

**ODDZIAŁYWANIE ELEKTRONÓW  
Z CZĄSTECZKAMI O BIOLOGICZNYM ZNACZENIU**  
INTERACTION OF ELECTRONS WITH BIOLOGICALLY  
RELEVANT MOLECULES

**Janina Kopyra\***

*Wydział Nauk Ścisłych, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach,  
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce  
\*e-mail: kopyra@uph.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głąba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Wychwyty elektronów przez komponenty DNA/RNA
  - 1.1. Wychwyty elektronów przez zasady azotowe
    - 1.1.1. Przekrój czynny na wychwyty elektronów przez tyminę
  - 1.2. Wychwyty elektronów przez rybozę i tetra-acetyloribozę
  - 1.3. Dysocjacyjny wychwyty elektronów przez resztę fosforanową: ester dibutyłowy oraz ester trietyłowy kwasu fosforowego
  - 1.4. Dysocjacyjny wychwyty elektronów przez większe fragmenty DNA
    - 1.4.1. Wychwyty elektronów przez tymidynę
    - 1.4.2. Wychwyty elektronów przez fosforan-5'-rybozę
    - 1.4.3. Wychwyty elektronów przez nukleotyd dCMP
  - 1.5. Sensybilizatory DNA

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr hab. Janina Kopyra** ukończyła studia na Wydziale Matematyczno-Chemicznym Wyższej Szkoły Rolniczo-Pedagogicznej w Siedlcach (później Akademia Podlaska, obecnie Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach). Stopień doktora uzyskała w 2003 roku na Wydziale Nauk Ścisłych Akademii Podlaskiej w Siedlcach. W 2014 roku uzyskała stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. Dr hab. J. Kopyra prof. nadzw. UPH jest wieloletnim pracownikiem Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach. Dr hab. J. Kopyra ściśle współpracuje z licznymi ośrodkami naukowymi w kraju i za granicą. Wynikiem tej współpracy jest szereg odbytych staży oraz wykładów wygłoszonych w renomowanych ośrodkach zagranicznych (m.in.: Freie Universität Berlin, Bremen University, Universidade Nova de Lisboa, The Open University w Milton Keynes, Center of Research on Ions Materials and Photonics w GANIL). Autorka licznych prac naukowych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Obecnie dr hab. J. Kopyra zajmuje się badaniami oddziaływania niskoenergetycznych elektronów z cząsteczkami w fazie gazowej. Badania te obejmują identyfikację produktów tego oddziaływania oraz energetykę konkurencyjnych kanałów reakcji. Ostatnie prace dr hab. J. Kopyry związane są z próbą wyjaśnienia mechanizmu uszkodzeń wywołanych przez niskoenergetyczne elektrony w komponentach DNA/RNA.

---

**ABSTRACT**

Recent years have witnessed an increase of the interest in the studies of the interaction of electrons with biologically relevant molecules. This has been mainly motivated by the seminal work, where it has been demonstrated that low energy electrons can induce single and double strand breaks in DNA in the energy range below the level of ionization. Since the damage profile as a function of electron energy showed pronounced resonances it was proposed that resonant electron capture could occur at particular molecular components of the DNA as the initial step towards strand breaks. From a series of experiments on electron attachment to DNA building blocks (nucleobases, the sugar moiety and the phosphate unit) became obvious that they effectively capture electrons leading to the formation of low energy resonances associated with the decomposition of the corresponding molecule. Recent dissociative electron attachment experiments on an entire gas phase nucleotide 2'-deoxycytidine-5'-monophosphate give also insight into the molecular mechanism involved, which comprises both direct electron attachment to the backbone and transfer of the excess electron from cytosine to the backbone resulting in single strand breaks. The results further allow an estimate of the relative contribution of these different mechanisms to single strand breaks.

Keywords: dissociative electron attachment, mass spectrometry, negative ions, biologically relevant molecules

Słowa kluczowe: dysocjacyjny wychwyt elektronów, spektrometria mas, jony ujemne, cząsteczki o biologicznym znaczeniu

---

---

## WPROWADZENIE

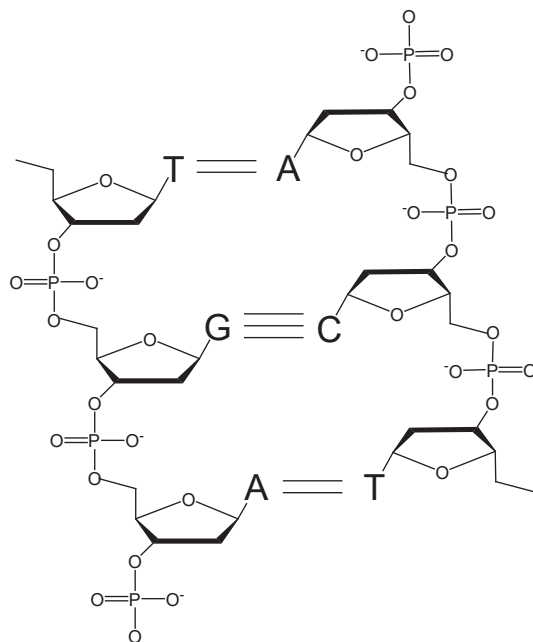
Poznanie i opis efektów fizyko-chemicznych wywołanych działaniem wysokoenergetycznego promieniowania na materię w dalszym ciągu stanowi ważny problem aktualnych badań. W obecnej dobie promieniowanie to ma niezwykle szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach życia począwszy od przemysłu, w takich chociażby obszarach jak sterylizacja radiacyjna, modyfikacja właściwości tworzyw, inicjowanie procesów polimeryzacji, radiacyjnie indukowana synteza chemiczna, litografia aż do zastosowań medycznych w badaniach diagnostycznych, czy terapii antynowotworowej. Procesy radiacyjne są konsekwencją absorpcji energii wysokoenergetycznego promieniowania przez materię. Mechanizm tego procesu zależy od natury promieniowania. W przypadku promieniowania elektromagnetycznego energia fotonów przekazywana jest atomom i/lub cząsteczkom ośrodka w trojaki sposób: za pomocą efektu fotoelektrycznego, zjawiska Comptona oraz zjawiska kreacji par elektron-pozyton. W przypadku promieniowania korpuskularnego przekazanie energii następuje głównie na drodze zderzeń elastycznych i nieelastycznych.

