

О МЕХАНИЗМЕ ОБРАЗОВАНИЯ РАДИКАЛОВ ПРИСОЕДИНЕНИЯ В γ -ОБЛУЧЕННЫХ РАСТВОРАХ ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ

Г. В. АБАГЯН

Методом ЭПР исследовано взаимодействие атомов водорода в замороженных сернокислых растворах пиримидиновых оснований: урацила и цитозина. Параллельно проанализированы превращение парамагнитных центров в γ -облученных замороженных растворах урацила, уридина и уридин-5-дифосфорной кислоты в обычной и тяжелой воде (диапазон температур 80—250°K).

Основную часть парамагнитных центров, сохраняющихся в растворе после повышения температуры до 120°K, составляют электроны, стабилизированные молекулой основания. При 160—200°K эти центры рекомбинируют с H^+ или D^+ , в результате чего образуются радикалы, по своей структуре тождественные радикалам присоединения атомов H или D к пиримидиновому кольцу.

Свободные радикалы, возникающие при облучении пиримидиновых оснований—одной из важнейших компонент нуклеиновых кислот—методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) изучались в ряде работ [1—4]. Существенное влияние на образование парамагнитных центров при облучении нуклеиновых кислот и составляющих их компонент оказывают активные продукты радиолиза воды—атомы водорода (H), гидроксильные радикалы (OH), гидратированный электрон (e^-).

Атомы водорода вступают в реакции присоединения или замещения в соединениях, содержащих неспыщенные связи (пиримидиновые основания), они присоединяются к пиримидиновому кольцу с распариванием двойной $C=C$ связи; в насыщенных соединениях (дезоксирибоза) происходит отрыв одного из атомов водорода $C-H$ связи с выделением H_2 .

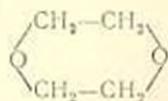
Ранее нами при облучении водных растворов ДНК, тимидина и 5-метилцитозина [5, 6] было высказано предположение о двухступенчатом механизме образования радикалов присоединения в пиримидиновых основаниях. Для подтверждения этой точки зрения в настоящей работе мы исследовали пути возникновения радикалов в γ -облученных замороженных водных растворах урацила, цитозина, уридина, уридин-5'-дифосфорной кислоты—коммерческих препаратов без дополнительной очистки. В качестве модельного соединения был использован диоксан особой чистоты. Параллельно исследовали взаимодействие этих соединений с атомами водорода в растворах серной кислоты.

Опыты с γ -облучением проводили с обезгаженными растворами H_2O и D_2O (содержание изотопа в D_2O —99,5%). Непосредственно пе-

ред облученном образцы вакуумировали до остаточного равновесного давления водяных паров над ними 10^{-3} тор при 77°K . γ -облучение водных растворов (бидистилатов) проводили в пробирках из стекла «Луч» при температуре кипения жидкого азота (77°K), от источника Co^{60} , мощностью 318 рад/сек, доза облучения 2 Мрад. Спектры ЭПР измеряли при 80°K на радиоспектрометре ЭПР-2 ИХФ, 3-сантиметрового диапазона.

Взаимодействие с атомами водорода осуществляли по методике, предложенной в работах Шалимова, Бажина и других [7, 8]. Водный раствор (бидистилат) исследуемого вещества ($2 \cdot 10^{-2}$ М) смешивали с растворами FeSO_4 и H_2SO_4 (D_2SO_4), замораживали и освещали ультрафиолетовым светом. Во избежание нежелательных реакций в растворах исследуемое вещество добавляли в заранее охлажденный сернокислый раствор (рН 1,5), и смесь сразу же замораживали до 77°K . Получалась прозрачная, бесцветная, стеклообразная матрица. Освещение ультрафиолетовым светом проводили лампой СВДШ-1000 с водяным фильтром, экспозиция 11 мин, охлаждение жидким азотом — в кварцевом сосуде Дьюара. Реакцию наблюдали методом ЭПР. После облучения растворов при 77°K ультрафиолетовым светом возникает интенсивный сигнал ЭПР от атомов водорода $\Delta H = 502$ га, при 110°K он исчезает, одновременно возникает и растет сигнал от исследуемого вещества. Атомы водорода реагируют с растворенным веществом с высокой эффективностью — 30% от общего числа образовавшихся атомов водорода вступают в реакцию при 110°K .

