

## Электрон-фотонная эмиссия азотистого основания нуклеиновых кислот – цитозина в твердой фазе

И.Е. Митропольский, И.И. Шафраньош, В.В. Кузьма, Ю.Ю. Свида, М.И. Суховия

Ужгородский национальный университет, ул. Волошина, 54, 8800 Ужгород, Украина

(Получено 29.03.2017; опубликовано online 27.07.2017)

Впервые методом электрон-фотонной спектроскопии (ЭФС) изучено свечение адсорбированных на поверхности графита молекул азотистого основания нуклеиновых кислот – цитозина – под действием пучка электронов низких энергий. Обнаружено свечение трех молекулярных полос с максимумами при  $\lambda = 331, 427, 495$  нм. Механизмы формирования полос с максимумами при  $\lambda = 331$  нм и  $\lambda = 427$  нм обусловлены возбуждением  $\pi$ -электронов молекулы цитозина из основного состояния  $S_0$  в возбужденные синглетные  $S_n$  и триплетные  $T_n$  состояния с их последующей дезактивацией и радиационным распадом. Обсуждается природа излучения с максимумом при  $\lambda = 495$  нм.

**Ключевые слова:** Электрон-фотонная спектроскопия, Электронный пучок, Поверхность, Цитозин, Графит, Люминесценция.

DOI: [10.21272/jnep.9\(4\).04016](https://doi.org/10.21272/jnep.9(4).04016)

PACS numbers: 78.45.+h, 87.15.mq

### 1. ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на большую сложность макромолекул, в них содержатся отдельные составные элементы (хромофоры), обладающие определенными индивидуальными структурными и спектральными характеристиками [1, 2]. В нуклеиновых кислотах (НК) основными хромофорами являются пиримидиновые и пуриновые азотистые основания. Азотистые основания НК – удобный объект для поиска адекватных моделей, структурно-чувствительного параметра биологических молекул, усовершенствования доступных чувствительных методик. Эксперименты с биологическими объектами имеют особенности при применении традиционных методов исследования, связанные с наличием таутомерных и ионных форм молекул, энергетической близостью электронных переходов. Физические свойства НК, кроме этого, определяют и взаимодействия между близкорасположенными основаниями: продольные и стэкинг-взаимодействия [1]. Эти взаимодействия весьма чувствительны к природе оснований, их взаимному расположению, окружению и агрегатному состоянию. Поэтому исследование люминесценции оснований НК дает ценную информацию о конформационных и структурных изменениях в макромолекулах. Взаимодействия между основаниями значительно изменяются при возбуждении. В частности, могут возникнуть характерные для упорядоченных структур межмолекулярные взаимодействия, связанные с экситонным переносом энергии или образованием комплексов. Данные явления очень важны для понимания механизма процессов, происходящих в НК при радиационном воздействии. Исследование характеристик люминесценции также помогает определить наличие и природу таких взаимодействий.

Для оснований НК выход фотолюминесценции при нормальных условиях очень низкий ( $10^{-4}$ – $10^{-8}$ ) [2-4]. Выраженная люминесценция НК и оснований наблюдается только при экстремальных значениях pH и низких температурах [4, 5]. Для практики более важны лабораторные исследования при физио-

логических условиях и комнатной температуре. Предлагаются различные подходы к решению данной проблемы: маркировка молекул и регистрация измененной свечения маркера [1, 6], взаимодействующего с аналитом, повышение люминесценции молекул, расположенных на поверхности твердого тела, за счет поверхностных эффектов [7, 8]. Плодотворной для исследования процессов возбуждения молекул всех азотистых оснований НК (цитозина, урацила, аденина, тимина, гуанина) оказалась техника оптической спектроскопии с использованием электронных пучков [9, 10]. Уже в одном из первых сообщениях [9] было указано на многообразии процессов при взаимодействии электронов с основаниями НК, и обозначены перспективы изучения ряда структурных и энергетических параметров биомолекул, представляющие фундаментальный интерес как для биофизики (моделирование взаимодействия медленных (вторичных) электронов с молекулами НК в живых клетках), так и физики столкновений. Сложность спектральных исследований молекул НК в газовой фазе под действием медленных электронов определяется выделением полезных сигналов от исследуемых взаимодействий на большом фоне сопутствующих процессов. Внедрение молекул в различные организованные среды [6] позволяет увеличить интенсивность оптического сигнала. В качестве неорганических матриц наиболее часто применяют материалы из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, силикагеля, а также металлы и их оксиды [11, 12].