Ogólnym efektem obu rodzajów promieniowania jest jonizacja i wzbudzenie cząsteczek, stąd też efekty chemiczne przez nie wywołwane pod względem jakościowym są podobne. W wyniku przekazania energii wzdłuż toru cząstki powstają jony, cząsteczki wzbudzone oraz rodniki. Powszechnie przyjmuje się, że to powstałe wtórne produkty (elektrony, jony, rodniki) są odpowiedzialne za późniejsze reakcje chemiczne. Wśród tych produktów elektrony produkowane są z niezwykle dużą wydajnością, około  $5 \times 10^4/1$  MeV z początkową energią w zakresie do kilkudziesięciu eV [1]. W wyniku zderzeń nieelastycznych z medium elektrony te ulegają termalizacji. W trakcie termalizacji w dalszym ciągu mogą powodować jonizację i wzbudzenie cząsteczek, a w skali czasowej rzędu pikosekund, osiągając energie poniżej progu jonizacji, mogą przyłączać się do cząsteczek.

Promieniowanie jonizujące jest jednym z czynników powodujących uszkodzenia DNA. Uszkodzenia DNA mogą być również wywoływane przez wtórne elektrony. Rola niskoenergetycznych elektronów stała się oczywista po publikacji przełomowych wyników eksperymentu, w ramach którego plazmidowy DNA bombardowano elektronami o ściśle określonej energii (poniżej progu jonizacji makromolekuły ( $<10$  eV)) w wyniku czego obserwowano powstawanie zarówno pojedynczoniciowych (ang. *single strand breaks*, SSBs), jak i podwójnociowych (ang. *double strand breaks*, DSBs) pęknięć szkieletu DNA [2]. Wykazano ponadto, że SSBs mogą powstawać przy energiach poniżej progu wzbudzenia elektronowego  $<3$  eV z wydajnością o rząd wielkości wyższą od tej obserwowanej w obszarze energii 5–15 eV [3]. Ponieważ wydajność pęknięć miała charakter pików w funkcji energii elektronów sugerowano, że rezonansowy dysocjacyjny wychwyty elektronów (ang. *dissociative electron attachment*, DEA) w określonych miejscach/komponentach DNA może stanowić pierwszy etap procesu prowadzącego do pęknięcia nici. Obserwacje te zainicjowały szereg badań obejmujących oddziaływanie niskoenergetycznych elektronów z cząsteczkami budującymi DNA [4]. Do tej pory uważano

bowiem, że tylko elektrony o energiach powyżej progu jonizacji mogą przyczynić się do uszkodzeń DNA.

DNA, najbardziej istotny składnik jąder komórkowych, jest biopolimerem składającym się z dwóch łańcuchów, które ułożone są antyrównolegle (tzn. koniec 3' jednej nici leży naprzeciw końca 5' drugiej nici) (Rys. 1). Podstawową jednostką budującą DNA jest nukleotyd, który zbudowany jest z pięciowęglowego cukru deoksyrybozy połączonego wiązaniem estrowym z resztą fosforanową i jedną z czterech zasad nukleinowych (z grupy puryn: adenina (A) i guanina (G) lub z grupy pirymidyn: cytozyna (C) i tymina (T)) za pomocą wiązania  $\beta$ -N-glikozydowego. Oba łańcuchy połączone są za pomocą wiązań wodorowych występujących pomiędzy komplementarnymi parami zasad (A–T, C–G) (Rys. 1). DNA otoczone jest przez białka i osadzone w wodzie, która jest najbardziej obfitym składnikiem komórki.



Rysunek 1. Schemat struktury dwuniciowego DNA

Figure 1. Schematic structure of DNA

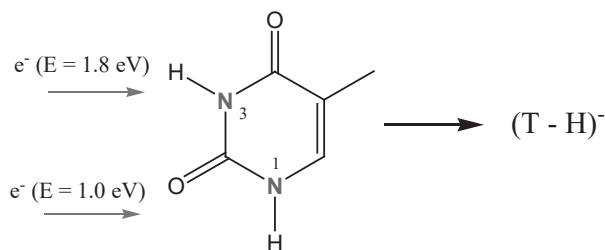
Niniejsza praca poświęcona jest zagadnieniom oddziaływania niskoenergetycznych elektronów (ang. *low energy electrons*, LEEs) z cząsteczkami o biologicznym znaczeniu, komponentami DNA. Pokazuje, że procesy DEA inicjowane przez elektrony w zasadzie pozbawione energii ( $\approx 0$  eV) mogą prowadzić do rozerwania wiązań chemicznych z zaskakująco wysoką efektywnością.

## 1. WYCHWYT ELEKTRONÓW PRZEZ KOMPONENTY DNA/RNA

Badania mechanizmów prowadzących do uszkodzeń DNA w wyniku przyłączenia elektronów wymagają przeprowadzenia eksperymentów dla pojedynczych komponentów makromolekuły i konsekwentnego przejścia do bardziej złożonych układów. Istotnym problemem jest znalezienie odpowiedzi na pytanie, które właściwości charakterystyczne dla pojedynczych cząsteczek zachowane są w przypadku bardziej złożonych układów związanych kowalencyjnie. W związku z tym, w ramach niniejszej pracy prezentowane są wyniki badań uzyskane dla pojedynczych cząsteczek budujących DNA/RNA, tj. zasady azotowe, grupa cukrowa i fosforanowa lub ich analogi. W dalszym etapie przedstawione są wyniki badań uzyskane dla nukleozydu (tymidyny), fosforanu-5'-rybozy oraz nukleotydu 2'-deoksycytydino-5'-monofosforanu (dCMP).

