукції ДНК, стала революцією в генній інженерії.

Розвиток вчення про ДНК і РНК зробив революцію в біології, медицині та біотехнологіях. Сьогодні ці знання використовуються для діагностики, лікування генетичних захворювань, створення вакцин і редагування геному.

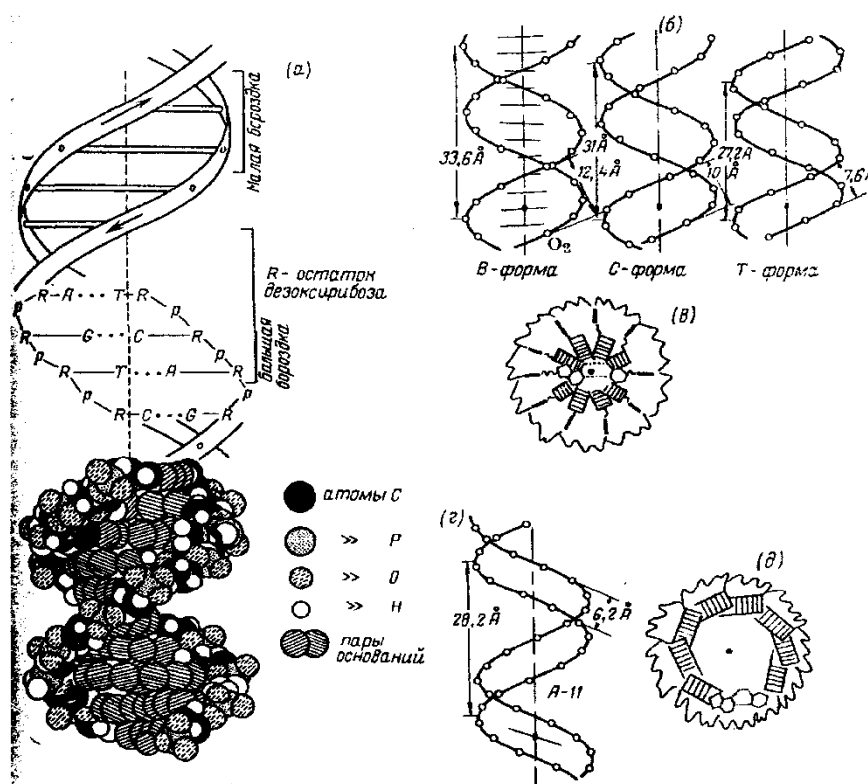


Рис. 1.1. Макромолекулярна структура ДНК. [6].

- (а) — Модель Уотсона — Кріка;
- (б) — параметри спіралей В-, С- і Т-форм ДНК (проекції перпендикулярно осі спіралі);
- (в) — поперечний розріз спіралі ДНК у В-формі (заштриховані прямокутники зображають пари основ);
- (г) — параметри спіралі ДНК в А-формі;
- (д) — поперечний розріз спіралі ДНК в А-формі.

Довжина витка спіралі, який відповідає її періоду ідентичності, складає 3,37 нм (33,7 А). На один виток спіралі доводиться 10 залишків основ в одному ланцюзі. Відстань між площинами основ однакова, таким чином, приблизно 0,34 нм (3,4 А). Площини залишків основ перпендикулярні довгій осі спіралі. Площини вуглеводних залишків дещо відхиляються від цієї осі (спочатку Уотсон і Крік припустили, що вони паралельні їй).

З малюнка видно, що вуглеводофосфатний остов молекули обернутий

назовні. Спіраль закручена таким чином, що на її поверхні можна виділити дві різні за розмірами борозенки (їх часто називають також жолобками) — велику, шириною приблизно 2,2 нм (22 А), і малу — шириною близько 1,2 нм (12А). Спіраль — правообертаюча. Полідезоксирибонуклеотидні ланцюги в ній антипаралельні: це означає, що якщо ми рухатимемося уздовж довгої осі спіралі від одного її кінця до іншого, то в одному ланцюзі ми проходимемо фосфодіефірні зв'язки у напрямі 3'-[^]5', а в іншій — у напрямі 5'-[^]3'. Іншими словами, на кожному з кінців лінійної молекули ДНК розташовані 5'- кінець однієї і 3'-кінець іншого ланцюга.

Регулярність спіралі вимагає, щоб проти залишку пурінової основи в одному ланцюзі знаходився залишок піримідинової основи в іншому ланцюзі. Як вже підкреслювалося, ця вимога реалізується у вигляді принципу утворення комплементарних пар основ, тобто залишкам аденіну і гуаніну в одному ланцюзі відповідають залишки тиміну і цитозину в іншому ланцюзі (і навпаки).

Таким чином, послідовність нуклеотидів в одному ланцюзі молекули ДНК зумовлює нуклеотидну послідовність іншого ланцюга) [11].

Цей принцип є головним наслідком моделі Уотсона і Кріка, оскільки він у дивно простих хімічних термінах пояснює основне функціональне призначення ДНК — бути носієм генетичної інформації.

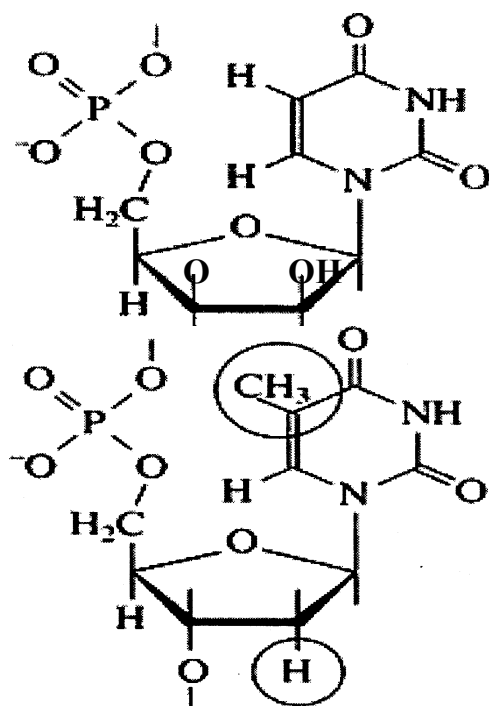
Закінчуючи розгляд моделі Уотсона і Кріка, залишається додати, що сусідні пари залишків основ у ДНК, що знаходиться у В-формі, повернені один щодо одного на 36° (кут між прямими, що сполучають атоми С1' в сусідніх комплементарних парах).

Перші відомості про нуклеотидний склад РНК відносилися до препаратів, що є сумішами клітинних РНК (рибосомних, інформаційних і транспортних) і сумарною фракцією РНК. Правила Чаргаффа в цьому випадку не дотримуються, хоча певна відповідність між змістом гуаніну і цитозину, а також аденіну і урацилу все ж таки має місце.

Дані, отримані останніми роками при аналізі індивідуальних РНК, показують, що і на них правила Чаргаффа не розповсюджуються. Проте відмінності у змісті аденіну і урацилу, а також гуаніну і цитозину для більшості

РНК невеликі і що, отже, тенденція до виконання вказаних правил все ж таки спостерігається. Цей факт пояснюється особливостями макроструктури РНК.

Характерними структурними елементами деяких РНК є мінорні основи.



Відповідні їм нуклеотидні залишки звичайно входять до складу транспортних і деяких інших РНК в дуже невеликих кількостях, тому визначення повного нуклеотидного складу таких РНК є іноді вельми складною задачею) [12].

Хімічно РНК дуже схожа на ДНК. Обидві речовини - це лінійні

полімери нуклеотидів. Кожний мономер - нуклеотид - є фосфорильований 1,4-глікозид, побудований із залишку п'ятивуглецевого цукру - пентози, несучого фосфатну групу на гідроксильній групі п'ятого вуглецевого атома (ефірний зв'язок) і азотисту основу при першому вуглецевому атомі (1,4- глікозидний зв'язок). Головна хімічна відмінність між ДНК і РНК полягає в тому, що цукровий залишок мономера РНК - це рибоза, а мономера ДНК - дезоксирибоза, є похідним рибози, в якій відсутнічні формули залишків одного з рибонуклеотидів - уридилової кислоти (Ц) і гомологічного йому дезоксирибонуклеотида тимидилової кислоти (сіТ) [4].

Азотистих основ у РНК чотири види: два пуринові - аденін (А) і гуанін (Г) і два піримідинові - цитозин (С) і урацил (У)

Мономери - рибонуклеотиди РНК - утворюють полімерний ланцюг за

допомогою формування фосфодиефирних містків між цукровими залишками (між п'ятим і третім атомами вуглецю пентози). Таким чином, полімерний ланцюг РНК може бути представлений як лінійний сахаро-фосфатний остов з азотними основами як бічні групи.

Вперше специфічна просторова структура РНК була продемонстрована при розшифровці атомної структури однієї з т-РНК в 1974 р. [13]. Згортання полімерного ланцюга тРНК, що складається з 76 нуклеотидних мономерів, приводить до формування дуже компактного глобулярного ядра, з якого під прямим кутом стирчать два виступи. Вони є короткими подвійними спіралями по типу ДНК, але організовані за рахунок взаємодії ділянок одного і того ж ланцюга РНК. Один з виступів є акцептором амінокислоти і бере участь в синтезі поліпептидного ланцюга білка на рибосомі, а інший призначений для комплементарної взаємодії з кодуєчим триплетом (кодоном) м-РНК в тій же рибосомі. Тільки така структура здатна специфічно взаємодіяти з білком-ферментом, що навішує амінокислоту на т-РНК, і з рибосоною в процесі трансляції, тобто специфічно "взнаватися" ними.



Рис. 1.3. Атомна (зліва) і скелетна (справа) моделі фенілаланінової т- РНК дріжджів [12]

Вивчення ізольованих рибосомних РНК дало наступний разючий приклад формування компактних специфічних структур з ще більш довгих лінійних полімерів цього типу. Рибосома складається з двох нерівних частин - великої і малої рибосомних субчастинок (субодиниць). Кожна субчастинка побудована з однієї високополімерної РНК і цілого ряду різноманітних рибосомних білків. Довжина ланцюгів рибосомних РНК вельми значна: так, РНК малої субчастинки бактерійної рибосоми містить більше 1500 нуклеотидів, а РНК великої субчастинки - близько 3000 нуклеотидів. У ссавців, включаючи людину, ці РНК ще більші - близько 1900 нуклеотидів і більше 5000 нуклеотидів у малій і великій субчастинках, відповідно.

Підсумовування і огляд знань про функції РНК дозволяють говорити про незвичайну багатофункціональність цього полімеру в живій природі. Можна дати наступний список основних відомих функцій РНК.

Генетична реплікативна функція: структурна можливість копіювання (реплікації) лінійних послідовностей нуклеотидів через комплементарні послідовності. Функція реалізується при вірусних інфекціях і аналогічна головній

функції ДНК в життєдіяльності клітинних організмів - редуплікації генетичного матеріалу

Кодуюча функція: програмування білкового синтезу лінійними послідовностями нуклеотидів. Це та ж функція, що і у ДНК. І в ДНК, і в РНК одні і ті ж триплети нуклеотидів кодують 20 амінокислот білків, і послідовність триплетів в ланцюзі НК є програма для послідовної розстановки 20 видів амінокислот в поліпептидному ланцюзі білка.