На рис. 1 приведены спектры ЭПР радикалов, образующихся при взаимодействии атомов водорода с урацилом (а) и цитозином (а'). Аналогичный спектр ЭПР (с несколько иными константами расщепления сверхтонкой структуры (СТС)) зарегистрирован в диоксиде. Константы СТС спектров в урациле и цитозине совпадают с данными других исследователей [9—12], изучавших взаимодействие атомов водорода с сухими препаратами. Атом водорода присоединяется к двойной $-\text{C}_4=\text{C}_5-$ связи, приводя к образованию радикала $-\text{CH}_2-\dot{\text{C}}\text{H}-$, с константами расщепления на α - и β -протонах, равными $a_{\text{H}_\alpha} \approx 20$, $a_{\text{H}_\beta} \approx 20$, $a_{\text{H}_\gamma} \approx 46$. Эта структура косвенно подтверждается наблюдением такого же радикала (с близкими константами СТС расщепления) в диоксиде, где, в отличие от пиримидиновых оснований, он возникает в результате разрыва $\text{C}-\text{H}$ связей. В структуре диоксида, при данном методе иници-



прования, любой возможный разрыв $\text{C}-\text{H}$ связей приводит к образованию радикала только одного типа $-\text{CH}_2-\dot{\text{C}}\text{H}-$.

На рис. 2 представлены результаты опытов по γ -облучению замороженных растворов уридин-5'-дифосфорной кислоты в H_2O и D_2O . Подоб-

ные превращения (но менее четко) наблюдаются в растворах уранила и уридина.

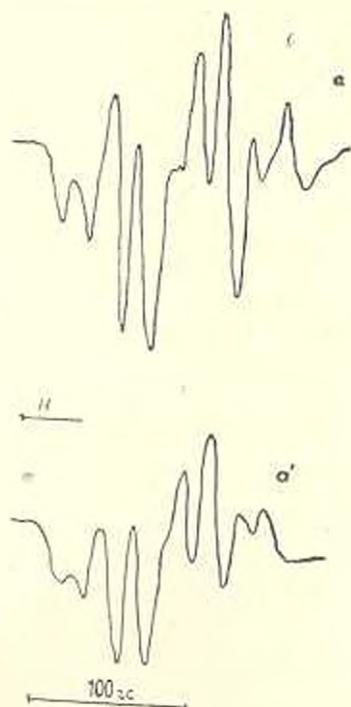


Рис. 1. Спектры ЭПР продуктов реакции атомов водорода с уранилом (а) и шитозином (а').

Верхний ряд спектров ЭПР соответствует растворам уридин-5'-дифосфорной кислоты в H_2O . При $77^\circ K$ (рис. 2б) спектр близок к спектру облученного льда [13] (ОН радикалы—асимметричный дублет $\Delta H \approx 43$ Гс), однако в нем имеется также несколько дополнительных линий. При повышении температуры до $143^\circ K$ интенсивность спектра значительно падает, и в нем остается плохо разрешенный дублет с $\Delta H \approx 18$ Гс. Это свидетельствует о том, что при повышении температуры в основном ОН радикалы гибнут, не вступая во взаимодействие с молекулами растворенного вещества. При $193^\circ K$ и далее дублетный сигнал ЭПР превращается в многокомпонентный спектр ЭПР, характерный для радикалов присоединения, наблюдаемых при взаимодействии атомов водорода с уранилом.