### 1.1. WYCHWYT ELEKTRONÓW PRZEZ ZASADY AZOTOWE

Pierwsze badania oddziaływania niskoenergetycznych elektronów z komponentami DNA dotyczyły zasad azotowych [5–7]. Jak wykazano, w obszarze energii  $<3$  eV najbardziej wydajnym jonem fragmentarycznym jest jon powstający w wyniku utraty atomu wodoru  $(M - H)^{\cdot -}$  ( $M$  = cząsteczka zasady azotowej). Stwierdzono ponadto, na podstawie eksperymentów przeprowadzonych dla tyminy i uracylu, że w zakresie energii poniżej progu wzbudzenia elektronowego cząsteczki wychwyt elektronów jest procesem selektywnym, nie tylko ze względu na rodzaj pękającego wiązania ale również pozycję tegoż wiązania (Rys. 2) [8, 9].



Rysunek 2. Dysocjacja tyminy w wyniku rezonansowego dysocjacyjnego wychwytu elektronu. Elektron o energii  $E = 1,0$  eV powoduje rozerwanie wiązania N1–H, natomiast elektron o energii 1,8 eV indukuje pęknięcie wiązania N3–H. Rysunek wykonany w oparciu o wyniki Ptaśińskiej *i in.* [9]

Figure 2. Dissociation of thymine induced by electron attachment. Electrons at 1,0 eV induce N1–H bond rupture, while electrons at 1,8 eV cause N3–H bond cleavages. Figure prepared based on the results of Ptaśińska et al. [9]

Z badań przeprowadzonych dla deuterowanej tyminy przy atomach węgla wynika, że utrata obojętnego atomu H następuje wyłącznie poprzez rozerwanie wiązania N–H [8]. Kolejne badania przeprowadzone dla N1-metylowanej tyminy

oraz N3-metylowanego uracylu pozwoliły stwierdzić, że utrata wodoru jest również selektywna ze względu na pozycję pękającego wiązania. Okazało się, że elektrony o energii 1,0 eV powodują rozerwanie wiązania N1–H, natomiast elektrony o energii 1,8 eV indukują pęknięcie wiązania N3–H (Rys. 2) [9].

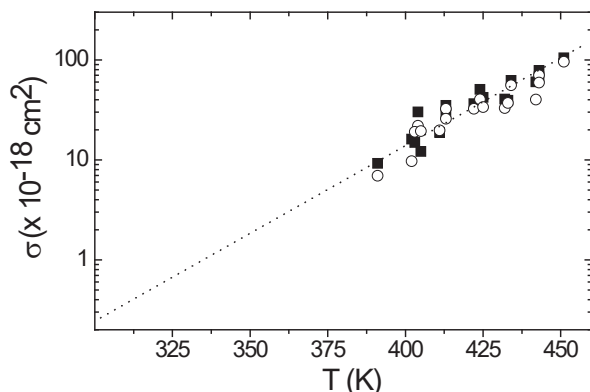
### 1.1.1. Przekrój czynny na wychwyt elektronów przez tyminę

Zasadnicze znaczenie dla zrozumienia i modelowania uszkodzeń wywołanych promieniowaniem ma znajomość bezwzględnych wartości przekrojów czynnych na wychwyt elektronów, określających prawdopodobieństwo zajścia procesu. Zgodnie z zaproponowanym, na podstawie obliczeń teoretycznych, mechanizmem transferu elektronu prowadzącym do powstania uszkodzeń pojedynczoniciowych, zasady azotowe miały pełnić szczególną rolę w początkowym etapie wychwytu elektronu [10, 11]. Dla układu modelowego, nukleotydu 2'-deoksycytidyno-5'-monofosforanu (dCMP), stwierdzono iż nadmiarowy elektron wstępnie lokalizowany jest na zasadzie azotowej, która pełni rolę „anteny”. Prowadzi to do utworzenia krótko-żyjącego stanu rezonansowego. W kolejnym etapie elektron migruje poprzez grupę cukrową do reszty fosforanowej, czemu towarzyszy rozerwanie wiązania estrowego.

Uzyskanie bezwzględnych wartości przekrojów czynnych w eksperymentach *beam* (metoda skrzyżowanych wiązek elektron-cząsteczka) w sposób bezpośredni nie jest łatwe. Wymaga znajomości gęstości gazu, gęstości elektronów w wiązce oraz prawdopodobieństwa detekcji dla powstających jonów fragmentarycznych. Szeroko stosowanym podejściem jest wyznaczenie względnych wartości przekrojów poprzez porównanie wyników uzyskanych dla badanego związku z wynikami uzyskanymi dla związku referencyjnego.