Структуроутворююча функція: формування унікальних тривимірних структур. Компактно згорнуті молекули малих РНК принципово подібні тривимірним структурам глобулярних білків, а більш довгі молекули РНК можуть утворювати і більш крупні біологічні частинки або їх ядра.

Функція пізнання: високоспецифічні просторові взаємодії з іншими макромолекулами (у тому числі білками і іншими РНК) і з малими лігандами. Ця функція, мабуть, головна у білків. Вона заснована на здатності полімеру згортатися унікальним чином і формувати специфічні тривимірні структури. Функція пізнання є базою специфічного каталізу.

Каталітична функція: специфічний каталіз хімічних реакцій рибозимами. Дана функція аналогічна зніматичній функції білків- ферментів.

У цілому, РНК предстає перед нами таким дивним полімером, що, здавалося б, ні часу еволюції Всесвіту, ні інтелекту Творця не повинно було б вистачити на її винахід. РНК здатна виконувати функції обох принципово важливих для життя полімерів - ДНК і білків. Не дивно, що перед наукою і встало питання: а чи не могло виникнення і самодостатнє існування світу РНК передувати появі життя в її сучасній ДНК-білковій формі?

1.2. Спектри поглинання біомолекул

Природа спектрів поглинання нуклеїнових кислот була пояснена в багатьох наукових роботах [7-8]. Спектри поглинання нуклеїнових кислот (ДНК і РНК) визначаються їхньою хімічною будовою, зокрема, наявністю ароматичних азотистих основ (аденін, гуанін, цитозин, тимін у ДНК або урацил у РНК). Ці

основи є хромофорами, які взаємодіють з ультрафіолетовим (УФ) світлом, зумовлюючи специфічні спектри поглинання.

Характеристики спектрів поглинання.

1. Діапазон поглинання:

- Нуклеїнові кислоти поглинають світло в ультрафіолетовій області спектра, особливо в діапазоні 200–300 нм.

- Максимум поглинання припадає на довжину хвилі приблизно 260 нм.

2. Причина поглинання:

- Ароматичні основи містять π -електрони, які здатні переходити в збуджений стан під дією УФ-світла.

- Основний перехід — це $\pi \rightarrow \pi^*$, який є характерним для ароматичних систем.

3. Внесок компонентів:

- Поглинання зумовлюється переважно азотистими основами.

- Фосфатна група і пентозний цукор майже не поглинають УФ-світло в цьому діапазоні.

Спектри для ДНК і РНК

1. ДНК:

- Подвійна спіраль ДНК знижує інтенсивність поглинання через стекінг-взаємодії між основами.

- Поглинання у подвійній спіралі менше, ніж у денатурованій ДНК, де основи вільні для взаємодії з випромінюванням.

2. РНК:

- Через односпіральну структуру РНК її спектри поглинання мають вищу інтенсивність порівняно з дволанцюговою ДНК.

- Максимум поглинання також знаходиться в області 260 нм.

Фактори, що впливають на спектри.

1. Конформація молекули[10]:

- У двоспіральній ДНК основи взаємодіють між собою (стекінг), що зменшує інтенсивність поглинання.

- Денатурація ДНК (розплетення спіралі) збільшує поглинання, що називається гіперхромним ефектом.

2. Іонна сила і рН середовища:

- Висока іонна сила може стабілізувати структуру ДНК і впливати на спектр.

- Зміна рН (особливо сильнокислого чи сильнолужного) може призводити до протонування/депротонування основ і змін спектра [11].

3. Температура:

- Зі зростанням температури відбувається денатурація ДНК, що підвищує інтенсивність поглинання (гіперхромний ефект).

Використання спектрів поглинання.

2. Оцінка чистоти:

- Співвідношення A_{260}/A_{280} використовується для оцінки чистоти нуклеїнових кислот:

- Чисті ДНК або РНК мають співвідношення близько 1.8–2.0.

- Зниження значення вказує на домішки білків (які мають максимум поглинання при 280 нм).

3. Дослідження конформації:

- Аналіз спектрів дозволяє вивчати зміни структури, наприклад, денатурацію або гібридизацію.

4. Теплові криві плавлення:

- Вимірювання спектрів при різних температурах дозволяє визначити температуру плавлення ДНК (T_m), коли половина подвійної спіралі розплетена.

Спектральні ефекти.

1. Гіперхромний ефект:

- Збільшення інтенсивності поглинання під час денатурації (розрив водневих зв'язків між основами).

2. Гіпохромний ефект:

- Зменшення інтенсивності поглинання при утворенні подвійної спіралі через стекінг-взаємодії між основами.

3. Флуоресценція:

- Збуджені азотисті основи можуть випромінювати флуоресцентне світло, що використовується для вивчення молекулярних взаємодій.

Спектри поглинання нуклеїнових кислот є важливим інструментом у молекулярній біології для вивчення їх структури, функцій, кількісного аналізу, оцінки чистоти, а також для моніторингу змін під впливом фізичних чи хімічних факторів. Згідно з квантово-механічними правилами відбору, переходи, що супроводжуються випромінюванням, можливі з великою імовірністю між різними рівнями однієї системи. Переходи між рівнями різних систем заборонені. В реальних умовах, внаслідок збуджуючого впливу середовища ця заборона не є абсолютною, але імовірність триплет-синглетних переходів ($T_n \rightarrow S$) на багато порядків менша, ніж імовірність переходів між рівнями однієї системи.

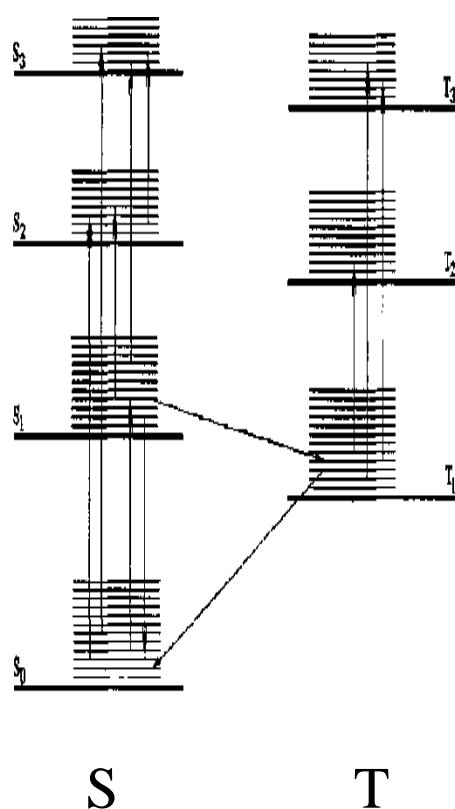


Рис. 1.4. Схема синглетних і триплетних енергетичних рівнів складних молекул [7].

Відомо, що нуклеїнові кислоти не поглинають світло видимого діапазону. Однак, їхні оптичні властивості можна моделювати додаванням мікрокількостей барвників. У випадку ДНК спостерігається зміна форми смуги поглинання, а також зміщення максимуму поглинання на 10 нм у бік довших довжин хвиль. Подібна картина відбувається і у спектрах поглинання РНК у суміші з кумарином. Зміна форми смуги поглинання свідчить про певні зсуви у фізичній структурі азотистих основ нуклеїнових кислот, про перерозподіл електронної густини, зростання ступеню делокалізації π -електронів уздовж подвійних зв'язків [15].

Можна з упевненістю сказати, що ці спектральні зміни є свідченням порушень регулярності структури нуклеїнових кислот, викликаних впровадженням в ланцюг молекул барвника.

В окремій серії експериментів досліджувався вплив концентрації молекул барвників на процес поглинання світла їхніми молекулами. Отримані результати показані на рис. 3.3 – 3.5.

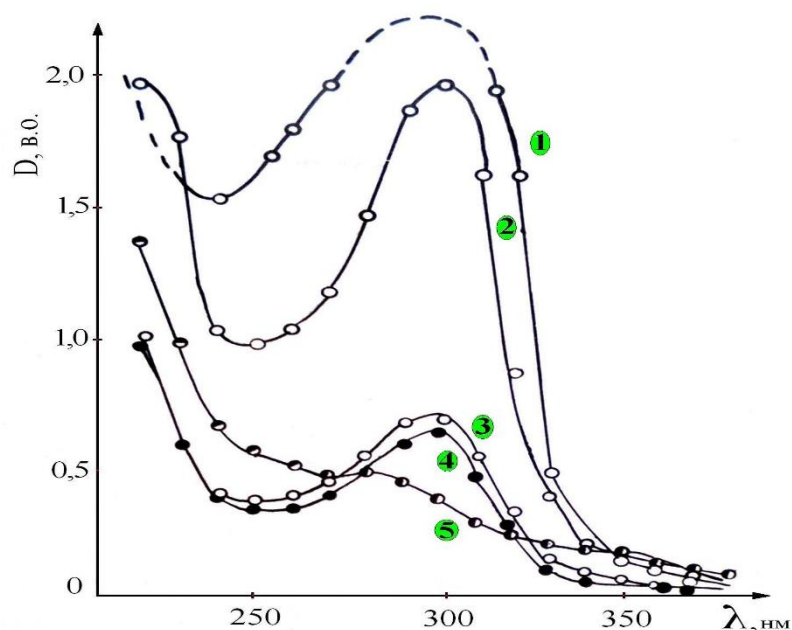


Рис. 1.5 Спектри поглинання розчинів барвника ПОПОП при різних концентраціях в етанолі: 1) - 10^{-4} М, розчин після дії лазерного випромінювання; 2) - 10^{-4} М; 3) - $2,5 \cdot 10^{-5}$ М. [19].

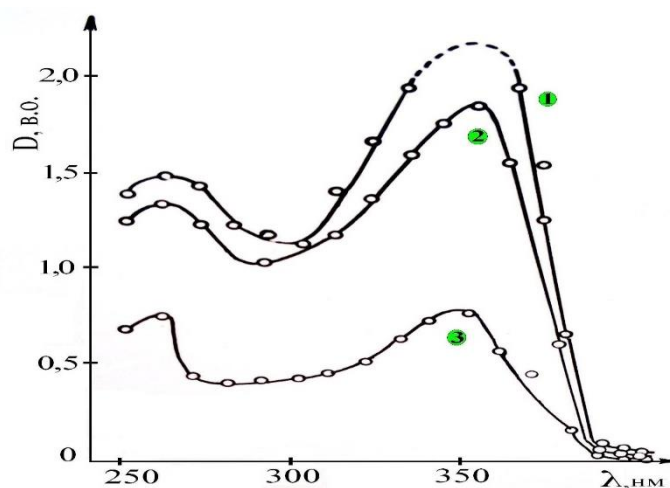


Рис. 1.6. Спектри поглинання розчинів барвника РВД при різних концентраціях в етанолі: 1) - $2,5 \cdot 10^{-5}$ М; 2) - $5 \cdot 10^{-5}$ М; 3) - $5 \cdot 10^{-6}$ М; 4) - $5 \cdot 10^{-6}$ М, розчин після дії лазерного випромінювання; 5) - $5 \cdot 10^{-7}$ М. [19].