Аналогичные изменения спектров ЭПР зафиксированы в растворе уридин-5'-дифосфорной кислоты в растворах D_2O (нижний ряд спектров). При $77^\circ K$ (рис. 2б') спектр состоит в основном из дублетной линии и сигнала парамагнитных центров, возникающих при облучении чистой D_2O . При повышении температуры до $120^\circ K$ все парамагнитные центры D_2O гибнут, по-видимому, не вступая во взаимодействие с молекулами растворенного вещества, и в спектре ЭПР остается лишь

дублетная линия (рис. 2 с'), причем интенсивность ее сохраняется практически постоянной. При температуре выше 190°K заметно превращение его в многокомпонентный спектр соответствующими радикалами —СНД—СН—с одним атомом водорода, замещенным на дейтерий.

Максимальная концентрация радикалов присоединения в водном растворе достигается при 193°K, а в растворе D₂O—при 213°K. При более высоких значениях температуры (250°K) они гибнут.

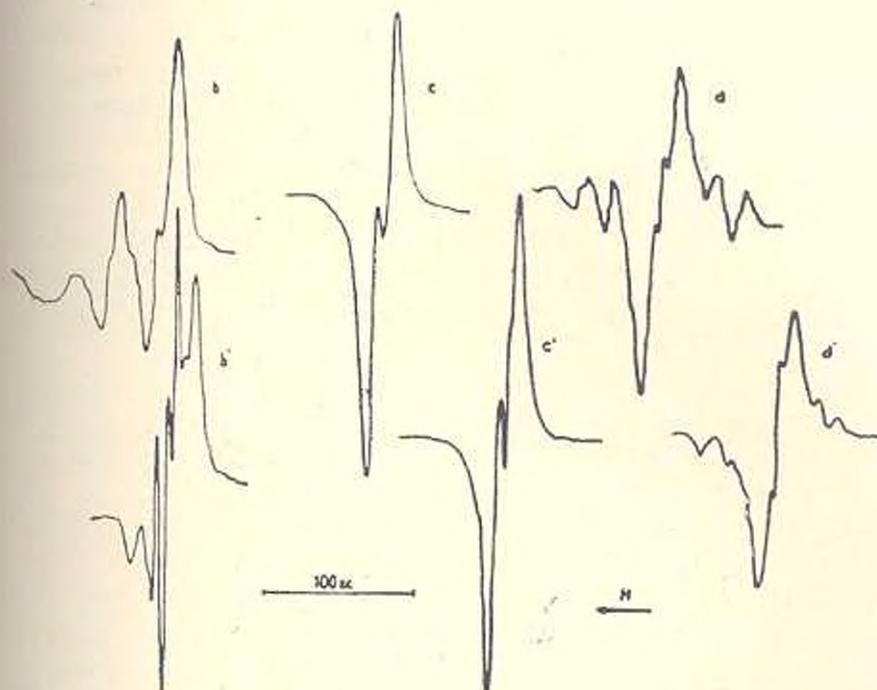


Рис. 2. Спектры ЭПР γ -облученных растворов уридин-5'-дифосфорной кислоты в H₂O (b, c, d) и в D₂O (b', c', d'). Концентрация 0,2 М. b, b'—при 77°K, c, c'—после отогрева образца до 143°K, d—до 200°K, d'—до 230°K. Масштаб спектров c, c' (по ординате) увеличен в 2,5 раза.

Взаимодействие атомов водорода с пиримидиновыми основаниями, как правило, приводит к образованию радикалов присоединения. Это подтверждается данными, полученными при взаимодействии их с атомами водорода в сернокислых растворах. В замороженных (сернокислых) растворах атомы водорода присоединяются к основаниям при температуре 110°K и выше, т. е. практически мгновенно. Атомы водорода реагируют с различными основаниями и нуклеозидами примерно с одинаковыми скоростями, причем скорость реакции определяется подвижностью их в твердой матрице.