Pomimo dużego zainteresowania badaniami wychwytu elektronów przez zasady azotowe, znanych jest tylko kilka prac dotyczących pomiaru przekroju czynnego na wychwyt elektronów. Dwa niezależne eksperymenty przeprowadzone metodą *beam* dla tyminy podają wartości przekroju w zakresie  $10^{-15}$  cm<sup>2</sup> [8, 12] dla głównego piku (T - H)<sup>-</sup> (T = tymina) z maksimum wydajności przy 1 eV. Są to wartości względne, otrzymane poprzez porównanie z wartościami przekroju czynnego dla związków referencyjnych SF<sub>6</sub> i CCl<sub>4</sub>. Jednocześnie w ramach eksperymentu elektronowej spektroskopii transmisyjnej (ang. electron transmission spectroscopy, ETS) uzyskano wartość  $4,7 \times 10^{-19}$  cm<sup>2</sup> [13]. Sugerowano, że duża rozbieżność pomiędzy wynikami otrzymanymi obiema metodami (*beam* i ETS) wynika przede wszystkim z kondensacji odparowywanej próbki tyminy. Późniejsze wyniki uzyskane zostały z wykorzystaniem zmodyfikowanej aparatury *beam* (przy ograniczonej możliwości kondensacji próbki). Jako związek referencyjny wykorzystano CHCl<sub>3</sub> (drugi rezonans Cl<sup>-</sup> dla którego przekrój czynny wynosi  $5,68 \times 10^{-16}$  cm<sup>2</sup> przy 0,3 eV [14]). W tym przypadku otrzymana wartość przekroju czynnego dla (T - H)<sup>-</sup> przy 1 eV wynosi  $7,9 \pm 4 \times 10^{-17}$  cm<sup>2</sup> [15].

Należy jednak zauważyć, że wszystkie powyższe wartości przekrojów czynnych uzyskane zostały w podwyższonych temperaturach ( $> 423$  K). Jak wiadomo, wartości przekrojów procesu DEA mogą drastycznie zmieniać się z temperaturą [16, 17], w związku z tym nie mogą być bezpośrednio wykorzystane do modelowania uszkodzeń materiału biologicznego w realnych warunkach. Zatem w dalszym ciągu istniała potrzeba określenia wartości przekroju w warunkach odpowiadających biologicznym. Ostatnia praca Kopyry i Abdoula-Carima [18] poświęcona została określeniu wpływu temperatury na wartość przekroju czynnego na wychwyty dysocjacyjny przez tyminę. Jak zostało pokazane, bezwzględne wartości przekrojów dla pików przy energii elektronów 1,0 i 1,74 eV (wyznaczone w sposób absolutny z uwzględnieniem gęstości gazu, gęstości elektronów w wiązce oraz prawdopodobieństwa detekcji dla powstających jonów fragmentarycznych) zmieniają się o rząd wielkości w przedziale temperatur 393–443 K (Rys. 3). Na podstawie ekstrapolacji wyników badań do temperatury 313 K wyznaczone zostały wartości przekrojów wynoszące  $\sigma(T - H)^{\cdot -}$  (1 eV, 313 K) =  $6 \times 10^{-19}$  cm<sup>2</sup> i  $\sigma(T - H)^{\cdot -}$  (1,74 eV, 313 K) =  $4 \times 10^{-19}$  cm<sup>2</sup> [18].



Rysunek 3. Zależność przekroju czynnego na wychwyty elektronu przez tyminę prowadzący do utworzenia jonu  $(T - H)^{\cdot -}$  w funkcji temperatury (■ – energia elektronów 1,0 eV, ○ – energia elektronów 1,74 eV). Rysunek wykonany w oparciu o wyniki Kopyry i Abdoula-Carima [18]

Figure 3. Absolute cross section for the electron attachment to thymine resulting in the formation of  $(T - H)^{\cdot -}$  as a function of temperature (■ – electron energy of 1,0 eV, ○ – electron energy of 1,74 eV). Figure prepared based on the results of Kopyra and Abdoul-Carime [18]

## 1.2. WYCHWYT ELEKTRONÓW PRZEZ RYBOZĘ I TETRA-ACETYLORYBOZĘ

Grupa cukrowa jest centralną częścią nukleotydu, która wiąże dwie sąsiednie reszty fosforanowe poprzez wiązania estrowe C'5-O-P i C'3-O-P. Ponadto łączy się z jedną z czterech zasad azotowych. Uwzględnienie efektów indukowanych przez niskoenergetyczne elektrony w grupie cukrowej, w przypadku modelowania uszkodzeń DNA wydaje się zatem jak najbardziej uzasadnione.



Pierwsze prace eksperymentalne poświęcone były oddziaływaniu niskoenergetycznych elektronów z izolowanymi cząsteczkami cukru tj. deoksyryboza [19], ryboza [20, 21] oraz fruktoza [22]. Jak wynika z doniesień literaturowych, wszystkie te związki wykazują zbliżoną fragmentację. Dotyczy to między innymi utraty jednej lub dwóch cząsteczek wody z przejściowego jonu ujemnego (ang. *transient negative ion*, TNI) co prowadzi do powstania jonów  $(M - nH_2O)^-$  ( $n = 1, 2$ ). Należy dodać, że procesy te przebiegają ze znaczącą wydajnością, co świadczy o szczególnej wrażliwości grupy cukrowej względem niskoenergetycznych elektronów.

Bardzo intensywne badania dysocjacyjnego wychwytu elektronu przeprowadzono dla rybozy ( $C_5H_{10}O_5$ ) i jej trzech izotopomerów: rybozy znaczonej węglem  $^{13}C$  w pozycji C1 (1- $^{13}C$ -ryboza), rybozy znaczonej węglem  $^{13}C$  w pozycji C5 (5- $^{13}C$ -ryboza) oraz rybozy podstawionej deuterem w pozycji C1 (C,1-D-ryboza). Na ich podstawie stwierdzono, że elektronowo indukowana dysocjacja polegająca na odszczepieniu fragmentów obojętnych zawierających atomy węgla przebiega z dużą selektywnością. Reakcja ta przebiega prawie wyłącznie poprzez oderwanie jednostek zawierających atom węgla w pozycji C5.