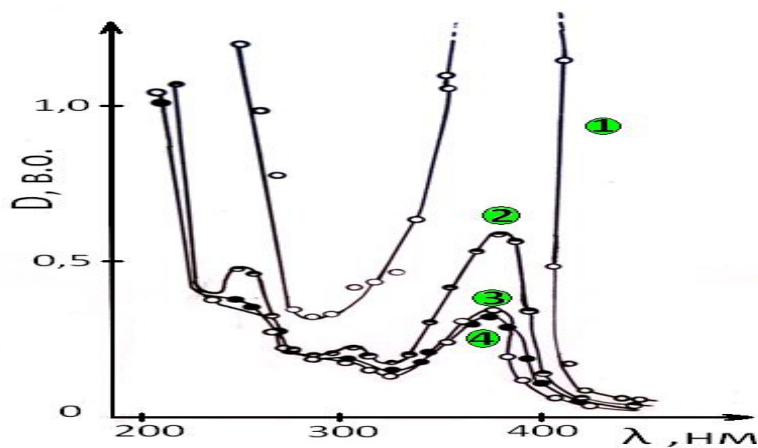


Рис. 1.7. Спектри поглинання розчинів барвника кумарину при різних концентраціях в 50% етанолі : (1 - 10^{-5} М; 2 - 10^{-6} М; 3 - 10^{-7} М; 4 - 10^{-7} , розчин після дії лазерного випромінювання) [19].

Як видно із графіків, у спектральному діапазоні від 200 до 450 нм форма спектрів і положення максимумів у спектрах поглинання всіх трьох барвників істотно залежать від кількості молекул у досліджуваному препараті.

На основі цих залежностей підбираються оптимальні умови для спектральних вимірів. Крім того, слід мати на увазі, що зміна спектрів може вказувати і на утворення кластерів молекул барвників при їх значних концентраціях. Це, звичайно, буде ускладнювати інтерпретацію механізмів взаємодії з біоструктурами.

1.3. Взаємодія лазерного випромінювання з біологічними об'єктами

Взаємодія лазерного випромінювання з біологічними об'єктами — це складний процес, що залежить від характеристик випромінювання (довжини хвилі, інтенсивності, тривалості імпульсу) і властивостей біологічного середовища (оптична щільність, структура, склад) [14]. Лазерне випромінювання може викликати фізичні, хімічні та біологічні ефекти, які знаходять застосування в медицині, біології та технологіях [15].

Основні механізми взаємодії.

1. Фототермічний ефект:

- Поглинання енергії лазера молекулами тканин призводить до локального підвищення температури.

- Використовується в хірургії для розрізання тканин, коагуляції або випаровування.

2. Фотохімічний ефект:

- Енергія фотонів лазера активує хімічні реакції в клітинах (наприклад, розрив молекул, утворення активних форм кисню) [6].

- Застосування: фотодинамічна терапія, лікування онкологічних захворювань.

3. Фотодисоціація:

- Розрив хімічних зв'язків у молекулах під дією випромінювання.
- Може спричинити пошкодження біомолекул, наприклад, білків чи ДНК.

4. Фотопори:

- Лазерне випромінювання створює мікропори у мембранах клітин, через які можуть проникати молекули або іони.
- Застосовується для доставки ліків у клітину.

5. Механічний ефект:

- Короткі імпульси лазерного випромінювання можуть створювати акустичні хвилі або шоківі ефекти, що призводять до руйнування тканин.
- Використовується, наприклад, у літотрипсії для руйнування каменів у нирках.

6. Флуоресценція:

- Виникнення флуоресценції у тканинах дозволяє виявляти певні біологічні молекули або структури.
- Використовується в діагностиці (наприклад, при фотодинамічному дослідженні).

Ключові параметри лазерного випромінювання.

1. Довжина хвилі:

- Визначає, які компоненти тканини будуть поглинати випромінювання (наприклад, вода, гемоглобін, меланін).
- Ультрафіолетове випромінювання впливає на ДНК, а інфрачервоне — на воду.

2. Інтенсивність:

- Висока інтенсивність може викликати нагрівання, випаровування або коагуляцію тканин.

- Низька інтенсивність використовується для стимуляції біологічних процесів.

3. Тривалість імпульсу:

- Впливає на локалізацію дії: короткі імпульси забезпечують точне фокусування, тоді як тривалі спричиняють ширший ефект.

4. Режим дії:

- Безперервний або імпульсний режими змінюють характер взаємодії лазера з біологічним об'єктом.

Ефекти на біологічному рівні.

1. Молекулярний рівень:

- Збудження молекул (наприклад, білків, нуклеїнових кислот).
- Пошкодження ДНК через утворення піримідинових димерів.

2. Клітинний рівень:

- Зміна проникності мембран.
- Індукція апоптозу або некрозу.
- Стимуляція або інгібування біологічних процесів.

3. Тканинний рівень:

- Термальна коагуляція або некроз.
- Стимуляція регенерації тканин.

Застосування лазерного випромінювання.

1. Медицина:

- Лазерна хірургія: розрізання тканин, коагуляція судин.
- Фотодинамічна терапія: лікування раку через активацію світлочутливих препаратів.
- Офтальмологія: корекція зору, лікування катаракти.

2. Діагностика:

- Флуоресцентна мікроскопія для візуалізації клітин і тканин.
- Лазерна спектроскопія для аналізу біомолекул.

3. Біотехнології:

- Лазерна мікроманіпуляція клітин.
- Лазерне секвенування та аналіз ДНК.

4. Наукові дослідження:

- Дослідження взаємодії лазера з біологічними молекулами.
- Вивчення фотохімічних процесів у клітинах.

Потенційні ризики

1. Пошкодження тканин:

- Теплові опіки, некроз.
- Утворення вільних радикалів, що можуть спричиняти мутації.

2. Довгострокові ефекти:

- Можливість канцерогенезу через пошкодження ДНК.

3. Негативний вплив на очі:

- Лазерне випромінювання може спричиняти пошкодження сітківки або рогівки.

Лазерне випромінювання — це потужний інструмент для впливу на біологічні об'єкти, що знаходить застосування в медицині, біотехнологіях і науці. Однак його використання потребує точного контролю, щоб забезпечити бажаний ефект і мінімізувати ризики для здоров'я.

У далекій інфрачервоній області спектру відбувається різке зниження проникності. Глибина проникнення лазерного випромінювання певної довжини хвилі визначається, в основному, ступенем поглинання даної довжини хвилі молекулами води, які містяться у поверхневих шарах шкіри. Так, молекулами води найбільш ефективно адсорбується випромінювання ультрафіолетового та інфрачервоного діапазонів спектру. Саме тому випромінювання з такими довжинами хвиль проникає через шкіру на найменшу глибину. Випромінювання з довжинами хвиль 0,6-1,5 мкм відносно слабо поглинається молекулами води і тому досить глибоко проникає у біотканини (Рис.1.9). Таким чином, максимуми пропускання шкірою електромагнітного випромінювання знаходяться у червоній та ближній інфрачервоній областях спектру (так звана прозорість біологічних тканин [16]).

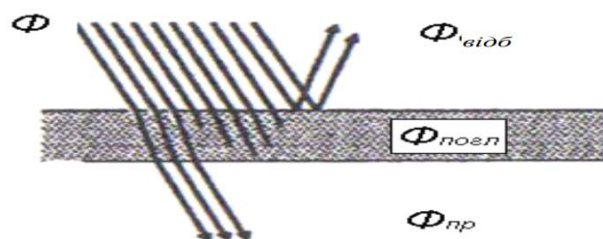


Рис.1.8. Оптичні властивості біотканин: Φ - падаючий потік, Φ відб. -

- потік променів, який відбивається, Φ погл - потік променів, який поглинається, Φ пр - потік променів, який пропускається [15].

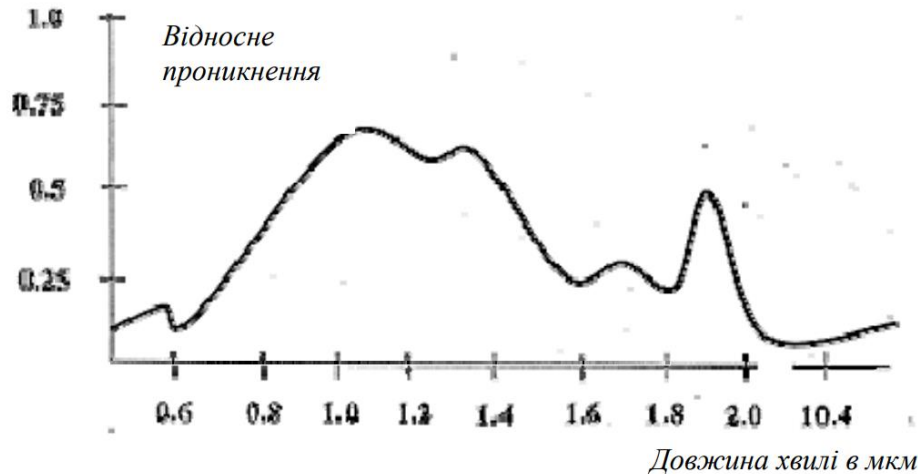


Рис.1.9. Глибина відносного проникнення лазерного випромінювання у біологічні тканини в залежності від довжини хвилі світла [19].

Ступінь поглинання лазерного випромінювання у значній мірі залежить від виду біологічної тканини. Різні тканини мають різні коефіцієнти поглинання лазерного випромінювання тієї самої довжини хвилі. Так, у червоній та ближній інфрачервоній областях спектру ($\lambda = 620-1300$ нм) шкіра поглинає 25-40 % лазерного випромінювання, м'язи та кісткова тканина – 30-80 %, паренхімні органи (серце, печінка, нирки, підшлункова залоза, селезінка) – до 100 %. Розробці методу визначення коефіцієнтів пропускання та відбивання були посвячені дослідження Г. Г. Шамаєвої та ін. (1969) [19]. Дані, отримані цим методом при опроміненні щурів неодимовим лазером, були використані для розрахунку коефіцієнта поглинання тканини шкіри, який склав $9,9 \text{ см}^{-1}$. Л. І. Дерлеменко (1969), М. І. Данко та ін. (1972) з допомогою інтегрального фотометра виявляли поглинання випромінювання неодимового лазера тканинами м'язів та печінки щурів. Через шар тканини товщиною 1 мм при опроміненні м'язів проходило 27-32 % випромінювання, печінки – 20-23 %. Для шарів тканини товщиною 6 мм цей показник склав відповідно 3 та 1,5 % [7]. Ці експериментальні дані демонструють залежність поглинання лазерного випромінювання від ступеню забарвлення тканини: сильно пігментована тканина печінки поглинає випромінювання інтенсивніше за тканину м'язів. Така ж закономірність спостерігалась і у дослідженнях по опроміненню рубіновим та неодимовим лазерами різних пухлин у тварин. Завдяки наявності меланіну, найбільше поглинання властиве меланомам. Таким

чином, спектр поглинання лазерного випромінювання визначається типом домінуючих поглинальних центрів із вмістом води у клітині та тканині[30].