При облучении замороженных водных растворов урицила, уридина, уридин-5'-дифосфорной кислоты реакции OH радикалов не играют значительной роли в процессе радиолиза при 77°K и при последующем размораживании растворов. При 120—140°K радикалы OH становятся

подвижными и гибнут, не успев прореагировать с молекулами растворенного вещества (их исчезновение сопровождается значительным падением суммарной концентрации частиц без появления новых линий в спектрах ЭПР). Очевидно, постепенное размораживание растворов непригодно для исследования реакций радикалов ОН.

Атомы водорода при 77°К не стабилизируются кристаллической решеткой льда. Возможно, в процессе облучения они частично реагируют с основаниями, однако концентрация радикалов присоединения, возникающих при этом, невелика, во всяком случае, менее чем 10^{13} радикал/г, так как при 77°К спектр этих радикалов практически отсутствует.

При размораживании облученных при 77°К растворов урицила, уридина, уридин-5'-дифосфорной кислоты в области значений температур 120—200°К происходит интенсивное образование радикалов присоединения, и концентрация их увеличивается в несколько раз, и то время как в системе отсутствуют атомы водорода (рис. 2 d, d'). В растворах H_2O возникают радикалы типа $-CH_2-\dot{C}H-$, в растворах D_2O аналогичные, но дейтерозамещенные $-CND-\dot{C}H-$ (скорость присоединения атомов D меньше, чем атомов H).

В промежуточной стадии, предшествующей образованию радикалов присоединения, возникают парамагнитные центры, соответствующие дублетному спектру ЭПР $\Delta H \approx 18$ гс. Спектр этих центров одинаков в растворах нуклеотида (уридин-5-дифосфорная кислота), нуклеозида (уридин) и основания (урицил) в обычной и тяжелой воде. Следовательно, СТС спектра вызвана взаимодействием неспаренного электрона с протонами основания, а не растворителя или остатка дезоксирибозы. Парамагнитные центры, соответствующие дублетному спектру ЭПР, накапливаются в ходе облучения растворов при 77°К, и концентрация их сохраняется постоянной при повышении температуры до 150—160°К. Радикалы ОН или ОД, погибая, не рекомбинируют с ними, т. е. эти центры, скорее всего, имеют не радикальную природу.

Можно предположить, что активное участие в образовании парамагнитных центров, соответствующих дублетному спектру ЭПР, принимает другая компонента радиолитиза воды — гидратированный электрон: в процессе облучения электроны стабилизируются на пиримидиновом основании с образованием ион-радикала, и именно этим парамагнитным центрам соответствует дублетный сигнал ЭПР ($\Delta H = 18$ гс). На самом деле, константа скорости реакции гидратированного электрона с пиримидиновыми основаниями довольно высока $k \approx 10^9 - 10^{10} M^{-1} \text{сек}^{-1}$ [14], в то время как соответствующая величина при реакции с дезоксирибозой (рибозой) на несколько порядков ниже.

При повышении температуры электроны, стабилизированные молекулой основания, рекомбинируют с H^+ (или D^+), в результате чего образуются радикалы, аналогичные по своей структуре радикалам присоединения атомов H (или D) к кольцу урицила.

Таким образом, при γ -облучении водных растворов пиримидиновых оснований и соответствующих им нуклеотидов и нуклеозидов гидрати-

рованные электроны вносят основной вклад в образование радикалов присоединения. В первичном акте радиоллиза они захватываются молекулой основания с последующим присоединением H^+ . При низкотемпературном облучении водных растворов этот путь образования радикалов присоединения является доминирующим.

Институт физических исследований АН АрмССР,
г. Аштарак

Поступило 28.II 1978 г.