Selektywna dekompozycja pierścienia cukrowego w przypadku rybozy związana jest głównie z utworzeniem następujących jonów fragmentarycznych  $m/z$  101 ( $C_4H_5O_3^-$ ),  $m/z$  72 ( $C_3H_4O_2^-$ ),  $m/z$  59 ( $C_2H_3O_2^-$ ) oraz  $m/z$  45 ( $HCOO^-$ ) [20]. Jak wspomniano wcześniej jednoznaczne przypisanie struktur powyższym fragmentom zostało osiągnięte przy użyciu izotopowo znaczonych cząsteczek. Przykładowe fragmenty rejestrowane przy  $m/z$  101 i 102 w przypadku rybozy oraz rybozy znaczonej węglem  $^{13}C$  w pozycji C5 (5- $^{13}C$ -ryboza), w przypadku kolejnych dwóch izotopomerów rejestrowane były przy  $m/z$  102 i  $m/z$  103. Świadczy to o tym, że reakcja przebiega poprzez oderwanie fragmentów zawierających atom węgla C5, podczas gdy atomy  $^{13}C$  i D w pozycji C1 pozostają w strukturze jonu. Analogiczną sytuację obserwowano przy niższych masach, przy czym proces fragmentacji przebiegał z niższą selektywnością. W oparciu o uzyskane wyniki zaproponowano schemat reakcji dekompozycji TNI powstającego w procesie wychwytu niskoenergetycznych elektronów przez rybozę [20].

Podsumowując, dekompozycja rybozy przebiega w sposób selektywny i związana jest z utratą jednostek zawierających atom węgla C5. Jednakże ryboza w fazie gazowej występuje w formie pyranozowej, dlatego też niezbędne było przeprowadzenie dalszych badań dla grupy cukrowej występującej w formie furanozowej. Analogiem grupy cukrowej w DNA/RNA charakteryzującym się pięcioczłonowym układem pierścieniowy jest 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- $\beta$ -D-rybofuranozy (tetra-acetyloriboza, TAR). Dodatkowo związek ten pozbawiony jest grup hydroksylowych, które zgodnie z wynikami badań elektronowej spektroskopii transmisyjnej mogą wpływać na wartość przekroju czynnego na wychwyt elektronu [23].

Wychwyt elektronów przez tetra-acetyloribozę przebiega w trzech obszarach energetycznych: przy energii bliskiej 0 eV, w obszarze energii 1–3 eV oraz przy wyższych energiach 7–10 eV [24]. Struktury rezonansowe powstają w wyniku lokaliza-

cji elektronu na pierścieniu grupy cukrowej lub na orbitalu  $\pi^*$  egzo-cyklicznej grupy karboksylowej. Należy tutaj podkreślić, że zarówno kształt jak i pozycje rezonansów przypominają te, które obserwowano w przypadku rybozy.

Wyniki uzyskane dla rybozy i tetra-acetyloribozy świadczą o tym, że reakcje inicjowane przez niskoenergetyczne elektrony w grupie cukrowej mogą odgrywać znaczącą rolę w procesie prowadzącym do powstania SSBs. W szczególności fragmenty, które są obserwowane w obszarze energii około 0 eV mogą być związane z degradacją pierścienia cukrowego. Natomiast rozrywanie wiązania C–O obserwowane w przypadku tetra-acetyloribozy, w wyniku czego powstaje jon  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  (m/z 59), świadczy o możliwości pęknięcia wiązania estrowego i/lub N-glikozydowego w DNA, co z kolei prowadzi do pęknięcia nici lub utraty zasady.

### 1.3. DYSOCJACYJNY WYCHWYT ELEKTRONÓW PRZEZ RESZTĘ FOSFORANOWĄ: ESTER DIBUTYLOWY ORAZ ESTER TRIETYLOWY KWASU FOSFOROWEGO

Badania wychwytu niskoenergetycznych elektronów przez pochodne kwasu fosforowego przeprowadzone w fazie gazowej dotyczyły estru dibutyłowego kwasu fosforowego (ang. dibutylphosphate, DBP) oraz estru trietyłowego kwasu fosforowego (ang. triethylphosphate, TEP). Oba te związki wychwytyją elektrony w zakresie energii 0–10 eV. Dominującą reakcją w przypadku DBP jest utrata obojętnego atomu wodoru, co prowadzi do utworzenia zamkniętopowłokowego jonu  $(\text{DBP} - \text{H})^-$ , który obserwowany jest poprzez rezonans z maksimum wydajności przy 1 eV [25]. Analogiczny proces nie był obserwowany w przypadku TEP, co świadczy o tym iż utrata wodoru w DBP następuje z grupy hydroksylowej. Jednak, najbardziej istotną reakcją w kontekście uszkodzeń DNA jest utrata grupy butylowej. Proces ten prowadzi do utworzenia jonu  $(\text{DBP} - \text{C}_4\text{H}_9)^-$ , który pojawia się w dwóch obszarach energii pomiędzy 2–4 eV i 7–10 eV. Podobny proces obserwowano w przypadku TEP w obszarze energii 7–9 eV, który związany był z utratą rodnika  $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$  w wyniku pęknięcia wiązania P–O [25]. Obie reakcje, utrata grupy butylowej w DBP oraz rodnika etoksyłowego w TEP, w sytuacji gdy grupa fosforanowa wbudowana jest w strukturę DNA będą prowadziły do pęknięcia nici DNA.

Inną grupę, wspólną dla obu estrów, stanowią jony fragmentaryczne obserwowane przy energiach elektronów zbliżonych do 0 eV [25], w przypadku których nadmiarowy elektron zlokalizowany jest na fragmencie zawierającym atom P. W przypadku DBP do tej grupy jonów należą  $(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_3^-$ ,  $\text{PO}_3^-$  i  $\text{PO}^-$ . Natomiast dla TEP obserwowano wyłącznie  $\text{H}_2\text{PO}_3^-$  i  $\text{PO}_3^-$ . Utworzenie tych jonów związane jest z dysocjacją wielu wiązań, co z pewnością prowadziłyby do zerwania nici DNA.