Характер дії лазерного випромінювання на клітину визначається її складом та коефіцієнтом поглинання різних довжин хвиль випромінювання [15-19]. Оскільки біологічні тканини є оптично неоднорідним середовищем поглинання із середнім показником заломлення більшим, ніж у повітря, на межі розділу „біооб’єкт-повітря” частина випромінювання відбивається. Відбивання (Φ відб) – основна причина втрати енергії лазерного випромінювання при дії на біологічний об’єкт (рис. 1.8). Для більшості внутрішніх органів коефіцієнт відбивання у видимій та ближній інфрачервоній областях спектру складає 10-30 %, а відбивання очного дна змінюється від 2 до 20 % для довжин хвиль 0,4-1,0 мкм[9]. Коефіцієнт відбивання лазерного випромінювання шкірою знаходиться у межах 10- 55 % та залежить від спектру випромінювання, а також від ступені пігментації та зморшкуватості шкіри, наявності у ній жиру та вологи, які у свою чергу, залежать від статі, віку та кольору шкіри. Збільшення кута падіння променя на тканину призводить до різкого зростання коефіцієнта відбивання. Останній знижується в середньому на 15 % при охолодженні ділянки дії. Колір шкіри також суттєво впливає на коефіцієнт відбивання: чим темніша шкіра, тим нижчий коефіцієнт відбивання. На ділянках пігментації коефіцієнт відбивання знижується на 6-8 %.

Основними розсіювачами для більшості біотканин є клітинні мембрани, ядра та органели клітини. Розсіювання (рис.1.8) випромінювання всередині біотканини залежить від негомогенних структур тканини та визначається показниками заломлення різних частинок та різницею показників заломлення між частинками та оточуючим їх середовищем. Хвилі, які мають довжину більшу за діаметр частинки (більше 10 мкм), розсіюються ними у незначній мірі. Для більшості біотканин розсіювання – вагома складова у видимій та ближній інфрачервоній областях спектру. Для довжин хвиль 0,45-0,59 мкм розсіювання та поглинання відіграють приблизно рівнозначну роль у проникненні лазерного випромінювання крізь тканину, а для довжин хвиль 0,6-1,5 мкм розсіювання переважає над поглинанням [30].

Таким чином, головний ефект взаємодії лазерного випромінювання з біологічною тканиною – результат його поглинання останньою. Останнім часом інтенсивно розробляється концепція прямої дії на біооб'єкт внаслідок резонансного поглинання лазерного випромінювання на молекулярному рівні (Т. Кару, [15]). На користь цієї концепції свідчить ряд обставин. По-перше, у досліджах *in vitro* кількісні спектроскопічні дослідження показали резонансний характер впливу променів на різні клітини у залежності від довжини хвилі випромінювання, а також дози та потужності. По-друге, більшість ефектів низькоінтенсивної лазерної стимуляції є вторинними. Дані сучасної фізіології заперечують наявність у шкірі тварин та людини специфічних фоторецепторів. Внаслідок цього зміни психофізіологічного стану людини пов'язані із змінами внутрішньоклітинного метаболізму, тобто є наслідками вторинних ефектів [14].

Про наявність у клітин спектрально-залежної фоточутливості свідчать також дані Т. Кару зі співавторами [15]), які довели, що максимальна стимуляція синтезу ДНК у досліджах з опроміненням клітин червоним світлом спостерігалася при дозі 100 Дж/см² і ефект швидко знижувався при зміні дози у будь-яку сторону.

Основним поглинаючим компонентом при опроміненні біологічних тканин інфрачервоним (ІЧ) лазерним випромінюванням з довжиною хвилі 890 нм (ближній інфрачервоний діапазон) є кров. Механізм дії ІЧ лазерного випромінювання (0,8-1,4 мкм) визначається його низькою енергією, нездатністю викликати виражений фотохімічний ефект. При поглинанні тканинами ІЧ випромінювання перетворюється у теплову енергію вібрації молекул. Як наслідок різкого теплового розширення протоплазми клітин може виникнути гідродинамічний удар, який є вихідним імпульсом більш загальної дії ІЧ випромінювання. В результаті перебігу даних процесів різні біологічні сполуки переходять в активний стан або інактивуються. Встановлено, що світло у ближній ІЧ області спектра слабо поглинається меланіном, водою та іншими компонентами тканин, що обумовлює його високу проникність. Таким чином, специфічність відповіді на дію лазерного випромінювання чітко проявляється у особливостях первинної відповіді (фотореакції) та послідуєчих етапів спряження, які

запускаються в результаті локальних атомно-молекулярних змін [14]. Окрім того, існує думка, що завдяки наявності у кисню смуги поглинання поблизу 640 нм, він активно поглинає червоне світло та переходить у синглетний стан. Кисень у синглетному стані зберігається лише мить, проте є високо реактивним медіатором біологічних процесів. Вплив синглетного кисню на клітинний метаболізм відбувається через зміну рівня вільних радикалів. Синглетний кисень призводить також до зміни міжклітинної водної структури, що сприяє кращому наповненню крові киснем. В результаті пришвидшується синтез білків, РНК, ДНК, збільшується швидкість синтезу колагену та його попередників, змінюється кисневий баланс та активність окисно-відновних процесів [15].

Узагальнюючи літературні дані щодо впливу випромінювання низької інтенсивності на біологічні об'єкти, можна виділити наступні рівні реалізації реакції організму на цей вплив [16-19].

- Субклітинний (молекулярний) – виникнення збуджених станів молекул, утворення вільних радикалів, стереохімічна перебудова молекул, збільшення швидкості синтезу білків, РНК, ДНК, зміна активності окисно-відновних процесів;
- Клітинний – зміна заряду електричного поля клітини, її мембранного потенціалу, збільшення проліферативної активності тощо;
- Тканинний – зміна рН міжклітинної рідини, морфо-функціональної активності та мікроциркуляції [30].

Розділ 2. МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Експериментальна установка.

Спектральні властивості компонентів біоінформаційних молекул нуклеїнових кислот вивчали спектрофотометричним методом.

Спектри пропускання і поглинання молекул досліджували за допомогою спектрофотометра СФ-16, який дає змогу зняти залежність величини пропускання T або оптичної густини D від довжини хвилі. Оптична густина D зразка вимірюється відносно еталону (повітря). При цьому пропускання еталону приймається за 100%, а оптична густина дорівнює нулю[18].

Під оптичною густиною D розуміють співвідношення:

$$D = \lg (I_0 / I),$$

де I_0 - інтенсивність падаючого світла; I - інтенсивність світла, яке пройшло через об'єкт.

Спектрофотометр працює в діапазоні від 200 до 1200 нм. При дослідженнях у видимій та інфрачервоній областях спектру як джерело світла використовують лампу розжарювання, а в ультрафіолетовій області водневу лампу. Приймачами світла служать фотоелементи. В області 200-650 нм використовують сурм'яно-цезієвий фотоелемент, а в області 650 -1200 нм - киснево-цезієвий[18].

Прилад працює за методом електричної компенсації - фотострум компенсується струмом стандартного джерела ЕРС.

Вимірювання пропускання досліджуваного зразка здійснюється в три етапи[19]:

- компенсація темного струму фотоелементів;
- регуляція світлового потоку при встановленому еталонному зразку;
- вимірювання пропускання досліджуваного зразку.

Для кожного препарату вимірювання здійснено не менше трьох разів. Похибка при визначенні довжини хвилі на СФ-16 не перевищує 0,1%. Похибка при вимірюванні спектру поглинання становить не більше 0,2% .

Оптична схема спектрофотометра приведена на рис.2.1.

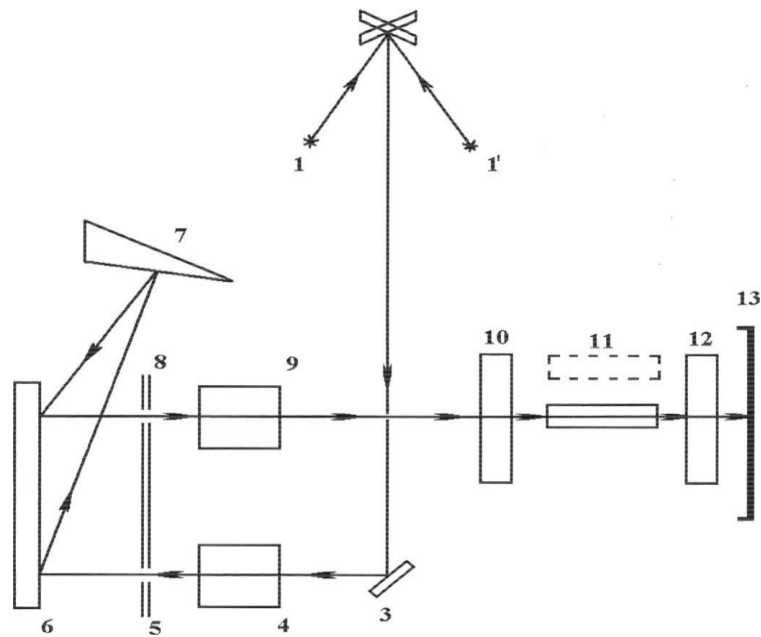


Рис.2.1. Оптична схема спектрофотометра СФ-16[17]:

1, 1' - джерела світла; 2 - дзеркальний конденсор; 3 - плоске дзеркало; 4, 9 - лінзи; 5 - вхідна щілина; 6 - об'єктив; 7 - диспергуюча призма; 8 - вихідна щілина; 10 - фільтр; 11- еталон; 12 - захисна пластина; 13 - фотоелемент.

Світло від джерела 1 або 1' попадає на дзеркальний конденсор 2, який направляє його на плоске дзеркало 3. Дзеркало відхиляє пучок променів на кут 90° і направляє його на вхідну щілину приладу 5, захищену пластиною 4. Від дзеркального об'єктива паралельний пучок променів попадає на диспергуючу призму 7, яка розкладає його в спектр. Пройшовши призму під кутом, близьким до кута найменшого відхилення, пучок фокусується об'єктивом на вихідній щілині 8. Обертаючи призму, можна отримати на виході монохроматора світло різних довжин хвиль, яке, пройшовши щілину 8, кварцову лінзу 9, фільтр 10, еталон (зразок) 11 і захисну пластину 12 потрапляє на світлочутливий шар фотоелемента 13.

Основою експерименту є методика пучків електронів та молекул, що перетинаються, яка була успішно застосована раніше. Пучок молекул урацилу отримується за допомогою термічного ефузійного джерела багатоканального типу та системи колімуючих щілин. Складовими частинами ефузійного джерела є: мідний контейнер з препаратом урацилу, резистивний нагрівник контейнера, прокалібрований термопарний (хромель-алюмель) датчик температури контейнера, теплові екрани. Сам контейнер було виконано у вигляді порожнистого циліндра, на одному з кінців якого монтувався елемент із ефузійними каналами (100 каналів на площі $1; 5; 5 \text{ мм}^2$), а на протилежному – герметична закривка. На ній розміщався препарат урацилу (фірма Sigma-Aldrich, чистота 99%) та датчик температури. Конструкція нагрівника була такою, що температура елемента з мікроканалами була на 10 С вищою від температури закривки (93 С). Таким чином не допускалося закупорення 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 являв собою мідну камеру циліндричної форми із вхідною щілиною S4 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 С , що забезпечувало стабільність параметрів гармати під час роботи. 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 додатним потенціалом. 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).