Задача настоящей работы – исследовать при возбуждении электронами люминесцентные характеристики молекул цитозина, иммобилизированных на поверхности графита. Суть применяемого метода, который называется электрон-фотонная спектроскопия [13], основана на анализе в глубоком вакууме электромагнитного излучения при облучении поверхности твердого тела электронами с энергией до нескольких сотен эВ. В этом случае активируются все возможные механизмы свечения. Метод ЭФС является высокоточным, информативным и чувствительным к свойствам поверхностного слоя, что было

доказано нами при изучении плазмонных возбуждений в тонких пленках и массивных образцах серебра, центров люминесценции щелочно-галогенных кристаллов, излучения многослойных наногетероструктур и др.

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ

В работе использовали препарат цитозина ( $C_4H_5N_3O$ ) фирмы «Reanal» (чистота 99 %). Высадка определенного количества биомолекул цитозина из водного раствора на поверхность графитовых образцов осуществлялась капельным путем с последующей просушкой ( $100^\circ C$  при  $P \leq 10^{-1}$  Па). Такая процедура повторялась несколько раз и позволяла избавиться от кислорода, который является сильным тушителем люминесценции. Графитовые образцы представляли собой плоскопараллельные пластины размером  $10 \times 10 \times 2$  мм, поверхность которых химически очищались непосредственно перед нанесением биомолекул. Выбор графита обусловлен рядом свойств: неполярностью, гидрофобностью, низким давлением насыщенных паров в вакууме даже при повышенной температуре. Немаловажна высокая пористость графита и стойкость к облучению.

Измерение спектров электронно-фотонной эмиссии (ЭФЭ) проводилось на сверхвысоковакуумном электронно-фотонном спектрометре, созданном на базе установки УСУ-4. В рабочей камере устанавливался вакуум  $P \leq 5 \cdot 10^{-7}$  Па. Электронная пушка формировала пучок электронов диаметром 4 мм с равномерной плотностью тока по его поперечному сечению. Для нашей задачи оптимальная энергия электронов составляла  $E = 500-900$  эВ, при плотностях тока на поверхности  $0.05-0.3$  мА/мм<sup>2</sup>. При больших значениях  $E$  происходила зарядка поверхности, которая приводила к нерегулярным всплескам интенсивности свечения, что затрудняло интерпретацию спектров. При выбранных параметрах пучка сводились к минимуму нагрев образца до высокой температуры и испарение материала.

Угол бомбардировки (от нормали к поверхности) составлял  $15^\circ$ . Эмитированное с поверхности излучение с помощью кварцевого конденсора фокусировалось на входную щель монохроматора МДР-2 (область 200-800 нм) и детектировалось ФЭУ-106. Далее сигнал усиливался и регистрировался счетчиком фотоэлектронов и ПК, где экспериментальные данные программно конвертировались в графическое представление. Излучения наблюдалось под углом  $30^\circ$ . Такая геометрия опытов позволила установить, что свечение вызвано возбуждением и последующим излучением биомолекул непосредственно на поверхности матрицы, бомбардированной электронами.

Спектры ЭФЭ приводятся с учетом чувствительности системы регистрации.

## 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И АНАЛИЗ

При энергиях электронов 500-900 эВ в спектрах ЭФЭ молекул цитозина, адсорбированных на графитовую поверхность, в ультрафиолетовой и видимой областях выявлены широкие бесструктурные полосы.

На рис. 1 показаны результаты при бомбардировке электронами с  $E = 560$  и  $700$  эВ (спектры 1 и 2). ЭФЭ поверхности чистого графита представлена спектром 3, из которого видно слабое непрерывное свечение с  $\lambda_{\max} \approx 430-470$  нм, известное как А-свечение [14]. Спектры 1 и 2 приведены в абсолютных единицах и с коррекцией на свечение поверхности матрицы (спектр 3).