## 1.4 DYSOCJACYJNY WYCHWYT ELEKTRONÓW PRZEZ WIĘKSZE FRAGMENTY DNA

### 1.4.1. Wychwyty elektronów przez tymidynę

Tymidyna, nukleozyd składający się z tyminy (T) i deoksyrybozy (dR) efektywnie wychwytyje niskoenergetyczne elektrony ( $<3$  eV) w procesie dysocjacyjnym, który uwidacznia się poprzez pękanie wiązania N-glikozydowego [26]. W wyniku tego procesu powstają dwa komplementarne jony fragmentaryczne (T - H)<sup>-</sup> oraz (dR - OH)<sup>-</sup>. Obserwacje te zostały potwierdzone przez grupę z Innsbrucka, która wykonała eksperyment dla tymidyny w szerszym zakresie energii 0–12 eV [27]. Na podstawie uzyskanych wyników sugerowano, że przeniesienie elektronu z tyminy do grupy cukrowej oraz z grupy cukrowej do tyminy nie przebiega. Elektron pozostaje związany na fragmencie, na którym był pierwotnie zlokalizowany.

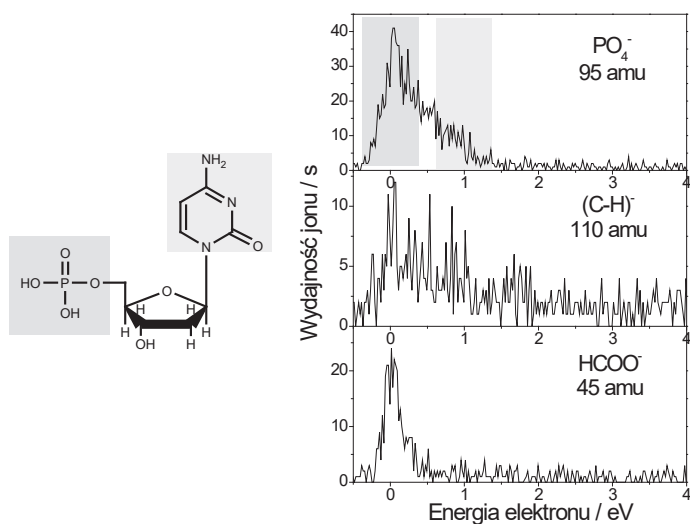
### 1.4.2. Wychwyty elektronów przez fosforan-5'-rybozy

Badania procesów wychwyty elektronów przez fragment szkieletu DNA/RNA składającego się z grupy fosforanowej i cukrowej, fosforan-5'-rybozy, przeprowadzone zostały metodą LIAD (ang. *Laser-Induced Acoustic Desorption*) [28]. Metoda ta umożliwia przeniesienie do fazy gazowej cząsteczek, które w innym przypadku ulegają termicznej dekompozycji [29]. Zgodnie z wynikami tych badań fosforan-5'-rybozy przyłącza elektrony o energii  $\approx 0$  eV, co prowadzi do zerwania wiązania pomiędzy grupą fosforanową i cukrową. Proces wychwyty prowadzi zarówno do pęknięcia wiązania C–O jak i P–O i utworzenia odpowiednio H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> lub C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub><sup>-</sup> [28]. Na podstawie przedstawionych wyników autorzy pracy sugerowali, że pęknięcia nici DNA spowodowane przyłączeniem niskoenergetycznych elektronów powstają w wyniku bezpośredniego przyłączenia elektronów do szkieletu cukrowo-fosforanowego DNA.

### 1.4.3. Wychwyty elektronów przez nukleotydy dCMP

Jak zostało wcześniej pokazane, pojedyncze komponenty DNA (zasady azotowe, grupa cukrowa oraz fosforanowa) efektywnie oddziałują z niskoenergetycznymi elektronami, co prowadzi do powstania licznych jonów fragmentarycznych. Niektóre reakcje fragmentacji mogą odzwierciedlać proces pęknięcia nici DNA. Zasadniczą kwestią jest jednak to, w jaki sposób właściwości oraz zachowanie pojedynczych cząsteczek zmieniają się kiedy zostają one wbudowane w bardziej złożony układ związany kowalencyjnie. Pomimo licznych badań podjętych w celu określenia mechanizmu uszkodzeń DNA indukowanych elektronami dostępne wyniki nadal nie są spójne. Stąd też niezbędne było przeprowadzenie badań wychwyty elektronu

przez monomer DNA, który w swojej strukturze zawiera wszystkie wcześniej omawiane komponenty. Badaniom metodą beam poddano nukleotyd 2'-deoksycytyny-5'-monofosforanu (dCMP). Wychwyty elektronów przez dCMP prowadzi do powstania jonów fragmentarycznych, które obserwowane są w dwóch obszarach energii, poniżej 2 eV oraz powyżej 5 eV [30]. W zakresie energii <5 eV szereg struktur rezonansowych obserwowano przy  $m/z$  16 i 1, które przypisano odpowiednio do  $O^-/NH_2^-$  i  $H^-$ . W obszarze energii <2 eV zarejestrowano kolejne jony fragmentaryczne przy  $m/z$  110, 95 i 45 (Rys. 4). Fragmentom o  $m/z$  95 i 110 zostały przypisane struktury  $PO_4^-$  oraz  $(C-H)^-$  ( $C$  = cytozyna), natomiast fragmentowi  $m/z$  45 struktura  $HCOO^-$ . Ze względu na to, że jon  $HCOO^-$  obserwowany był wyłącznie w przypadku DEA przez rybozę, tetra-acetylorybozę i fruktozę [20, 24, 22], stwierdzono iż powstaje on w wyniku lokalizacji elektronu na grupie cukrowej. Proces ten związany jest z degradacją pierścienia grupy cukrowej, a co za tym idzie, z rozerwaniem zarówno wiązania estrowego jak i N-glikozydowego.



