

ПАРАМАГНИТНЫЕ ЦЕНТРЫ В ОБЛУЧЕННОМ Л-ЛЕЙЦИНЕ- N^{15}

Р. А. АСАТУРЯН

На основе анализа формы спектров ЭПР облученного Л-лейцина- N^{15} при ^{15}N изотопном замещении атомами N^{15} в различной концентрации выделены пять типов парамагнитных центров. При увеличении концентрации N^{15} существенных изменений в форме спектров ЭПР не наблюдается, что свидетельствует о малой вероятности локализации несвязанного электрона вблизи атома азота Л-лейцина- N^{15} .

Исследованию парамагнитных центров (ПЦ) облученных белков и составляющих их аминокислот посвящено большое число работ и монографий [1-7]. Анализ формы спектров электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) облученных биологических объектов представляет собой сложную задачу, так как в образце образуется, как правило, несколько ПЦ. Однако применение метода изотопного замещения одних атомов на другие с известным ядерным спином существенно упрощает их интерпретацию.

Материал и методика. Использовались хроматографически чистые коммерческие препараты Л-лейцина- N^{15} из ГДР (Isocmerz) с обогащением N^{15} 9,89 ± 0,1, 50,5 ± 0,5 и 95,1 ± 0,1%. Образцы загружались в три идентичные ампулы из специального стекла, которые откачивались в вакууме 10^{-3} мм рт. ст. и запаивались. Использовали релаксационный метод разделения радикалов, основанный на различии их времен спин-решеточной релаксации [8], и термический метод разделения радикалов. Для выделения индивидуальной формы спектра ЭПР из общей смеси использовали графический метод вычитания.

Одновременное облучение трех разных образцов одинаковыми дозами проводилось при 77°K рентгеновскими лучами на установке РУП 200/20 при токе 15 мА и напряжении на вольфраховом аноде 183 кВ. Мощность дозы, измеренная ферросульфатным методом, равнялась 2420 рад/мин, а максимальная поглощенная образцом доза была 485-10³ рад.

Спектры ЭПР при 77°K регистрировались на серийном радиоспектрометре 3-сантиметрового диапазона типа ЭПР-2 при значениях токов СВЧ детектора 1,0 мА и 0,1 мА.

Результаты и обсуждение. Применение указанных методов позволило выделить в облученном Л-лейцине- N^{15} пять ПЦ и получить существенно новые результаты, отличающиеся от полученных ранее в литературе [9-11].

На рис. 1 представлены спектры ЭПР облученного образца Л-лейцина- N^{15} с изотопным обогащением 9,89%. Все спектры записаны при 77°K. Спектры а, б и в зарегистрированы непосредственно после облу-

чения различными дозами, а *а* и *б* — через сутки и 8 суток хранения при 77°K соответственно. Отношение интенсивности центральной компоненты к компонентам, отмеченным пунктирными стрелками, с расщеплением около 40 эрст при дозах $242 \cdot 10^3$, $363 \cdot 10^3$ и $485 \cdot 10^3$ рад равно соответственно 1.26, 1.76 и 1.84. Через сутки это отношение становится

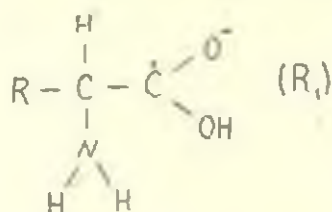


Рис. 1. Спектры ЭПР образца L-лейцина- N^{15} (9.89%) при 77°K непосредственно после облучения дозами $242 \cdot 10^3$ рад *а*, $363 \cdot 10^3$ рад *б* и $485 \cdot 10^3$ рад *в*. Спектр *г* — запись этого же образца через сутки после облучения, *д* — через 8 суток. Хранение при 77°K. Сплошная стрелка — положение линии ДФПГ, пунктирные стрелки — компоненты радикалов R_2 , сплошные стрелки с кружочком — компоненты радикалов R_3 .

1.27, а через 8 суток уменьшается до 0.94. Отношение центральной компоненты к боковым компонентам, отмеченным сплошными стрелками с кружочком, при дозе $242 \cdot 10^3$ рад равно 4.0, при $363 \cdot 10^3$ рад — 6.9 и при $485 \cdot 10^3$ рад — 6.1. Через сутки оно становится равным 4.0, а через 8 суток — 2.0. И наконец, отношение интенсивности компонент, отмеченных пунктирными стрелками, к боковым компонентам, отмеченным сплошными стрелками с кружочком, для спектра *а* равно 3.2, для *б* — 3.9 и для *в* — 3.3. Через сутки это отношение сохраняется (3.2), но зато через 8 суток резко падает до 2.1.