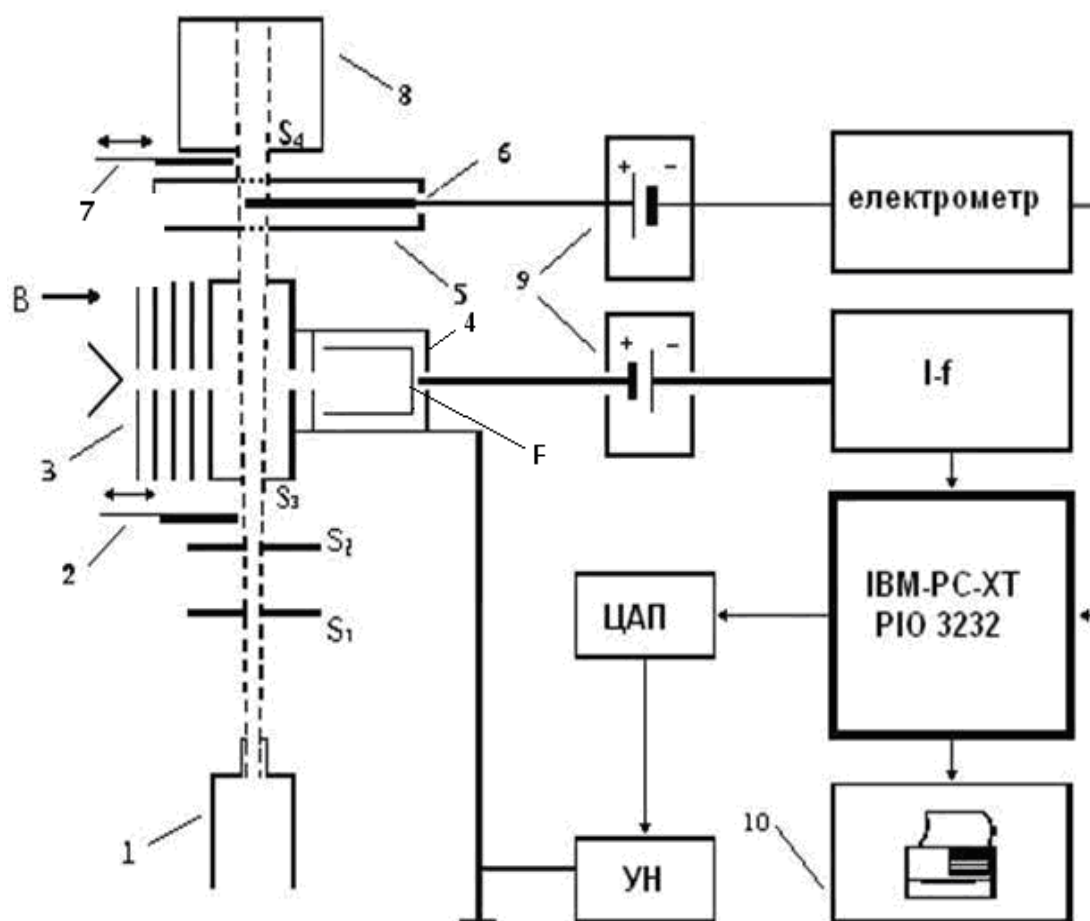


Рис 2.2. Умовна схема досліду: 1 – металева ампула із зразком; S1 – S4 – формуючі апертури; 2, 7 – шибери пучка молекул; 3 – джерело пучка електронів; 4 – охоронний анод; F – приймач електронів; 5 – приймач іонів; 6 – іонний осьовий електрод; 8 – молекулярна пастка; 9 – джерела живлення; 10 – принтер; I-f – перетворювач «струм-частота»; ЦАП – цифрово-аналоговий перетворювач; УН – електронний підсилювач.

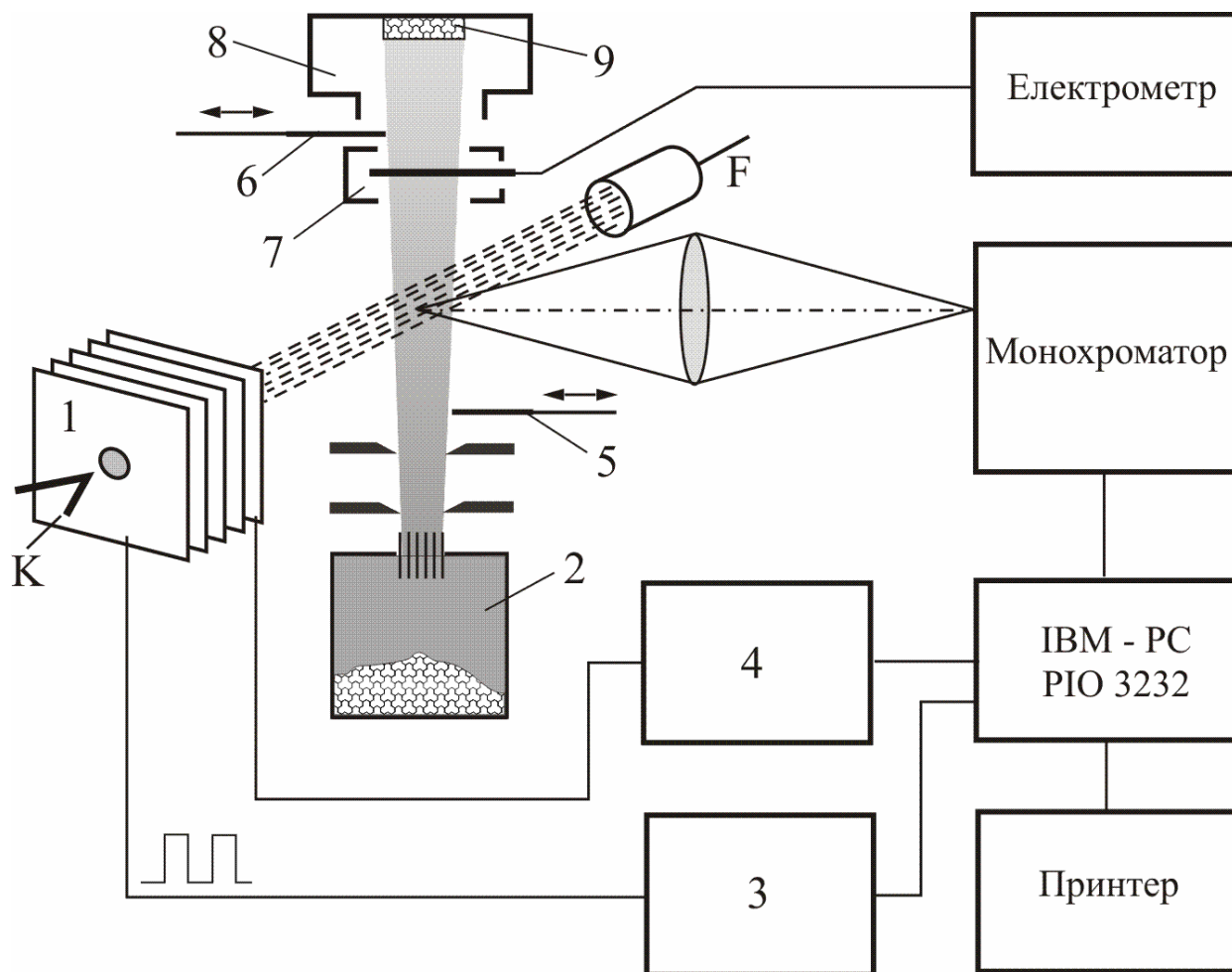


Рис 2.3. Блок-схема експериментальної установки для дослідження збудження молекул електронним ударом (пучкова методика):

1 – електронна гармата; 2 – контейнер з речовиною; 3 – підсилювач; 4 – джерело скануючого потенціалу; 5, 6 – засувка молекулярного пучка; 7 – колектор іонів; 8 – колектор молекулярного пучка; 9 – конденсат молекулярного пучка; К – катод; F – колектор електронів.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Результати спектрів поглинання

Вивчались спектральні характеристики молекул нуклеїнових кислот та їх компонентів – азотистих основ: аденіну, тиміну, гуаніну, цитозину. Використовувались препарати фірми Reanal[20].

Для експериментів готувались препарати біомолекул концентрацією 30 мкг/мл у буферному розчині (0,15 М NaCl + 0,015М цитрат Na).

У спектральній області 210 – 350 нм через кожні 5 -10 нм проводились вимірювання поглинання і пропускання розчинів досліджуваних препаратів.

За допомогою спектрофотометричної методики у діапазоні 200-750 нм досліджено спектри поглинання водних розчинів біомолекул нуклеїнових кислот ДНК і РНК, а також азотистих основ:

пуринових (аденін, гуанін)

піримідинових (тимін, урацил).

Отримані результати приведені на рис.3.1- 3.7.

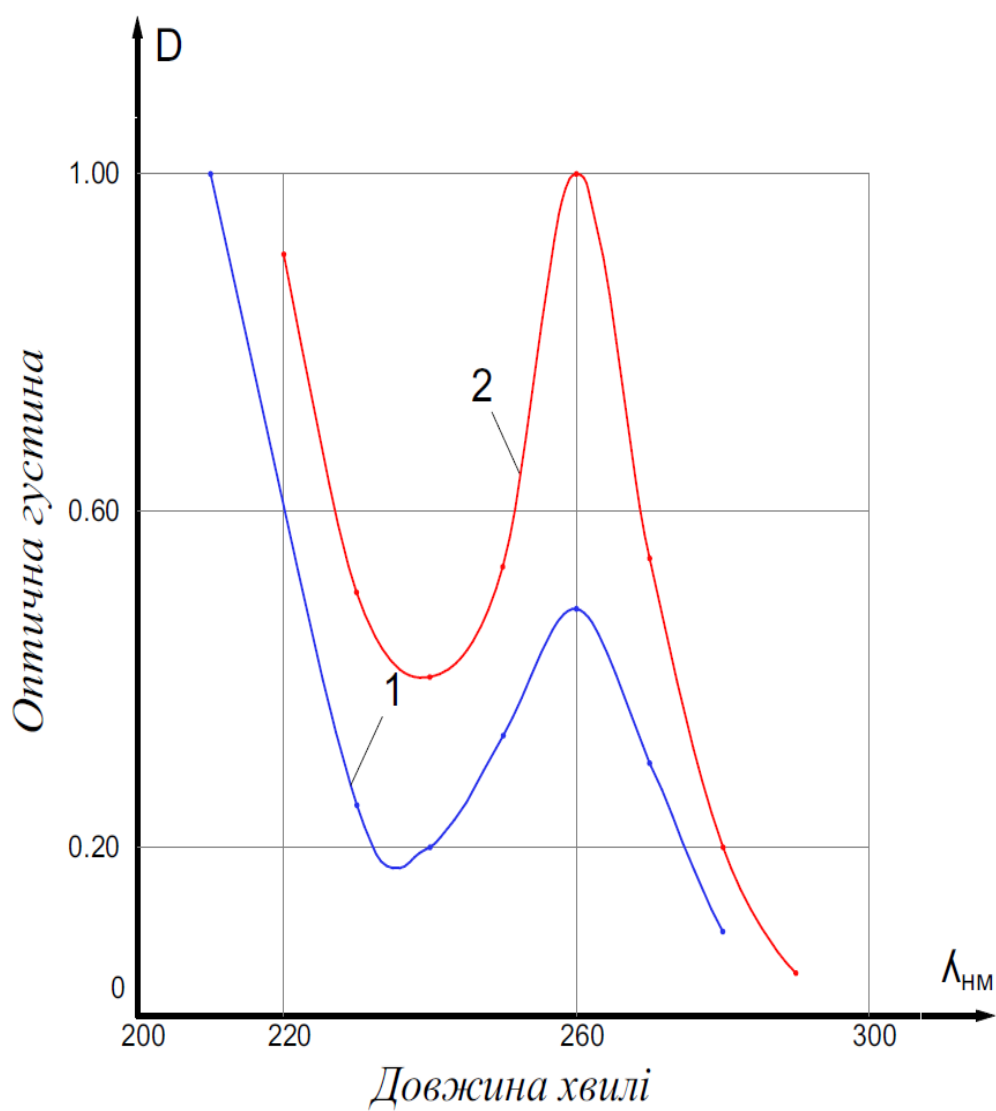


Рис. 3.1. Спектри поглинання розчинів ДНК: 1 - нативна ДНК; 2 - денатурована ДНК.

