

Infection titre reduction with induction increase till 0,4—0,5 Tl is caused apparently by certain contribution of anomalous Zeeman effect. Under higher induction (0,8—2,0 Tl) destabilized action of constant magnetic field should be intensified on account that side by side with Zeeman effect field orientation action on DNA protein molecules and virion in the whole becomes more substantial.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волькенштейн М. В. Физика и биология.— М.: Наука, 1981.— 165 с.
2. Бойко А. Л., Швед А. Д., Григорян Ю. А. Вплив постійного магнітного поля на вірус тютюнової мозаїки // Вісн. АН УРСР.— 1975.— № 8.— С. 26—31.
3. Nemes N., Horasova D., Szazil P. Changes in the growth of staphylophage 812 induced by a homogeneous magnetic field // Folia Fac. Sci. Nat. Univ. Park Brno.— 1983.— № 24.— P. 73—85.
4. Torbet J. Internal structural anisotropy of spherical viruses studied with magnetic birefringence // EMBO J.— 1983.— 2, N 1.— P. 63—66.
5. Девис П., Богстайн Д., Рот Дж. Генетика бактерий.— М.: Мир, 1984.— 186 с.
6. Борн М. Оптика.— М.: Изд-во ин. лит., 1960.— 550 с.
7. Поглазов Б. Ф., Серышева И. И., Абуладзе Н. К. Структура и функционирование двигательного аппарата бактериофага T4 // Успехи биол. химии.— М.: Наука, 1988.— Т. 29.— С. 122—144.
8. Дорфман Я. Г. О специфике воздействия магнитных полей на диамагнитные молекулы в растворах // Биофизика.— 1962.— № 6.— С. 733—736.
9. Марс Г., Дрансфельд К. Биомолекулы и полимеры в сильных постоянных магнитных полях // Сильные и сверхсильные магнитные поля и их применение.— М.: Мир, 1988.— С. 180—254.
10. Тихоненко Т. И. Биохимия вирусов.— М.: Медицина, 1966.— 295 с.
11. Общая вирусология / С. Лурья, Дж. Дарнеллс, Д. Балтимор, Э. Кэмпбэлл.— М.: Мир, 1981.— 670 с.

Меожотрасл. науч.-инж. центр по физике живого и микроволн. резонанс. терапии «Відгук» при КМ України, Кіев

Получено 14.05.91

УДК 547.853.7:541.651

В. Б. Пивоваров, Г. Г. Шеина

ТАУТОМЕРИЯ ИЗОЦИТОЗИНА В РАСТВОРЕ

Методом температурно-зависимой ИК-спектроскопии показано, что изоцитозин в водном и метанольном растворах пребывает в равновесии двух таутомерных форм, причем характер таутомерии для него иной, нежели для 4-оксопиримидина, молекулы которого находятся в таутомерном равновесии $N_1H \leftrightarrow N_3H$ кетоформы. Приведены аргументы в пользу таутомерии изоцитозина по типу кето-амин — кето-имин.

Введение. Природу спонтанных мутаций в ДНК хорошо объясняет нарушение уотсон-криковского спаривания нуклеотидных оснований вследствие образования ими редких таутомерных енольных и иминных форм [1]. Экспериментальному обнаружению редких таутомеров оснований и выяснению физико-химических условий их существования посвящен ряд работ. У изолированных молекул оснований ранее были обнаружены енольные таутомеры: для цитозина, изоцитозина — в матрицах отвердевших инертных газов методом ИК-спектроскопии [2—4], для урацила и тимина — в сверхзвуковых молекулярных струях методом флуориметрии [5]. В растворах выяснение таутомерных состояний оснований сопряжено со значительными трудностями в интерпретации экспериментальных данных. Так, в работе [6] методом температурного скачка в сочетании с УФ- и ИК-спектроскопией показано, что цитозин в воде присутствует в аминоксоформе, для которой характерно равновесие N_3H - и N_1H -таутомеров, сильно смещенное в сторону последнего (доля таутомера N_3H при 25 °С составляет 0,2 %). С другой стороны,