Rysunek 4. Wydajności jonów  $PO_4^-$ ,  $(C-H)^-$  i  $HCOO^-$  powstających w wyniku dysocjacyjnego wychwyty elektronu przez dCMP. Rysunek wykonany w oparciu o wyniki Kopyry [30]

Figure 4. Ion yield of the fragments  $PO_4^-$ ,  $(C-H)^-$  i  $HCOO^-$  generated from dissociative electron attachment to dCMP. Figure prepared based on the results of Kopyra [30]

Powstanie jonu  $PO_4^-$  możliwe jest w wyniku pęknięcia wiązania O-C łączącego grupę fosforanową i cukrową, czemu towarzyszy utrata obojętnej cząsteczki wodoru. Dominująca struktura rezonansowa obserwowana jest przy energii  $\approx 0$  eV, kolejny pik o znacznie niższej wydajności widoczny jest przy energii około 1 eV (Rys. 4). Fragment o  $m/z$  110 został zidentyfikowany jako zamkniętopowłokowy jon  $(C-H)^-$ , który powstaje w wyniku rozerwania wiązania N-glikozydowego. Wydajność jonu  $(C-H)^-$  jest niewielka, ale powtarzalna w kolejnych eksperymentach.

Ponieważ każdy z komponentów DNA posiada charakterystyczny profil reakcji DEA, rejestrując wydajności jonów w funkcji energii elektronów możliwe jest uzyskanie informacji dotyczących pierwotnej lokalizacji elektronu. Stąd też, porównując wyniki uzyskane dla dCMP z poprzednimi otrzymanymi dla pojedynczych cząsteczek budujących nukleotydy, można było stwierdzić, że jon  $\text{PO}_4^-$  przy  $\approx 0$  eV powstaje w wyniku bezpośredniej lokalizacji elektronu na reszcie fosforanowej. Natomiast rezonans przy  $\approx 1$  eV w przypadku tegoż jonu powstaje w wyniku wstępnej lokalizacji elektronu na zasadzie azotowej, który następnie migruje do łańcucha DNA powodując pęknięcie wiązania pomiędzy resztą fosforanową i grupą cukrową.

Przedstawione powyżej wyniki dysocjacyjnego wychwytu elektronu przez dCMP stanowią pierwsze doniesienia świadczące o tym, że zarówno przyłączenie elektronu do zasady azotowej z późniejszym przeniesieniem do łańcucha, jak i bezpośredni wychwyt elektronu przez grupę cukrową i fosforanową mogą prowadzić do uszkodzeń DNA [30]. Analiza danych pozwoliła stwierdzić, że w przypadku dCMP około 60% SSBs powstaje w wyniku bezpośredniej lokalizacji elektronów na reszcie fosforanowej, 25% w wyniku bezpośredniej lokalizacji elektronów na grupie cukrowej oraz 15% na skutek przyłączenia elektronów do cytozyny z następującą migracją elektronu do łańcucha DNA.

### 1.5. SENSYBILIZATORY DNA

W radioterapii, metodzie nieselektywnej, podatność komórek nowotworowych na promieniowanie jonizujące może być zwiększona poprzez synchroniczne zastosowanie chemoterapeutyków, które specyficznie uwrażliwiają komórki nowotworowe. Ważną grupę radio-sensybilizatorów stanowią tzw. antymetabolity, związki cechujące się dużym podobieństwem strukturalnym do naturalnie występujących metabolitów. Wykazują one zdolność do zaburzania przebiegu określonego szlaku metabolicznego wewnątrz komórki poprzez wyparcie metabolitu. Do tej grupy związków należą między innymi halogenopochodne zasad azotowych i nukleozydów.

Obecny stan wiedzy pozwala stwierdzić, że halogenopochodne zasad azotowych (5-fluoro-, 5-bromo- oraz 5-jodouracyl) wbudowane w DNA wywołują efekt radiouwrażliwiania, który związany jest ze wzrostem przekroju czynnego na wychwyt elektronów [31, 32].

Fakt, że grupa cukrowa ulega efektywnej dekompozycji pod wpływem LEEs rodzi pytanie, czy ona również może zostać selektywnie uwrażliwiona na działanie promieniowania przykładowo poprzez wprowadzenie atomu halogenu. Wyniki badań uzyskane dla 2',2'-difluorocytydyny (leku powszechnie stosowanego w chemioterapii) świadczą o takiej możliwości [33]. Okazuje się, że obecność atomów fluoru podstawionych w grupie cukrowej również zwiększa przekrój czynny na wychwyt elektronów. To z kolei znajduje odzwierciedlenie w wyższej intensywności jonów fragmentarycznych powstających przy energii progowej  $\approx 0$  eV.

## UWAGI KOŃCOWE

Uszkodzenia materiału genetycznego wywołane działaniem promieniowania jonizującego w znaczącym stopniu spowodowane są działaniem wtórnych elektronów powstających wzdłuż toru jonizacji. Elektrony te odgrywają ważną rolę w złożonej sekwencji reakcji prowadzących do pęknięcia nici DNA. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań świadczą o tym, że wszystkie komponenty budujące DNA (zasady azotowe, grupa cukrowa i fosforanowa) rezonansowo, dysocjacyjnie wychwytyją elektrony już w obszarze energii poniżej progu wzbudzenia elektronowego ( $<3$  eV). Z badań przeprowadzonych dla nukleotydu dCMP wynika, że większość pęknięć nici DNA powstaje na skutek bezpośredniego przyłączenia elektronów do szkieletu cukrowo-fosforanowego DNA. SSBs tylko w niewielkim stopniu powstają w wyniku przyłączenia elektronu do zasady, z następującą migracją tegoż elektronu do szkieletu DNA.