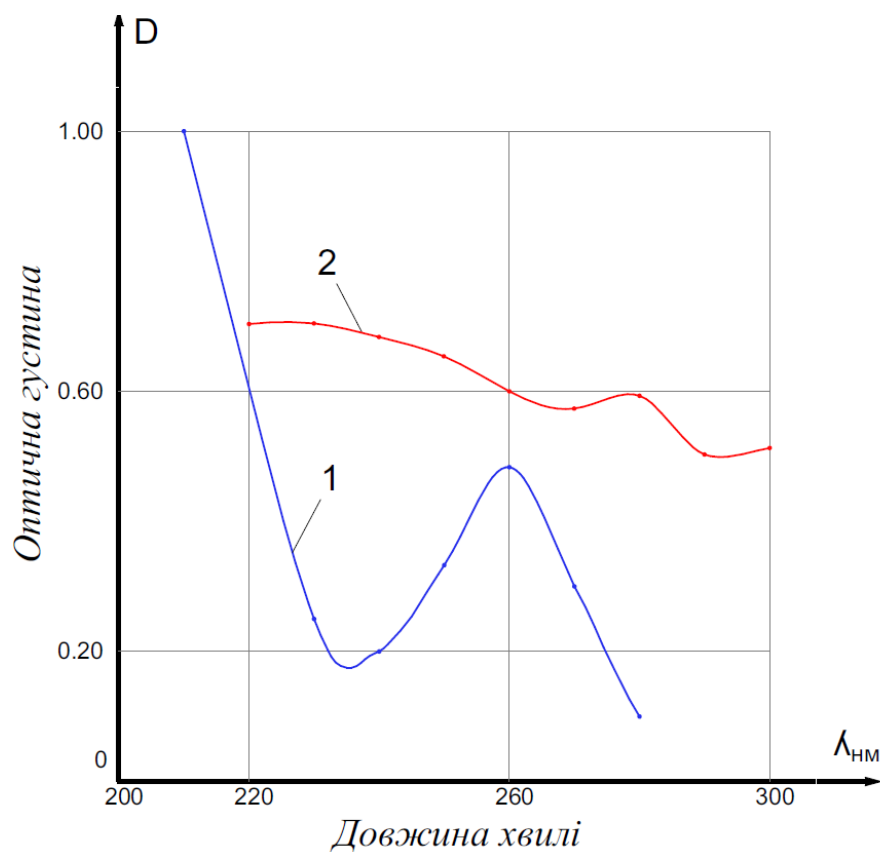


Рис. 3.2. Спектри поглинання розчинів ДНК: 1 - нативна ДНК; 2 - денатурована ДНК (вплив ультрафіолету.).

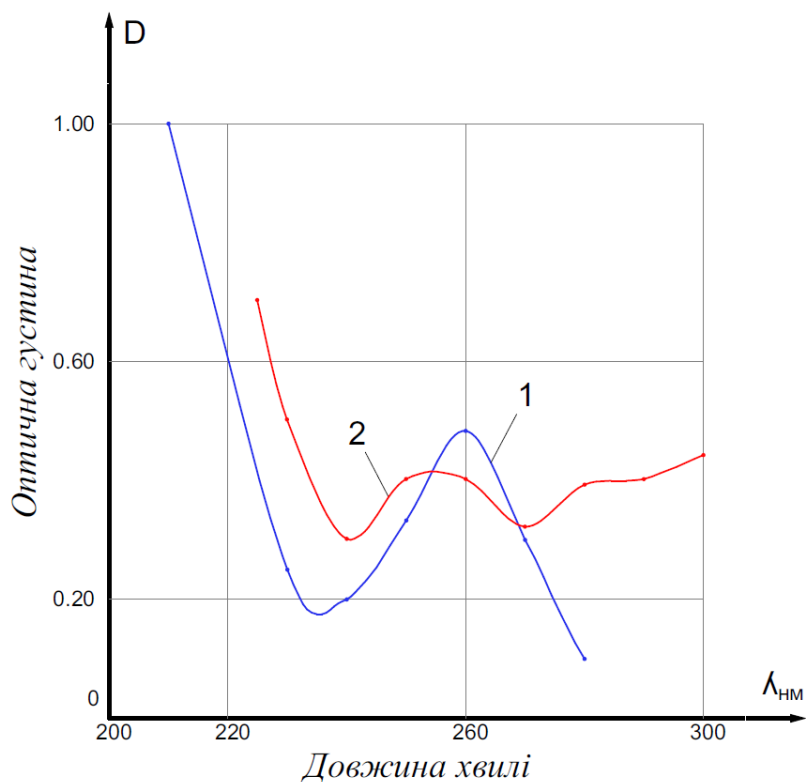


Рис. 3.3. Спектри поглинання розчинів ДНК: 1 - нативна ДНК; 2 - денатурована ДНК (розчин при кімнатній температурі; вплив ультрафіолету протягом 2-х годин).

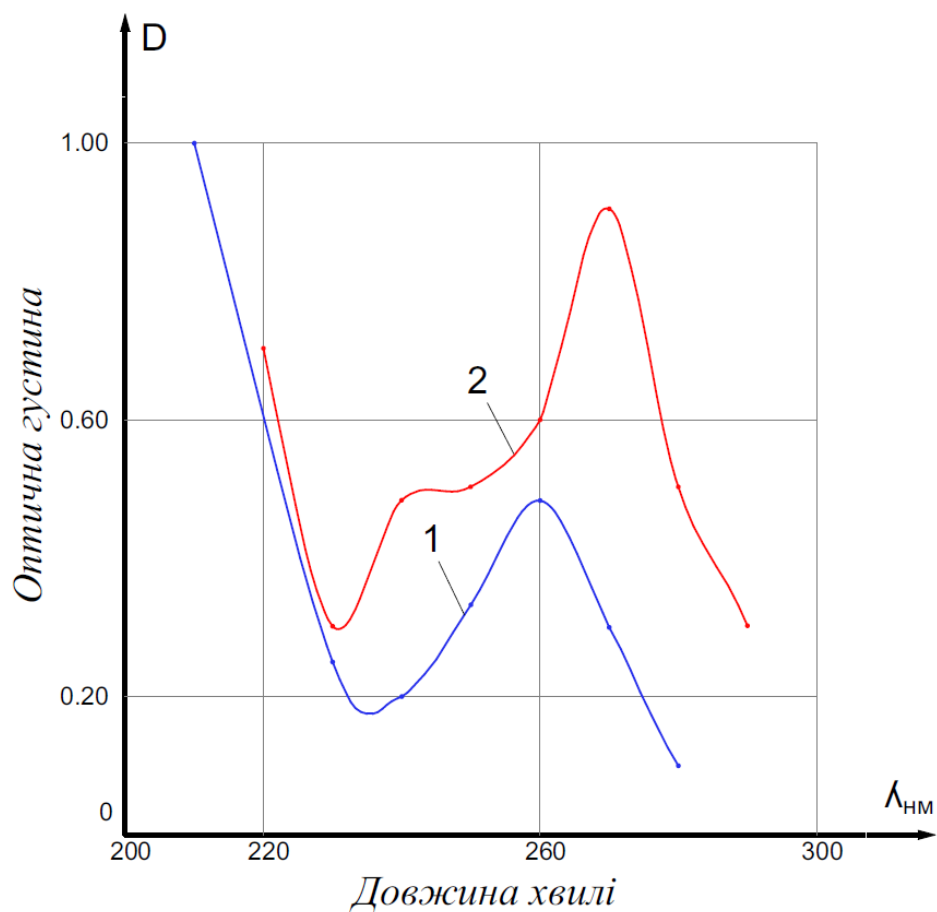


Рис. 3.4. Спектри поглинання розчинів ДНК: 1 - нативна ДНК; 2 - аденін.

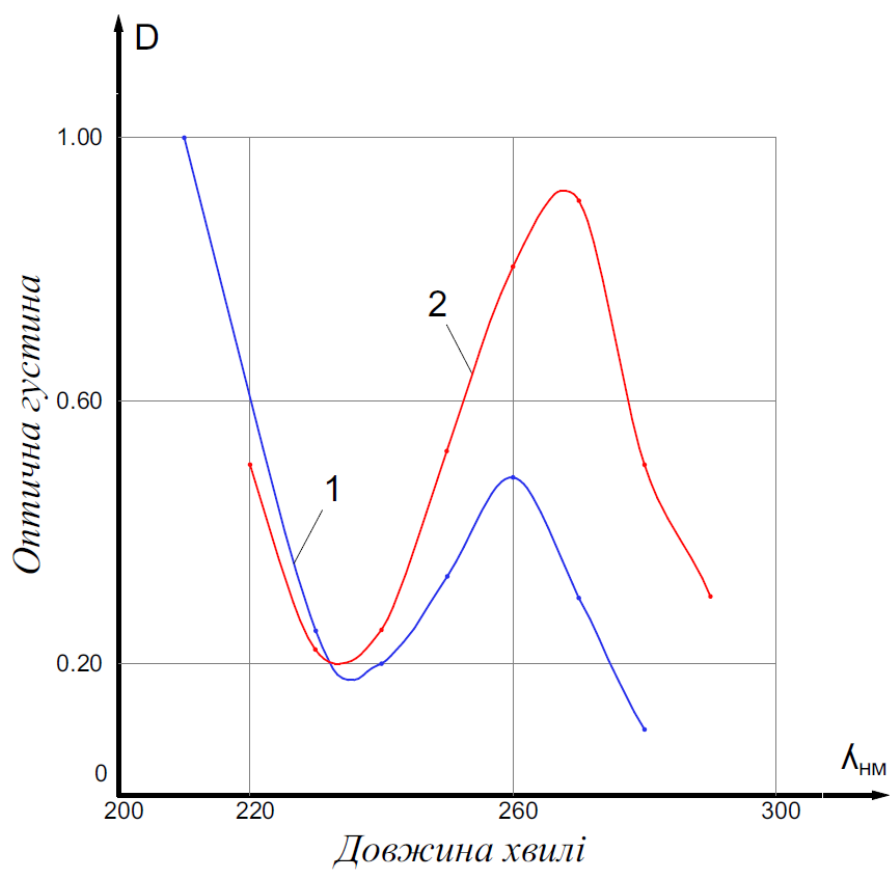


Рис. 3.5. Спектри поглинання розчинів ДНК: 1 - нативна ДНК; 2 - гуанін.