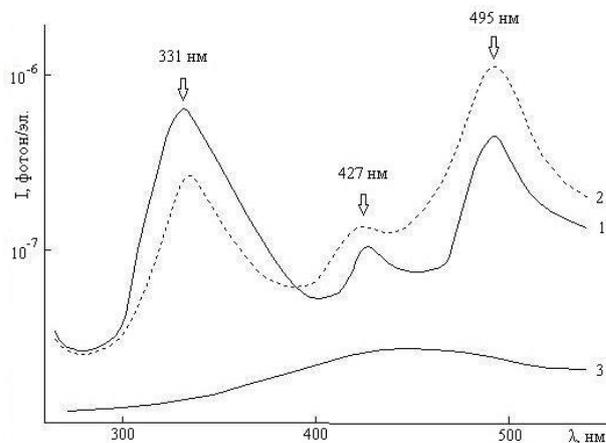
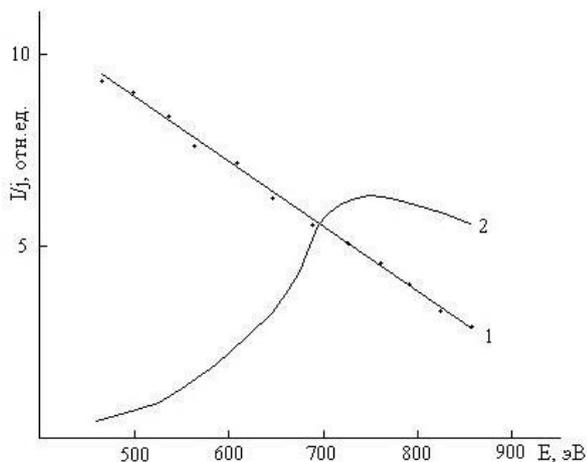


Рис. 1 – Спектры ЭФЭ молекул цитозина (1–  $E = 560$  эВ, 2 –  $E = 700$  эВ) и графита (3)

Спектры ЭФЭ молекул цитозина состоят из трех полос. Максимуму первой соответствует длина волны  $\lambda = 331$  нм, максимуму второй –  $427$  нм и максимуму третьей –  $495$  нм. Изменение геометрии эксперимента позволило установить, что полосы свечения являются результатом возбуждения и последующей излучательной релаксации биомолекул (или их фрагментов), которые находятся непосредственно на бомбардируемой поверхности матрицы. При регистрации излучения вдоль поверхности мишеней (угол наблюдения  $90^\circ$ ) в спектрах ЭФЭ не наблюдалось возбужденных частиц, отлетающих от поверхности мишени. Хотя медленные электроны способны вызывать в адсорбированных макромолекулах различные электронные переходы с высоким сечением возбуждения, однако наши результаты позволяют говорить о малой вероятности электронно-стимулированной десорбции цитозина с поверхности графита. Подтверждением является различие спектрального состава излучения молекул цитозина, локализованных на поверхности твердого тела (рис. 1), и при их возбуждении электронами в газовой фазе [9, 10]. В этих работах в области 200-500 нм регистрировалось до 15 полос, природа которых связывалась с возбуждением отдельных фрагментов молекулы. Вместе с тем, полученные нами спектры в общих чертах (первые два максимума) коррелируют со спектрами фотолюминесценции молекул цитозина [1, 2, 4]. В зависимости от pH окружения, температуры и энергии фотонов максимум флуоресценции проявлялся при  $\lambda = 312-365$  нм, а фосфоресценции при  $400-420$  нм. Большое постоянство структуры спектров ЭФЭ от времени бомбардировки, параметров электронного пучка ( $E, j$ ) указывает на то, что акт излучения системы цитозин-графит ограничен энергетическими пределами отдельной молекулы или иона. Это не значит, что излучатели не испыты-

вает влияния потенциального поля твердой матрицы, но, вероятно, энергетические уровни графита не дают вклад в излучение с максимумами  $\lambda = 331$  и  $427$  нм.



**Рис. 2** – Зависимость интенсивности свечения в максимумах полос системы цитозин-графит от энергии электронов: 1 –  $\lambda = 331$  нм, 2 –  $\lambda = 495$  нм