Совокупность приведенных данных дает основание считать, что спектры ЭПР на рис. 1 представляют собой суперпозицию, по крайней мере, трех различных ПЦ. Один из них — R_1 — дает вклад в центр спектра с g -фактором, близким к дифенилпикрилгидразилу (ДФПГ), и шириной 15 эрст. Другой — R_2 — представляет собой дублет (пунктирные стрелки) с величиной расщепления около 40 эрст. Третий ПЦ — R_3 — боковые компоненты которого отмечены сплошными стрелками с кружочком, представляет собой неразрешенный спектр — суперпозицию двух предыдущих ПЦ.

Из спектров *в* и *д* видно, что через сутки интенсивность центральной компоненты уменьшилась. Аналогично ее интенсивность упала и через 8 суток хранения при 77°K. Такое поведение ПЦ обычно связывают с присутствием заряженных радикалов, исчезающих еще и под действием света [6]. В работе Паттена и Горди [9] в облученном лейцине также был выделен синглет, но идентификации не было проведено. Каюшин и др. [5] в облученном лейцине синглетный спектр шириной 16 эрст приписали анион-радикалам типа



В нашем случае ширина линии синглетного спектра составляет 15 эрст, что находится в согласии с работой [5].

Перейдем к интерпретации дублетного спектра, имеющего величину расщепления 40 эрст. Согласно соотношению Мак-Коннела, величина расщепления для СН фрагментов изменяется от 20 до 30 эрстед. Очевидно, что при данной величине расщепления неспаренный электрон не может быть локализован на атоме углерода. В работе Хилла с сопр. [12] в γ -облученном полнокристаллическом льду при 77°K наблюдались OH радикалы в виде дублета с величиной расщепления ~ 40 эрстед. Они погибали при прогреве до комнатной температуры, что наблюдается и в нашем случае. По-видимому, наблюдаемый дублетный спектр должен принадлежать OH радикалам R_2 , образующимся при их отрыве от атома углерода карбоксильной группы.

На наш взгляд, Паттен и Горди [9] ошибочно приписали структуру дублетного спектра анион-радикалам R_1 , который должен давать синглетный спектр, а не дублетный.

Так как в центральную часть спектра в основном дают вклад R_1 и R_2 , то обнаружение дополнительных компонент R_3 в центре спектра затруднительно. Вследствие этого идентификация R_3 представляет собой сложную задачу. Отметим, однако, что компоненты радикалов R_3 , отмеченные сплошными стрелками с кружочком, ошибочно приписывались III, имеющим в центре синглетный спектр [9], что не следует из рис. 1.

На рис. 2 представлены спектры ЭПР (при 77°K) трех образцов облученного Л-лейцина- N^{15} с различным обогащением N^{15} . Спектры а, в и д зарегистрированы при токе СВЧ детектора 1,0 ма, а б, г и е — при 0,1 ма. Сравнивая а и б, где изотопное обогащение N^{15} минимально (9,89%), можно заметить, что форма спектров изменяется. Это дает нам дополнительное подтверждение того, что в исходном образце наблюдается несколько типов III с различными временами спин-решеточной релаксации [8]. Аналогичные изменения формы от мощности микроволнового генератора можно видеть и на спектрах в и г, а также б и е. Если сравнить формы спектров образцов Л-лейцина- N^{15} при одинаковых значениях токов СВЧ детектора, но при различном обогащении изотопом N^{15} (спектры а, в, д и б, г, е), то можно заметить, что практически существенных изменений нет. Это дает нам основание считать, что в исходных облученных препаратах Л-лейцина- N^{15} неспаренный электрон в наблюдаемых трех III не должен быть локализован на аминогруппе.

На рис. 3 при 77°K даны спектры ЭПР тех же образцов облученного Л-лейцина- N^{15} , но после прогрева до комнатной температуры. При сравнении спектров *a* и *б* легко видеть изменения их формы. Аналогичные изменения при различных токах СВЧ детектора наблюдаются и для спектров *в* с *г* и *д* с *е*. Анализ методом графического вычитания показал, что суммарные спектры *б*, *г*, и *е* (рис. 3) представляют собой



Рис. 2.



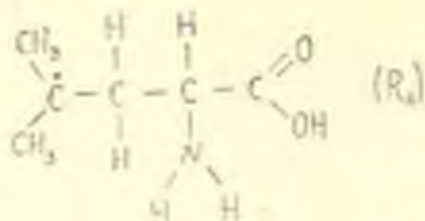
Рис. 3.