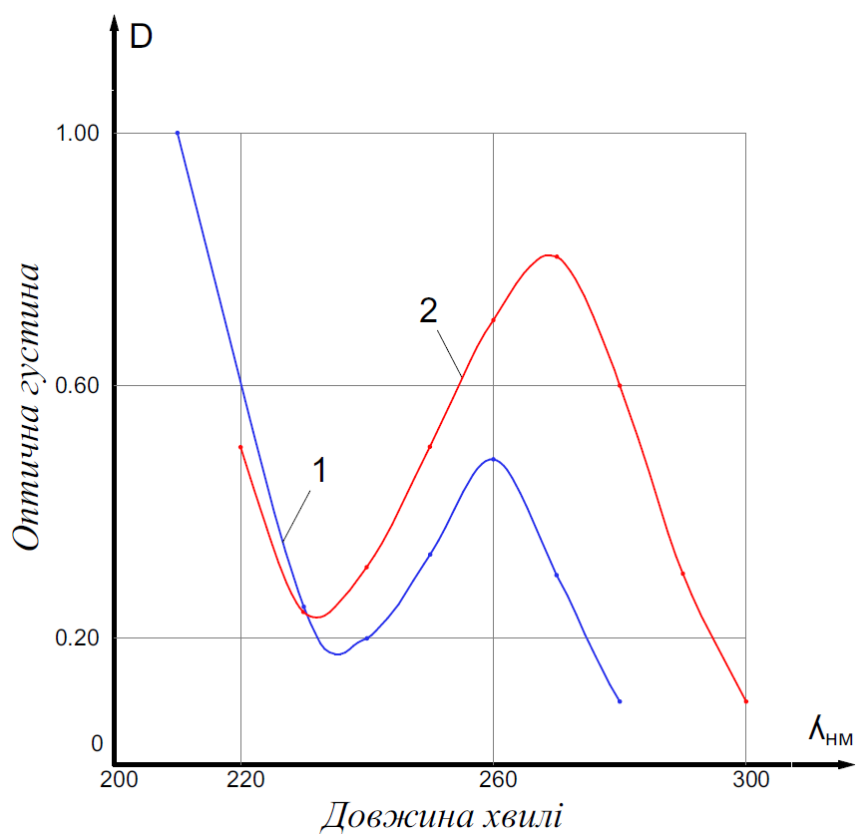


Рис. 3.6. Спектри поглинання розчинів ДНК: 1 - нативна ДНК; 2 - тимін.

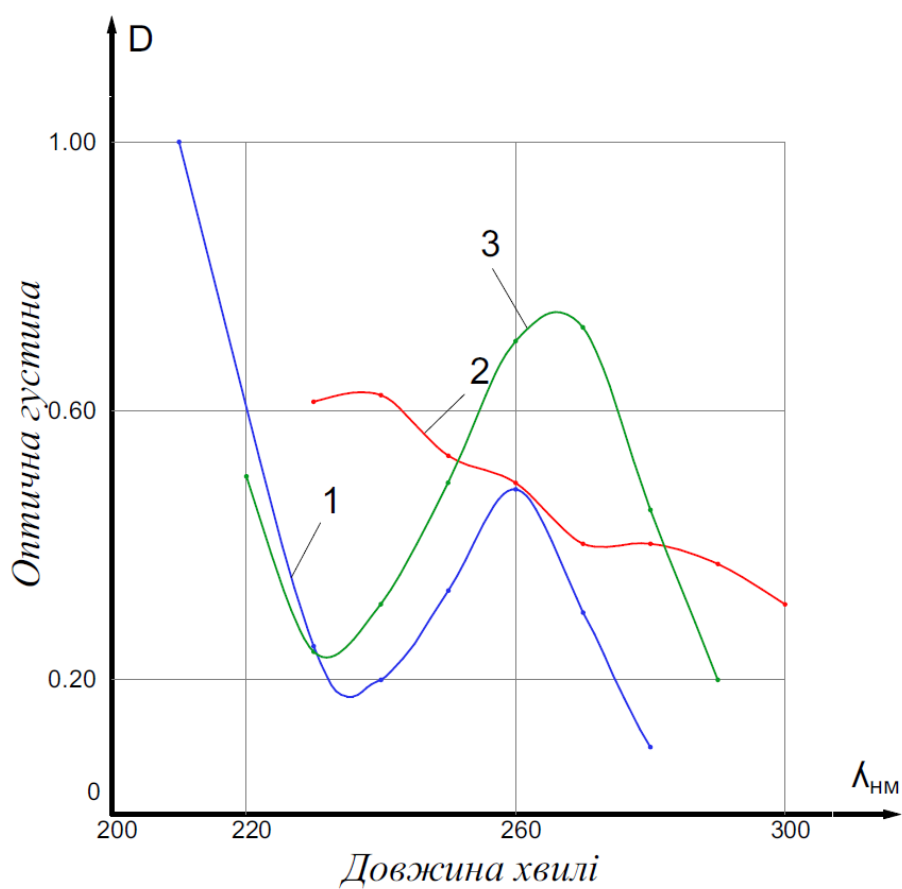


Рис. 3.7. Спектри поглинання розчинів ДНК: 1 - нативна ДНК; 2 – урацил; 3 – урацил (контроль)

Як видно із приведених графіків, нуклеїнові кислоти та їх компоненти інтенсивно поглинають лише ультрафіолетове світло. Максимум молекулярної смуги знаходиться біля 260 нм для ДНК і РНК.

Для азотистих основ: 272 нм для аденіну; 271 нм для тиміну; 272 нм для гуаніну; 268 нм для урацилу. Тобто основи є хромоформними групами для досліджуваних біополімерів.

У видимій частині спектру - більше 400 нм – нуклеїнові кислоти “прозорі”. Очевидно, це результат тривалої еволюції, щоб забезпечити максимальне збереження генетичного матеріалу.

При впливі денатуруючих факторів (висока температура, буфери) у спектрах біополімерних молекул ДНК і РНК спостерігається гіперхромний ефект. Це свідчить про зміни на рівні вторинної структури внаслідок руйнування водневих зв'язків між комплементарними парами основ..

При дії ультрафіолету зменшується поглинання в основній смугі для нуклеїнових кислот (256-272 нм) і появляється додаткова, менш інтенсивна смуга біля 300 нм. Цей ефект можна пояснити утворенням димерів піримідинових основ.

Таким чином, вивчення спектральних особливостей біомолекул дозволяє розкрити молекулярні механізми фотобіологічних ефектів. Слід відмітити, що фотохімічні реакції у клітинах приводять до принципово інших наслідків, ніж опромінення повільними електронами таких же енергій [20-24].

Вплив світла на молекулярному рівні, а саме реалізація фотобіологічних наслідків починається з моменту поглинання енергетичного кванта фоточутливою біомолекулою. Взагалі, фотобіологічною активністю володіє світло в ультрафіолетовій, видимій та ближній інфрачервоній областях спектру. Для кожного спектру існують відповідні молекули, які його найбільш інтенсивно поглинають [15]. Ультрафіолетове випромінювання поглинається переважно молекулами нуклеїнових кислот, білків. Встановлено, що найбільшу дію промені проявляють на азотисті основи нуклеїнових кислот. Таким чином, специфічність

відповіді на дію випромінювання чітко проявляється у особливостях первинної відповіді (фотореакції) та послідуючих етапів спряження, які запускаються в результаті локальних атомно-молекулярних змін [25], що призводить до мутацій загибелі клітин внаслідок утворення димерів, насамперед тиміну.

3.2. Результати збуджень молекул урацилу електронним ударом.

Формування газової фази урацилу відбувалося шляхом його нагріву в окремому металевому контейнері. Утворена газова фаза урацилу по паропроводу надходила у замкнену кубічну форму (комірку) об'ємом 2 см^3 . Температура контейнера з порошком урацилу не перевищувала 350 K . На одній із зовнішніх граней комірки монтувалися діафрагма (діаметр $1,5 \text{ мм}$) для вводу електронного пучка та джерело пучка, а на протилежній – приймач пучка електронів (циліндр Фарадея). Пучок електронів формувався п'ятиелектродною гарматою із вольфрамовим катодом. Комірка поміщалася у магнітне поле так, що його силові лінії були паралельними електронному пучку. Калібрування шкали енергій електронів здійснювалося за значенням енергетичного порога збудження смуги молекулярного азоту $\lambda = 315,9 \text{ нм}$ (електронний перехід $X^1\Sigma_g^+ \text{ C}^3\Pi_u -$ друга позитивна система) з похибкою $0,25 \text{ eV}$. Індукція магнітного поля становила $1,2 \cdot 10^2 \text{ Тл}$. Для виведення випромінювання із комірки на її грані було змонтовано кварцове віконце. Для реєстрації випромінювання був використаний *спектрофотометр*, який складався із *дифракційного монохроматора (МДР-23)* з оберненою дисперсією 1 нм/мм , фотоелектронного помножувача (ФЕУ-106) та системи реєстрації фотоелектронних імпульсів. Для покращення відношення сигнал шум система реєстрації працювала у режимі рахунку фотоелектронних імпульсів разом з модуляцією електронного пучка. Експерименти проводилися при таких умовах: сила струму пучка електронів знаходилася у межах $(3-4) \cdot 10^5 \text{ А}$ при енергетичній неоднорідності електронів на піввисоті їх енергетичного розподілу $E_{1=2} 0,5 \text{ eV}$; ступінь вакууму у камері, де розміщалася комірка з парами урацилу, становив $1 \cdot 10^5 \text{ Па}$. Для уникнення конденсації парів урацилу на віконцях та електродах

електронноїармати комірка нагрівалася до температури 370 К.

В результаті проведених експериментів було виявлено утворення негативних іонів урацилу при взаємодії його молекул з електронним пучком. Вперше експериментально виміряні абсолютні величини повних ефективних перерізів для негативних іонів урацилу в області енергій електронів від 0,4 до 5 еВ. Отримані результати наведено на **рис. 3.8**, де по осі ординат відкладено переріз іонізації в см^2 , а по осі абсцис енергію бомбардуючих електронів в еВ.

Процес утворення негативних іонів урацилу має резонансний характер з його максимальним проявом при енергії електронів 1,1 еВ. Окремо слід зупинитися на абсолютній величині перерізу утворення негативних іонів урацилу. Максимальне значення цього перерізу, за нашими вимірами, становить $5 \cdot 10^{18} \text{ см}^2$. Вимірний ефективний переріз має зміст повного перерізу, тобто включає перерізи утворення негативних іонів як цілої молекули, так і її фрагментів (так звані парціальні перерізи). Але 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 з найбільшою імовірністю 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 з піримідиновим кільцем.