© В. Б. ПИВОВАРОВ, Г. Г. ШЕЙНА, 1992

формой существования в неполярном растворителе (хлороформ, водно-диоксановая смесь) для 3-метилцитозина является смесь аминооксоформы и иминоксоформы, причем иминоформа доминирует в неполярных растворителях, а аминоформа преобладает в водном растворе (доля иминоформы при 25 °С ~3 %). В работе [7] исследованы таутомерные состояния 1-алкиладенинов (от 1-метиладенина до 1-гептиладенина). Применяя ту же методику, что в работе [6], а также ЯМР-спектроскопию, авторы показали, что во всех случаях в неполярном окружении (ацетонитрил, диоксан, хлороформ, хлорметилен) доминирует иминоформа изучаемых молекул, причем содержание ее убывает с возрастанием полярности окружения; в водном растворе преобладает аминоформа.

В недавних работах [8, 9] предпринята попытка изучения таутомерии изоцитозина в растворах. Полученные УФ- и ИК-спектры авторы интерпретируют как суперпозиции спектров двух таутомерных форм; ими проведено сопоставление результатов эксперимента с теоретическими квантовохимическими расчетами таутомеров, которые определены ими как кето-аминные N₁H- и N₃H-формы. Такая интерпретация, по-видимому, нуждается в обосновании, поскольку данные работы [10], на которые авторы [8, 9] опираются в исходных посылках, получены для кристаллического состояния изоцитозина и не могут без дополнительного изучения быть использованы для исследования растворов.

Изоцитозин привлек наше внимание как структурный компонент капонического пуринового основания гуанина; он является аналогом минорного 6-амино-N⁵-формамидизоцитозина, на его основе синтезируется ряд противоопухолевых препаратов [11].

Материалы и методы. ИК-спектры и температурные измерения. ИК-спектры пропускания получены на спектрофотометре UR-20, «Carl Zeiss» (ФРГ) в диапазоне 1100—2000 см⁻¹ с использованием двухлучевой схемы регистрации. Для температурных измерений применены термостатированные латунные кюветы с окошками из флюорита. В качестве термостатирующей жидкости использована вода. Оптическая длина кювет—50 мкм, материал калибрующих прокладок—тефлон. Изменение оптической длины кювет после их герметизации было учтено по изменению интерференционной картины и не превышало 5 %. Диапазон варьирования температуры водных растворов—21—98 °С; регистрацию температуры, а также сопоставление температуры в кювете образца с температурой кюветы сравнения проводили с помощью медь-константановой термопары (точность измерения температуры в ходе эксперимента не хуже 0,1 °С).

Экспериментальные и расчетные характеристики колебательных спектров исследованных

i Cyt		D-i Cyt						4-OD-Pyr					
Кето-амин, изолированное состояние, расчет [4]		D ₂ O				CH ₃ OD, 24 °С		D ₂ O				CH ₃ OD, 22 °С	
		25 °С		98 °С		ν	D	27 °С		97 °С		ν	D
		ν	I, %*	ν	D			ν	D	ν	D		
—	—	—	—	—	—	1670 пл.	0,07	1658	0,11	1656	0,14	1668	0,49
1742	100	1632	0,17	1632	0,17	1642	0,12	1632	0,2	1632	0,15	1632	0,21
1709	83	1572	0,11	1572	0,09	—	—	1575	0,07	1575	0,06	1580	0,07
1631	93	1555	0,11	1555	0,14	1568	0,19	—	—	—	—	—	—
1607	74	1512	0,14	1518	0,11	1528	0,07	1520	0,06	1520	0,09	1516	0,18
1583	14	1460	0,06	1458	0,04	1465	0,07	1465	0,14	1465	0,14	—	—
1459	59	1414	0,03	1415	0,02	1390	0,10	—	—	—	—	1408	0,04

* За 100 % принята величина наиболее интенсивного колебания расчетного спектра.