Рис. 2. Спектры ЭПР трех различных облученных дозой $485 \cdot 10^3$ рад образцов Л-лейцина- N^{15} , отличающихся изотонным замещением на N^{15} : первый—обогащение N^{15} равно 9.89 (*a*, *б*); второй—50.5 (*а*, *г*); третий—95.1% (*д*, *е*). Спектры *a*, *б*, *д* записаны при токе СВЧ детектора 1.0 ма, а *б*, *г*, *е*—при 0.1 ма. Облучение и запись при 77°K. Стрелки показывают положение линии ДФПГ.

Рис. 3. Спектры ЭПР тех же трех образцов, что и на рис. 2, но после прогрева до комнатной температуры. Спектры *a*, *б*, *д* зарегистрированы при токе СВЧ детектора 1.0 ма, а *б*, *г*, *е*—при 0.1 ма. Запись при 77°K. Стрелки показывают положение линии ДФПГ.

суперпозицию двух различных типов радикалов. Для выявления индивидуальной формы их спектров рассмотрим следующие данные.

На рис. 4 записаны спектры ЭПР описываемых трех образцов Л-лейцина- N^{15} после прогрева до 368°K. Форма спектров ЭПР для всех трех образцов практически не зависит от мощности клистронного генератора (спектры *a* и *б*, *г* и *д*, *ж* и *з*), что позволяет однозначно утверждать о присутствии только одного типа радикалов, спектр которых состоит из 8 компонент СТС с расщеплением 25 эрстед. Этот спектр ранее был приписан радикалам R_1 , в которых имеется 7 эквивалентных протонов [9, 10]:



При комнатной температуре в результате растормаживания вращения соседней группы CH_2 выявляется дополнительное дублетное сверхтонкое взаимодействие с восьмым протоном этой группы, расщепляющим каждую из наблюдаемых восьми компонент на 8 эрст (рис. 4 в, е, и). Такие изменения формы спектров от температуры обратимы. Кроме того, при изотопном замещении атомами N^{16} форма спектров ЭПР практически не меняется. Это служит дополнительным подтверждением правильности интерпретации структуры радикалов R_4 , предложенной ранее в работе [9].

На рис. 5 представлен спектр ЭПР радикалов, полученный методом графического вычитания спектра рис. 4 з из спектра рис. 3 е. Обо-

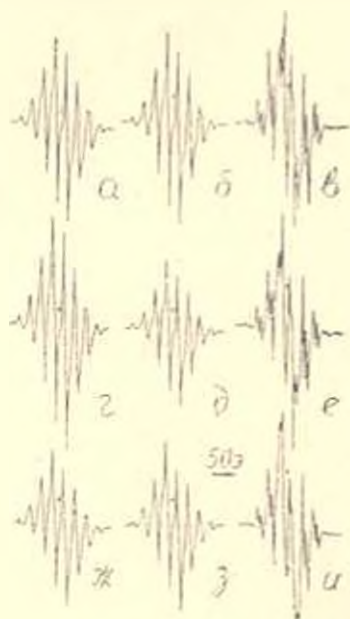


Рис. 4.



Рис. 5.

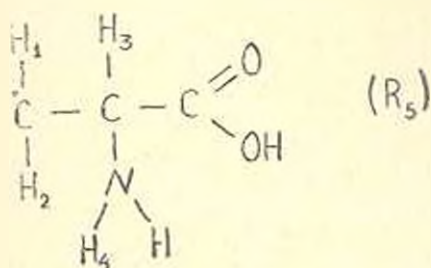
Рис. 4. Спектры ЭПР тех же образцов, что и на рис. 2, но после прогрева до 368°K . Спектры а, в, ж зарегистрированы при токе СВЧ детектора 1,0 мА, а б, д, з—при 0,1 мА. Спектры а, б, г, д, ж, з записаны при 77°K , а в, е, и—при комнатной температуре. Стрелки показывают положение линии ДФПГ.

Рис. 5. Спектр ЭПР радикалов R_4 , полученный методом графического вычитания спектра рис. 4 з из спектра рис. 3 е. Стрелка показывает положение линии ДФПГ.

значим их через R_3 . Нетрудно заметить, что имеем квинтетный спектр с интенсивной центральной компонентой вблизи g-фактора ДФПГ и меньшей расщепления около 25 эрст. Как видим, при сравнении спектров на рис. 3 б, г, е и рис. 4 б, д, з радикалы R_3 гибнут после прогресса до 368°K, так как менее термостабильны, чем R_1 , сохранившиеся в аналогичных условиях.