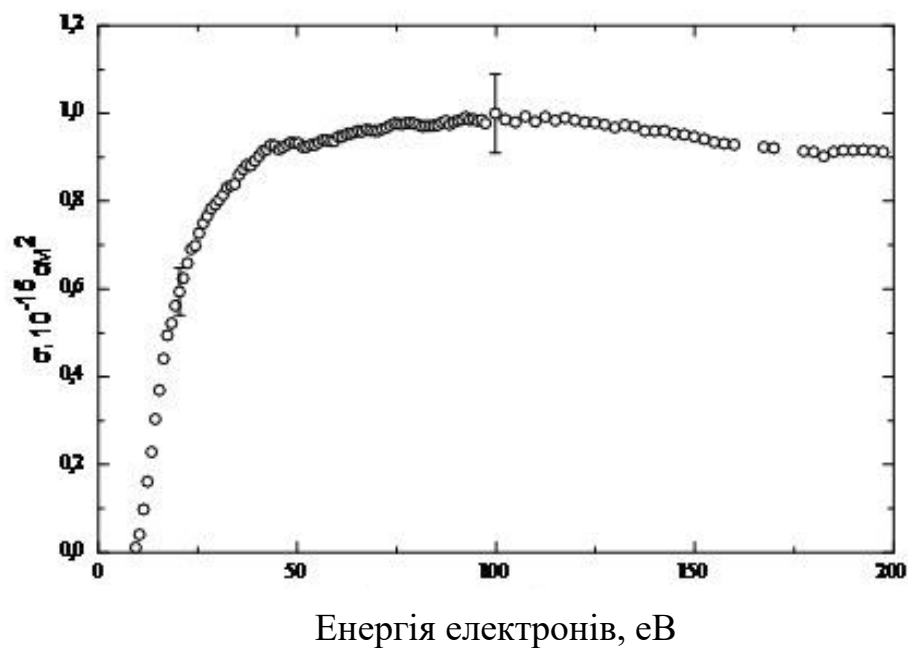


Рис. 3.8. Залежність абсолютної величини повного перерізу утворення позитивних іонів урацилу від енергії електронів [28].

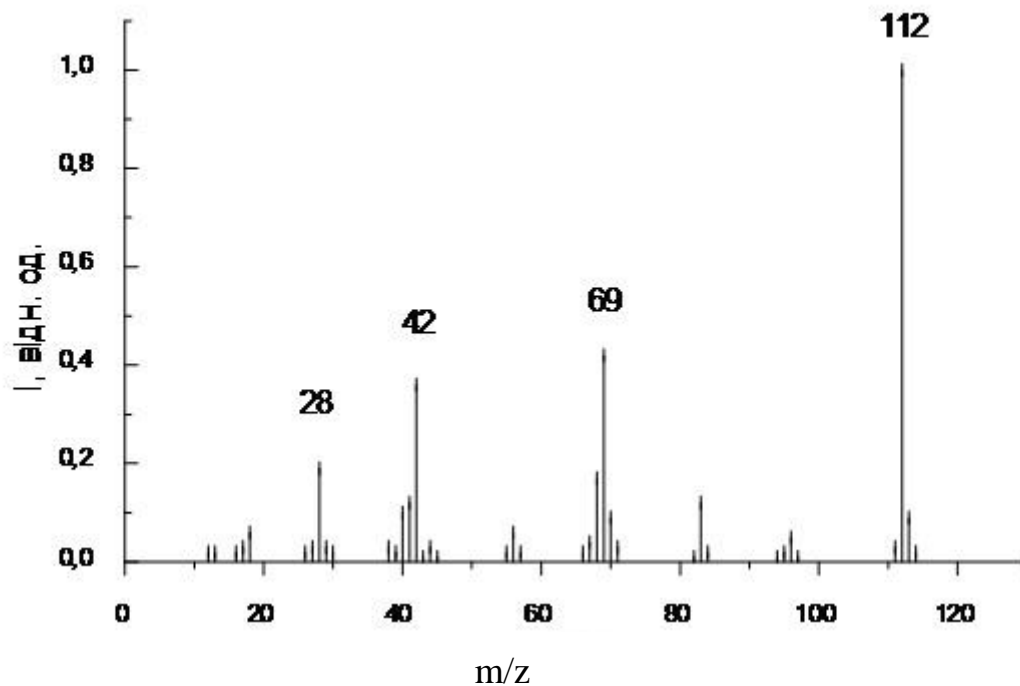


Рис. 3.9. Мас-спектр молекул урацилу [29].

ВИСНОВКИ

У результаті виконання роботи можна зробити такі висновки:

1. Вивчення наукової літератури показало, що молекули біологічного походження є перспективними матеріалами для нових технологій. Тому необхідно досліджувати фізичні властивості біомолекул нуклеїнових кислот та з'ясувати, які фактори можуть змінювати їхню фізичну структуру.

2. За допомогою спектрофотометричної методики у діапазоні 200-750 нм досліджено спектри поглинання водних розчинів біомолекул нуклеїнових кислот ДНК і РНК, а також азотистих основ: пуринових (аденін, гуанін) і піримідинових (тимін, урацил). Встановлено, що нуклеїнові кислоти та їх компоненти інтенсивно поглинають ультрафіолетове світло. Максимум молекулярної смуги знаходиться біля 260 нм для ДНК і РНК і при 268-272 нм для основ.

3. В результаті проведених експериментів було виявлено утворення негативних іонів урацилу при взаємодії його молекул з електронним пучком. Вперше експериментально виміряні абсолютні величини повних ефективних перерізів для негативних іонів урацилу в області енергій електронів від 0,4 до 5 еВ.

4. При впливі денатуруючих факторів (висока температура, буфери) у спектрах біополімерних молекул спостерігається гіперхромний ефект. Опромінення ультрафіолетом призводить до зменшення поглинання в основній смузі для нуклеїнових кислот і до появи додаткової, менш інтенсивної смуги біля 300 нм. Цей ефект можна пояснити утворенням димерів піримідинових основ.

ЛІТЕРАТУРА

1. П.Г. Костюк, В.Л. Зима, М.С. Мірошніченко, М.Ф. Шуба. Біофізика.-К.: Вища школа, 2001. -760с.
2. Kuzin, A. Electromagnetic information in the phenomenon of life // Biofizika. 2000. V. 45. P. 144-147.
3. Волькенштейн М.В. Біофізика. – М.: Наука, 1988.- 680с.
4. Bull J.N., J. Lee W.L., Vallance C. Absolute electron total ionization cross-sections: molecular analogues of DNA and RNA nucleobase and sugar constituents // Physical Chemistry Chemical Physics. 2014. V. 16, P. 10743–10752.
5. Champion C. Quantum-mechanical predictions of electron-induced ionization cross sections of DNA components // The Journal of Chemical Physics. 2013. V. 138, P. 184306.
6. Afrosimov V.V., Basalaeв A.A., Morozov Yu.G, Panov M.N., Smirnov O.V. & Tropp E.A. Fragmentation of adenine and uracyl molecules through electron captures in collisions with ions // Technical Physics. 2012, V. 57 P. 594–602.
7. Рубін А.Б. Біофізика.- К.: Вища школа.-745с.
8. Middleton C.T., La Harpe K., Su Ch., Crespo-Hernandez C.E., Cohen B., Kohler B. DNA excited-state dynamics: from single bases to the double helix // Phys. Chem. 2009. V.60. P. 217–239.
9. McCammon J.A., Gelin B.R., Karplus M. “Dynamics of folded proteins”. Nature V. 267, 1977.-P.585–590.
10. Vinodkumar M., Limbachiya C., Barot M., Swadia M., Barot A. Electron impact total ionization cross sections for all the components of DNA and RNA molecule // International Journal of Mass Spectrometry. 2013. V. 339-340, P. 16–23.
11. McCammon J.A., Gelin B.R., Karplus M. “Dynamics of folded proteins”. Nature V. 267, 1977.-P.585–590.
12. Karplus M., McCammon J.A. “Protein structural fluctuations during a period of 100 ps“// Nature V. 277,1979.-P. 578.

13. Metropolis N., Rosenbluth A., Rosenbluth M., Teller A., Teller E. "Equation of State Calculations by Fast Computing Machines" // J. Chem. Phys. V. 21, 1953. -P.1087–1092.
14. Посудін Ю.І. Біофізика і методи аналізу навколишнього середовища. – К.: Printline, 2013. – 354 с.
15. Posudin Yu. Physics with Fundamentals of Biophysics. K.: AN, 2004.–195 p.
16. Kudryashov Yu.B. Radiation Biophysics (Ionizing Radiations). New York: Nova Science Publishers, Inc., 2008. 327 p.
17. Dertinger H, Jung H. Molecular Radiation Biology. London: Hodder & Stoughton Ltd; New Ed edition. 1972. 250 p.
18. Чалий О.В. та ін. Медична і біологічна фізика.– К. : Кн. плюс, 2004.–760с.
19. Личковський Е.І. та інші. Біофізика. Фізичні методи аналізу та метрологія. – Вінниця.: Нова книга, 2014. – 463 с.
20. Minaev B.F, Shafranyosh M.I., Svyda Yu.Yu, Sukhoviya M.I., Shafranyosh I.I.. Fragmentation of the adenine and guanine molecules induced by electron collisions // J. Chem. Phys. – 2014. – v.140. – P.175101-1 – 175101-15.
21. Шафраньош М.І., Суховія М.І., Шафраньош І.І. Молекулярні механізми впливу низькоенергетичних факторів довкілля на біологічні структури; монографія. Ужгород : Видавництво УжНУ «Говерла», 2022. 338 с.
22. Shafranyosh, I. I.; Svida, Yu. Yu.; Sukhoviya, M. I.; Shafranyosh, M. I.; Minaev, B. F.; Baryshnikov, G. V.; Minaeva, V. A. Absolute effective cross sections of ionization of adenine and guanine molecules by electron impact // Technical Physics. 2015. V. 60, № 10. P. 1430–1436.
23. <https://uk.wikipedia.org/wiki/Біоінформатика>
24. Свида Ю.Ю., Суховія М.І., Маргітич М.О., Шафраньош М.І., Шафраньош І.І., Спектр свічення електричного розряду в парах аденіну // Науковий вісник УжНУ. Серія Фізика. №37. – 2015. С. 159 – 163.
25. Bostick D.L., Brooks C.L. "Deprotonation by dehydration: the origin of ammonium sensing in the AmtB channel" // PLoS. Comput. Biol. V. 3, 2007. -P.22.

26. Levitt M. "The birth of computational structural biology" // Nat. Struct. Biol. V.8, 2001.-P. 392–393.
27. О.М. Туровська, М.А. Туровський. Практикум з квантової хімії. Навчально-методичний посібник: ДонНУ, 2007-81с.
28. Шафраньош М.І. Перерізи дисоціативної іонізації в процесах зіткнень електронів з молекулами тиміну та урацилу // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія фізика. 2009. № 25. С. 208–213.
29. Sukhoviya M.I., Shafranyosh M.I., Chavarga M.M., Shafranyosh I.I. Electron impact ionization and excitation of uracil molecules // Ukr. J. Phys. 2012. V. 57, № 7. P. 752–760.
30. В.В. Пантьо, В.І. Ніколайчук, В.І. Пантьо. Вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання на біологічні об'єкти. Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія, Випуск 26, 2009: 99-106.