Obecny stan wiedzy na temat mechanizmów prowadzących do powstania SSBs umożliwia głębsze zrozumienie mechanizmów działania radio-sensybilizatorów DNA, co stanowi podstawę do opracowania bardziej ukierunkowanych strategii w leczeniu chorób nowotworowych.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] T. Jahnke, H. Sann, T. Havermeier, K. Kreidi, C. Stuck, M. Meckel, M. Schoffler, N. Neumann, R. Wallauer, S. Voss, A. Czesch, O. Jagutzki, A. Malakzadeh, F. Afaneh, Th. Weber, H. Schmidt-Bocking, R. Dorner, *Nature Phys.*, 2010, **6**, 139.
- [2] B. Boudaiffa, P. Cloutier, D. Hunting, M.A. Huels, and L. Sanche, *Science*, 2000, **287**, 1658.
- [3] F. Martin, P. D. Burrow, Z. Cai, P. Cloutier, D. Hunting, and L. Sanche, *Phys. Rev. Lett.*, 2004, **93**, 068101.
- [4] I. Baccarelli, I. Bald, F.A. Gianturco, E. Illenberger, J. Kopyra, *Physics Reports*, 2011, **508**, 1.
- [5] S. Gohlke, H. Abdoul-Carime, E. Illenberger, *Chem. Phys. Lett.*, 2003, **380**, 595.
- [6] R. Abouaf, J. Pommier, H. Dunet, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2003, **226**, 397.
- [7] H. Abdoul-Carime, J. Langer, M.A. Huels, E. Illenberger, *Eur. Phys. J. D*, 2005, **35**, 399.
- [8] H. Abdoul-Carime, S. Gohlke, and E. Illenberger, *Phys. Rev. Lett.*, 2004, **92**, 168103.
- [9] S. Ptasńska, S. Denifl, P. Scheier, E. Illenberger, T.D. Maerk, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 6941.
- [10] R. Barrios, P. Skurski, J. Simons, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 7991.
- [11] J. Simons, *Acc. Chem. Res.*, 2006, **39**, 772.
- [12] S. Denifl, S. Ptasńska, M. Probst, J. Hrusak, P. Scheier, T.D. Maerk, *J. Phys. Chem.*, 2004, **108**, 6562.
- [13] K. Aflatooni, A.M. Scheer, P.D. Burrow, *J. Chem. Phys.*, 2004, **92**, 168103.
- [14] J. Kopyra, I. Szamrej, K. Graupner, L.M. Graham, T.A. Field, P. Sulzer, S. Denifl, T.D. Maerk, P. Scheier, I.I. Fabrikant, M. Braun, M.-W. Ruf, H. Hotop, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2008, **277**, 130.
- [15] J. Kopyra, C. König, E. Illenberger, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2009, **281**, 89.
- [16] R.S. Wilde, G.A. Gallup, and I.I. Fabrikant, *J. Phys. B: At., Mol. Opt. Phys.*, 2000, **33**, 5479.
- [17] L. Lehr and W. H. Miller, *Chem. Phys. Lett.*, 1996, **250**, 515.
- [18] J. Kopyra and H. Abdoul-Carime, *J. Chem. Phys.*, 2015, **142**, 174303.

- [19] S. Ptasińska, S. Denifl, P. Scheier, and T.D. Maerk, *J. Chem. Phys.*, 2004, **120**, 8505.
- [20] I. Bald, J. Kopyra, and E. Illenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 4851.
- [21] I. Bald, H.D. Flosadottir, J. Kopyra, E. Illenberger, O. Ingolfsson, *Int. J. MassSpectrom.*, 2009, **280**, 190.
- [22] P. Sulzer, S. Ptasińska, F. Zappa, B. Mielewska, A.R. Milosavljevic, P. Scheier, and T.D. Maerk, *J. Chem. Phys.*, 2006, **125**, 044304.
- [23] K. Afatooni, A.M. Scheer, and P.D. Burrow, *J. Chem. Phys.*, 2006, **125**, 054301.
- [24] I. Bald, J. Kopyra, I. Dąbkowska, E. Antonsson, and E. Illenberger, *J. Chem. Phys.*, 2007, **126**, 074308.
- [25] C. König, J. Kopyra, I. Bald, and E. Illenberger, *Phys. Rev. Lett.*, 2006, **97**, 018105.
- [26] H. Abdoul-Carime, S. Gohlke, E. Fischbach, J. Scheike, E. Illenberger, *Chem. Phys. Lett.*, 2004, **387**, 267.
- [27] S. Ptasińska, S. Denifl, S. Gohlke, P. Scheier, E. Illenberger, and T.D. Maerk, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 1893.
- [28] I. Bald, I. Dąbkowska, and E. Illenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 8518.
- [29] V.V. Golovlev, S.L. Allman, W.R. Garrett, N. I. Taranenko, C.H. Chen, *Int. J. MassSpectrom. Ion Proc.*, 1997, **169/170**, 69.
- [30] J. Kopyra, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 8289.
- [31] H. Abdoul-Carime, M.A. Huels, E. Illenberger, L. Sanche, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 5354.
- [32] H. Abdoul-Carime, M.A. Huels, E. Illenberger, L. Sanche, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2003, **228**, 703.
- [33] J. Kopyra, A. Keller, and I. Bald, *RSC Advances*, 2014, **4**, 6825.

Praca wpłynęła do Redakcji 25 maja 2015