Вещества. В работе использованы без дополнительной очистки: изоцитозин («Sigma», США), 4-оксопиримидин («Aldrich», США), 2-оксопиримидин («Chemapol», ЧСФР) и дважды перекристаллизованный 2-аминопиримидин производства Олайнского завода химреактивов. Для дейтерирования оснований применена тяжелая вода, она же и дейтерометанол CH_3OD (П/О «Изотоп», Ленинград) использованы для получения растворов исследуемых веществ. Дейтерирование проводили нагреванием с последующей низкотемпературной отгонкой паров тяжелой воды. Перед растворением в дейтерометаноле продейтерированные вещества сушили в вакууме над фосфорным ангидридом.

Все описанные в работе температурно-зависимые изменения в спектрах обнаружили обратимый характер. Наблюдаемые в ходе эксперимента изменения спектральной интенсивности ($\geq 7\%$ пропускания) ощутимо выше приборной погрешности регистрации пропускания ($\pm 1\%$ в диапазоне 20–80% интенсивности).

Результаты и обсуждение. Спектральные характеристики для изученных веществ в полярных растворителях (воде и метаноле) представлены в таблице. Анализ полученных спектров и сопоставление их с литературными данными [12] позволяют сделать отнесение полос поглощения. Наиболее высокочастотные полосы в спектрах водных растворов дейтеронизоцитозина (D-iCyt): 1632 см^{-1} ; дейтеро-4-оксопиримидина (4-OD-Pyr): расщепление 1632 и 1658 см^{-1} ; дейтеро-2-оксопиримидина (2-OD-Pyr): 1643 см^{-1} — относятся к колебаниям карбонильной группы ($\nu\text{C}=\text{O}$). Область волновых чисел 1400–1600 см^{-1} для всех соединений соответствует таковой валентных колебаний кольца; отсутствие полос νNH_2 объясняется использованием дейтероаналогов. Как видно из таблицы, наблюдается хорошее согласие по числу полос колебаний кольца и их значениям частот с расчетными характеристиками для изолированных молекул [4].

Сопоставление спектральных характеристик для D-iCyt с данными для 4-OD-Pyr и дейтеро-2-аминопиримидина (2-ND₂-Pyr) в D₂O при комнатной температуре позволяет считать спектр D-iCyt в значительной степени суммой спектров 4-OD-Pyr и 2-ND₂-Pyr, что является следствием наличия в молекуле D-iCyt как оксогруппы по 4-му положению, так и аминогруппы по 2-му положению. Отличительными особенностями спектра D-iCyt являются, во-первых, полоса 1555 см^{-1} , отсутствующая в спектрах обоих модельных соединений, и, во-вторых, отсутствие расщепления полосы $\nu\text{C}=\text{O}$ по сравнению со спектром 4-OD-Pyr.

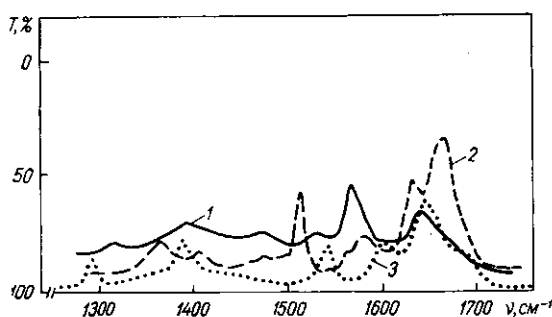
Для метанольного спектра D-iCyt (рис. 1) характерен незначительный ($\Delta\nu \sim 10 \text{ см}^{-1}$) высокочастотный сдвиг полос кольца; у полосы $\nu\text{C}=\text{O}$ появляется высокочастотное плечо 1670 см^{-1} . Расщепление

соединений

2-ОН-Пур		2-OD-Пур						2-NH ₂ -Пур		2-ND ₂ -Пур			
Кетон, изолированное состояние, расчет [4]		D ₂ O				CH ₃ OD, 23 °C		Амин, изолированное состояние, расчет [4]		D ₂ O			
		23,5 °C		98 °C		ν	D			21,5 °C		98 °C	
		ν	D	ν	D					ν	D	ν	D
—	—	—	—	—	—	1688 пл.	0,08	—	—	—	—	—	—
1737	59	1643	0,26	1643	0,26	1645	0,21	—	—	—	—	—	—
1631	38	1602	0,19	1603	0,16	1603	0,11	—	—	1605	0,15	1602	0,15
1595	21	1553	0,08	1552	0,08	1543	0,09	1577	154	1572	0,14	1570	0,15
1538	43	—	—	—	—	—	—	1550	3	1500	0,18	1497	0,17
1439	64	—	—	—	—	—	—	1484	17	1450 пл.	0,09	1450 пл.	0,1
—	—	1390	0,06	1390	0,07	1387	0,11	1440	31	1370	0,03	1370	0,02