Представляется, что механизмы появления полос  $\lambda = 331$  и  $427$  нм разные. В частности, под действием электронного пучка происходит возбуждение электронов молекулы цитозина из основного синглетного состояния  $S_0$  в возбужденные состояния  $S_n$ . В дальнейшем происходит дезактивация состояний  $S_n$  к первому синглетному состоянию  $S_1$ , радиационный распад которого и вызывает появление полосы с максимумом  $\lambda = 331$  нм. Ее можно интерпретировать как полосу флуоресценции. Вторая полоса представляет полосу фосфоресценции биомолекул, которая по физическим представлениям сдвинута в длинноволновую область спектра. Для ее появления необходимо возбуждение электронным ударом  $\pi$ - электронов молекулы из состояния  $S_0$  в возбужденные триплетные состояния  $T_n$  с их дезактивацией в состояние  $T_1$  и его радиационным распадом в основное состояние  $S_0$ . Существует еще один канал заселения состояния  $T_1$  - интеркомбинационные переходы  $S_1 \rightarrow T_1$ . Такие переходы в случае оптического возбуждения молекул, в большинстве случаев, становятся основной причиной появления фосфоресценции [1,3-5]. Мы определили абсолютные величины выхода фосфоресценции ( $3.6 \cdot 10^{-8}$ - $2.3 \cdot 10^{-7}$  фот./эл.) и флуоресценции ( $8.1 \cdot 10^{-7}$ - $4.4 \cdot 10^{-6}$  фот./эл.) при электронном возбуждении этих процессов, которые оказались сопоставимы, в отличие от экспериментов по фотолюминесценции цитозина в жидких средах. Следовательно, иммобилизация молекул цитозина на поверхности графита уменьшает безызлучательную дезактивацию триплетных молекул. Именно в жесткой среде вследствие ограниченности движения молекул многие биосистемы способны проявлять эффективную фосфоресценцию.

Особого внимания заслуживает полоса с максимумом при 495 нм. Исходя из существующих спектроскопических данных, идентифицировать ее сложно. Сравнение спектров 1 и 2 показывает, что соотношение максимумов полос зависит от энергии

возбуждающих электронов. Перераспределение интенсивностей между полосами свидетельствует о влиянии способа подвода энергии на вероятности тех или иных излучающих переходов. Установлено, что интенсивность полосы с максимумом при 495 нм с увеличением энергии электронов возрастает (кривая 2, рис. 2), в то время как интенсивность полосы флуоресценции падает (кривая 1, рис. 2). Ход зависимости  $I(E)$  не противоречит данной выше интерпретации полосы  $\lambda = 331$  нм. При увеличении энергии электронов увеличивается как заселенность  $S_1$  и  $T_1$ -уровней молекулы, так и скорость их опустошения в результате переходов вверх. Однако, основная причина тушения собственной флуоресценции – взаимодействие молекул цитозина с другими молекулами, в том числе и подложки. Происходящие при этом вынужденные колебания являются первым этапом образования комплексов и изменения таутомерного состояния входящих в них компонентов. В возбужденном состоянии (в режиме непрерывной бомбардировки электронным пучком генерируются все возможные переходы) возрастает способность молекул как к ассоциации, так и распаду на фрагменты. Логично, что статическое и динамическое взаимодействие молекул может приводить к образованию комплексов, обладающих свечением, но в иной области спектра по сравнению с неассоциированными молекулами. Поэтому иницирующее действие электронного пучка способствует преобразованию определенной доли молекул в активные центры, способные присоединять к себе другие молекулы или их составляющие. При определенных условиях эксперимента ( $E = 860$  эВ и  $j > 0.27$  мА/мм<sup>2</sup>) в спектрах ЭФЭ длинноволновый максимум становится доминирующим, а собственная флуоресценция цитозина ( $\lambda = 331$  нм) подавляется. При этом с увеличением  $E$  первичных электронов все характеристики флуоресценции (форма спектра, положение максимума), кроме квантового выхода, не изменяются, т.е. не происходит сокращения времени жизни возбужденного состояния, а уменьшается лишь доля возбужденных молекул, способных флуоресцировать. Теоретически процессы, происходящие при электронной бомбардировке, могут приводить к образованию эксимеров, в частности димеров оснований НК [1, 15, 16]. Такие комплексы неустойчивы и распадаются с испусканием кванта света. Интенсивность их люминесценции должна быть меньше, чем сравнительно стабильных мономерных молекул. Хотя косвенным путем димеризация цитозина была обнаружена при УФ – облучении молекул цитозина, цитидил-цитидина, полиуридилцитидиловой кислоты в ДНК [1, 17, 18], но достоверная спектроскопическая информация относительно люминесценции димеров цитозина отсутствует.