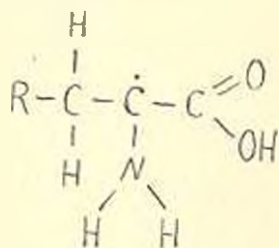
Они легко насыщаются даже при токе СВЧ детектора 1.0 ма (рис. 3, д, е). Действительно, спектр рис. 3 д практически почти не содержит компонент радикалов R_3 и в основном обусловлен радикалами R_1 , имеющими наиболее короткие времена спин-решеточной релаксации.

Величина расщепления и квинтетное число компонент с почти биномальным распределением интенсивности свидетельствуют о том, что неспаренный электрон в этом радикале должен быть локализован на четырех эквивалентных протонах. По-видимому, этот радикал должен иметь структуру, в которой неспаренный электрон локализован не в непосредственной близости от атома азота и в то же время не на достаточном удалении от него, так как в суммарном спектре рис. 3 б, г, е наблюдаются некоторые изменения при изотопном замещении на N^{15} , хотя и не очень существенные. Одним из возможных вариантов, удовлетворяющих этим требованиям, может быть структура типа



где H_1 , H_2 , H_3 и H_4 должны быть эквивалентными.

В работе Паттена и Горди [11] радикалы, образующиеся в облученном лейцине, идентифицированы в виде



Совокупность экспериментов, проведенных нами с использованием метода изотопного замещения, позволяет считать недостаточно обоснованной эту интерпретацию, так как в противном случае при обогащении атомами N^{15} наблюдались бы значительные изменения формы спектров ЭПР, чего нельзя сказать из наших экспериментов.

Ереванский физический институт

Поступило 28.II 1978 г.

Ռ. Ա. ԱՍԱՏՈՒՐՅԱՆ

Ճառագայթված Լ-լեյցին—N¹⁵-ի էՊՌ սպեկտրների ձևի անալիզի շնորհիվ իման վրա նրա N¹⁵ ատոմների տարբեր կոնցենտրացիաներով իզոտրոպային տեղակայման ժամանակ անջատվել են հինգ տիպի պարամագնետային կենտրոններ։ N¹⁵-ի կոնցենտրացիայի ավելացման ժամանակ էՊՌ սպեկտրների ձևի զգալի փոփոխություն չի ստացվել, որը վկայում է չզուգավորված էլեկտրոնի տեղակայման փոքր հավանականության մասին Լ-լեյցին N¹⁵-ի ազոտի ատոմի մոտ։

PARAMAGNETIC CENTRES IN IRRADIATED L-LEUCIN-N¹⁵

R. A. ASATURIAN

Based on the analysis of the form of EPR spectra for irradiated L-leucin-N¹⁵, five types of paramagnetic centres have been extracted by its isotopic substitution by N¹⁵ atoms in different concentrations. Since no essential changes in the form of EPR spectra with the increase of N¹⁵ concentration have been observed, the localization of non-matched electron near the nitrogen atom of L-leucin-N¹⁵ renders low-probable.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Дертингер Г., Юнг Х. Молекулярная радиобиология. М., 1973.
2. Ингрэм Д. Электронный парамагнитный резонанс в биологии. М., 140, 1972.
3. Каюшин Л. П., Львов К. М., Пулатова М. К. Исследование парамагнитных центров облученных белков. 51, М., 1970.
4. Каюшин Л. П., Грибова Э. П., Азимова О. А. Электронный парамагнитный резонанс фотопроточесов биологических соединений. М., 1973.
5. Каюшин Л. П., Пулатова М. К., Кривенко В. Г. Свободные радикалы и их преобразования и облученных белках. М., 17, 1976.
6. Писежецкий С. Я., Котов А. Г., Милинчук В. К., Рогинский В. А., Тушиков В. Н. ЭПР свободных радикалов и радиационной химии. М., 1972.
7. Свободные радикалы в биологических системах. М., 1963.
8. Асатурян Р. А., Миромцев В. Н., Брук М. А., Абкин А. Д. Химия высоких энергий, 3, 256, 1969.
9. Patten R., Gordy W. Radiat. Res., 14, 573, 1961.
10. Jensen H., Henriksen Th. Acta Chem. Scand., 22, 2263, 1968.
11. Patten R., Gordy W. Radiat. Res., 22, 29, 1964.
12. Hill M., Wyard S. J. Phys., B, 1, 289, 1968.