**Գ—ՃԱԻՌԱԳԱՅԹՎԱՆ ՊԻՐԻՄԻԴԻՆԱՅԻՆ ՇԻՄԲԻՐԻ ԼՈՒՄՈՒՅՑՆԵՐՈՒՄ
ՄԻԱՑՄԱՆ ՌԱԴԻԿԱԼՆԵՐԻ ԱՌԱՋԱՑՄԱՆ ԻՆԵՄԱՆԻՉՄԻ ՄԱՍԻՆ**

Հ. Ո. ԱԲԱԳՅԱՆ

ԷՊՌ մեթոդով հետազոտվել են մինչև 110°K ստանցված ծծմբական թթվի լուծույթում պիրիմիդինային հիմքերի՝ ուռացիլի և ցիտոզինի, ջրածնի և դեյտերիումի ատոմների հետ փոխազդեցությունից առաջացած ազատ ռադիկալները: Միաժամանակ հետազոտվել են γ -ճառագայթված ուռացիլի, ուրիդինի, ուրիդին- 5^- -երկֆոսֆորային թթվի ստանցված լուծույթները ծանր և հասարակ ջրի մեջ:

80°K -ում ուռացիլի, ուրիդինի և ուրիդին- 5^- -երկֆոսֆորային թթվի ջրային լուծույթներում ճառագայթման ժամանակ H ատոմները և OH ռադիկալները երկրորդական դեր են խաղում:

Մինչև 120°K պահպանվող կենտրոնների հիմնական մասը կազմում են հիմքի մոլեկուլներով կայունացված էլեկտրոնները: Ջերմաստիճանի 160 — 200°K տիրույթում այդ կենտրոնները փոխազդում են H՝ կամ D՝-ի հետ, որի հետևանքով առաջանում են ազատ ռադիկալներ, որոնց կառուցվածքը նույնանման է պիրիմիդինի օզակին H կամ D ատոմներին միացումից սուաջացած ռադիկալներին:

**THE MECHANISM OF THE FORMATION OF ADDITION
RADICALS IN γ -IRRADIATED SOLUTIONS
OF PYRIMIDINE BASES**

G. V. ABAGHIAN

The method of Electron Spin Resonance (ESR) is applied to the study and analysis transforming the paramagnetic centres into irradiated frozen solutions of urazil, uridin and uridin-5-diphosphoric acid (temperature range 80 — 250°K).

Electrons stabilized by the molecule of the base constitute the principal part of paramagnetic centres to be found in the solution after the temperature has been raised up to 120°K . At 160 — 200°K these centres recombine with H^+ or D^+ resulting in radicals that are identical in structure with those arising from the addition of H or D atoms to the pyrimidine cycle.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Schilds J., Gordy W.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., *45*, 269, 1959.
2. *Шен Пей Ген, Блюменфельд Л. А., Калмансон А. Э., Пасынский А. Г.* Биофизика, *4*, **3**, 263, 1959.
3. *Eisinger J., Shulman R. A.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., *50*, 694, 1963.
4. *Cook L. B., Wyard S.* Internat. J. Radiat. Biol. *11*, **4**, 357, 1966.
5. *Абагян Г. В., Бугагин П. Ю.* Биофизика, *14*, **5**, 785, 1969.
6. *Abaghian G. V., Buttagin P. Ju* Studia Biophysica, *15/16*, 291, 1969.
7. *Шалимон Б. Н.* ДАН СССР, *134*, 145, 1960.
8. *Бажин П. М.* и др. Кинетика и катализ, *6*, **6**, 1105, 1965.
9. *Holmes D. E., Myers L. S., Ingals R. B.* Chem. Phys., *35*, 380, 1961.
10. *Cole T.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., *51*, 1486, 1965.
11. *Herak N., Gordy W.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., *56*, **1**, 7, 1966.
12. *Holmes D. E., Ingals R. B., Myers L. S.* Internat. J. Rad. Biol., *12*, 415, 1967.
13. *Mc. Millan.* Chem. Phys. *33*, 609, 1960.
14. *Anbar M., Neta P.* Internat. J. Applated Rad. and Isotopes, *18*, 493, 1967.