Есть основания предполагать, что появление полосы с максимумом 495 нм связано с влиянием адсорбированных молекул цитозина на спектр ЭФЭ графита. На это указывают спектральные особенности графита и углеродосодержащих соединений. В [19] наблюдался сдвиг максимума фотолюминесценции графитовых соединений при нанесении на поверхность биомолекул. Пик около 2,5 эВ присутству-

ет в спектрах катодолуминесценции графитовых пленок [20] и карбонат-синтетического алмаза [21]. Природа этого свечения связана с дефектом НЗ [14], который образовывается двумя замещающими атомами азота, разделенными вакансией. Вероятно, что в нашем случае поставщиком азота выступают молекулы цитозина. Электронная бомбардировка стимулирует процесс встраивания азота в виде одиночных замещающих атомов.

#### 4. ВЫВОДЫ

Впервые методом ЭФС исследованы люминесцентные свойства одного из азотистых оснований НК – цитозина, адсорбированного на поверхности графита. В спектральном диапазоне 200-800 нм обнаружены три широкие молекулярные полосы с максимумами при  $\lambda = 331, 427, 495$  нм. Оценены значения абсолютного выхода фотонов в максимумах этих спектральных полос. Механизмы формирования

ЭФЭ первых двух полос те же, что и при облучении молекул цитозина фотонами. Они обусловлены возбуждением  $\pi$ -электронов биомолекулы с основного синглетного состояния  $S_0$  в возбужденные синглетные  $S_n$  и триплетные состояния  $T_n$ , с их дезактивацией в состояния  $S_1$  и  $T_1$ . Наблюдаемый высокий выход фосфоресценции ( $\lambda = 427$  нм) свидетельствует об иммобилизации молекул цитозина на поверхности графита. Выяснение природы полосы с максимумом при  $\lambda = 495$  нм остается на уровне обсуждения. Предполагается, что для системы цитозин-графит при электронном облучении происходит эволюция азотных дефектов матрицы. С другой стороны адсорбция биомолекул на поверхности твердого тела может защитить их от деградации в окружающей среде. Полученные результаты свидетельствуют о хороших возможностях электрон-фотонной спектроскопии для исследования свойств биологических молекул.

### The Electron-photon Emission of the Nitrogenous Basis of Nucleic Acids - a Cytosine in a Solid Phase

I.E. Mitropolskiy, I.I. Shafranyosh, V.V. Kuzma, Yu.Yu. Svyda, M.I. Sukhoviya

*Uzhhorod National University, 54, Voloshin Str., 88000 Uzhhorod, Ukraine*

For the first time the method of an electron - photon spectroscopy (EPhS) has studied a luminescence of the molecules of the nitrogenous basis of nucleic acids adsorbed on the surface of graphite – a cytosine – under the influence of a bunch of electrons of low energies. The luminescence of three molecular strips with maxima at  $\lambda = 331, 427, 495$  nm is revealed. The mechanism of formation of strips with maxima at  $\lambda = 331$  nm and  $\lambda = 427$  nm caused by excitation of  $\pi$ -electrons of a molecule of a cytosine from the main condition of  $S_0$  in the excited singlet  $S_n$  and triplet  $T_n$  state with their subsequent deactivation and radiation collapse. The radiation nature is discussed with a maximum at  $\lambda = 495$  nm.

**Keywords:** Electron-photon spectroscopy, Electron beam, Surface, Cytosine, Graphite, Luminescence.

### Електрон-фотонна емісія азотистої основи нуклеїнових кислот – цитозина в твердій фазі

І.Є. Митропольський, І.І. Шафраньош, В.В. Кузьма, Ю.Ю. Свида, М.І. Суховія

*ДВНЗ Ужгородський національний університет, вул. Волошина, 54, 88000 Ужгород, Україна*

Вперше методом електрон-фотонної спектроскопії (ЕФС) вивчено свічення адсорбованих на поверхні графіту молекул азотистої основи нуклеїнових кислот – цитозина – під дією пучка електронів низьких енергій. Виявлено свічення трьох молекулярних смуг з максимумами при  $\lambda = 331, 427, 495$  нм. Механізми формування смуг з максимумами при  $\lambda = 331$  нм та  $\lambda = 427$  нм зумовлені збудженням  $\pi$ -електронів молекули цитозина з основного стану  $S_0$  у збуджені синглетні  $S_n$  та триплетні  $T_n$  стани з їх подальшою дезактивацією та радіаційним розпадом. Обговорюється природа випромінювання з максимумом при  $\lambda = 495$  нм.

**Ключові слова:** Електрон-фотонна спектроскопія, Електронний пучок, Поверхня, Цитозин, Графіт, Люмінесценція.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. R. Lacowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (NY: Springer Science: 2006).
2. М.Ф. Умаров, В.С. Горелик, *Оптическая спектроскопия биоактивных препаратов* (Вологда: ВоГУ: 2014) (M.F. Umarov, V.S. Gorelik, *Opticheskaya spektroskopiya bioaktivnykh preparatov* (Vologda: VoGU: 2014) [In Russian]).
3. C.E. Crespo-Hernández, B. Cohen, P. M. Hare, B. Kohler, *Chem. Rev.* **104**, 1977 (2004).
4. N.Ya. Dodonova, *J. Photoch. Photobio. B* **18**, 111 (1993).
5. V.M. Yashchuk, V.Yu. Kudrya, M.Yu. Losytskyu, H. Suga, T.Y. Ohulchanskyu, *J. Mol. Liq.* **127** Issue 1-3, 79 (2006).
6. M.J. Lin, Á.J. Jiménez, C. Burschka, F. Würthner, *Chem. Commun.* **48** No 99, 12050 (2012).
7. A. A. Voityuk, K. Siritwong, N. Rosch, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **3**, 5421 (2001).
8. L. Dolgov, D. Pidhirnyi, G. Dovbeshko, T. Lebedieva, V. Kisk, S. Heinsalu, S. Lange, R. Jaanisalo, I. Sildos, *Nanoscale*

- Res Lett.* **11** No 1, 197 (2016).
9. М.И. Суховия, В.Н. Славик, И.И. Шафраньощ, Л.Л. Шимон, *Биополимеры и клетка* **7** №6, 77 (1991) (M.I. Sukhoviya, V.N. Slavik, I.I. Shafran'osh, L.L. Shimon, *Biopolimery i kletka* **7** No 6, 77 (1991)).
  10. I.I. Shafranyosh, M.I. Sukhoviya, *J. Chem. Phys.* **137** No 18, 184303 (2012).
  11. C.C. Barrias, M.C.L. Martins, M.C.S. Miranda, M.A. Barbosa, *Biomaterials* **26**, 2695 (2005).
  12. F. Scappini, F. Casadei, R. Zamboni, M. Franchi, E. Gallori, S. Monti, *Int. J. Astrobiol.* **3**, 17 (2004).
  13. С.С. Поп, І.С. Шароді, *Фізична електроніка* (Львів: Євровіт: 2001) (S.S. Pop, I.S. Sharodi, *Fizychna elektronika* (Lviv: Yevrosvit: 2001)) [In Ukrainian].
  14. Г.Б. Бокій, Г.Н. Безруков, Ю.А. Клюев, А.М. Налетов, В.И. Непша, *Природные и синтетические алмазы* (Москва: Наука: 1986) (G.B. Bokiuy, G.N. Bezrukov, Yu.A. Klyuyev, A.M. Naletov, V.I. Nepsha, *Prirodnyye i sinteticheskiye almazy* (Moskva: Nauka: 1986)) [In Russian].
  15. D.J. Frankel, Q. Chen, N.V. Richardson, *J. Chem. Phys.* **124**, 204704 (2006).
  16. A. Manukyan, A. Tekin, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 14685 (2015).
  17. Bo Yang, R.R. Wu, G. Berden, J. Oomens, M.T. Roders, *J. Phys. Chem.* **117**, 14191 (2013).
  18. E.F. Strittmatter, P.D. Schnier, J.S. Klassen, E.R. Williams, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **10**, 1095 (1999).
  19. E. Perevedentseva, N. Melnik, С.-Y. Tsai, Y.-C. Lin, M. Kazaryan, C.-L. Cheng, *J. Appl. Phys.* **109**, 034704 (2011).
  20. С.К. Брантов, А.Н. Терещенко, Э.А. Штейнман, Е.Б. Якимов, *Журнал технической физики* **86** Вып. 3, 110 (2016) (S.K. Brantov, A.N. Tereshchenko, E.A. Shteynman, Ye.B. Yakimov, *Zhurnal tekhnicheskoy fiziki* **86** Вып. 3, 110 (2016)) [In Russian].
  21. Н.А. Солопова, А.В. Спивак, Ю.А. Литвин, А.А. Ширяев, В.А. Цельмович, А.Н. Некрасов, *ФТТ* **55** No 2, 332 (2013) (N.A. Solopova, A.V. Spivak, Yu.A. Litvin, A.A. Shiryayev, V.A. Tsel'movich, A.N. Nekrasov, *Phys. Solid State* **55** No 2, 373 (2013)).