$\nu_{\text{C=O}}$ для 4-OD-Пуг увеличивается по сравнению со спектром водного раствора и достигает 36 см^{-1} . Полоса 1555 см^{-1} водного спектра D-Cyt, не имевшая соответствия в спектрах модельных соединений, в метанольном растворе сдвигается в область высоких частот (1568 см^{-1}) и становится самой интенсивной полосой спектра. Интенсивность соседней высокочастотной полосы при переходе от воды к метанолу сильно падает: она превращается в слабое высокочастотное плечо полосы 1568 см^{-1} .

На рис. 2 представлены температурные изменения ИК-спектров водных растворов изученных соединений. При повышении температуры



для D-iCyt наблюдается увеличение интенсивности полосы 1555 см^{-1} и снижение интенсивности соседней полосы 1572 см^{-1} . В спектре

Рис. 1. Спектры в дейтерометаноле (CH_3OD): D-iCyt (1); 4-OD-Пуг (2); 2-OD-Пуг (3). Здесь и на рис. 2 концентрации веществ в растворах не превышают $7 \cdot 10^{-2}$ моль/л

4-OD-Пуг происходит перераспределение интенсивностей расщепленных полос карбонильной группы в сторону роста интенсивности высокочастотной полосы 1656 см^{-1} ; при этом суммарная интенсивность остается неизменной. Для 2-OD-Пуг и 2-ND₂-Пуг характерно практически полное отсутствие спектральных изменений с ростом температуры. Поскольку молекула 2-OD-Пуг имеет симметрично расположенные N₁- и N₃-места присоединения протона, то для нее причины возможных спектральных изменений принципиально не могут быть связаны с таутомерными переходами. Так как в наших опытах с 2-OD-Пуг спектры независимы от температуры, то это позволяет заключить, что эффекты, сопутствующие повышению температуры раствора, а именно: разрушение ассоциатов молекул азотистого основания с молекулами воды и разрушение автоассоциатов, не проявляются в условиях нашего эксперимента. Этот вывод справедлив по крайней мере до концентрации 2-OD-Пуг в воде $7 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Авторами [13], работавшими с водными растворами нуклеотидов канонических оснований, получен аналогичный вывод: повышение концентрации (а, значит, и степени автоассоциации) исследованных веществ от $1 \cdot 10^{-2}$ до $7 \cdot 10^{-2}$ моль/л не влияет на температурные изменения ИК-спектров. Это означает, что спектральные изменения в случаях D-iCyt и 4-OD-Пуг не связаны с эффектами ассоциации и автоассоциации, а обусловлены иными причинами.

Известно, что в молекулах пиридинных азотистых оснований при наличии в их структуре C=O-, N-H-, NH₂-групп теоретически возможны три типа таутомерных переходов (рис. 3): кето-енол, N₁H ↔ ↔ N₃H и амин-имин. Вследствие того, что молекула 4-OD-Пуг не содержит аминогруппы, для нее принципиально возможны лишь кето-енольные и N₁H ↔ N₃H-переходы. Поскольку суммарная интенсивность расщепленных полос $\nu_{\text{C=O}}$ для 4-OD-Пуг в ходе нагрева постоянна, то неизменно и содержание в растворе кетонной формы вещества, то есть кето-енольного перехода не наблюдается. Единственной причиной спектральных изменений в данном случае является, очевидно, таутомерия типа N₁H ↔ N₃H. Характер температурных спектральных изменений для D-iCyt иной, чем для 4-OD-Пуг. Это позволяет исключить из причин этих изменений в случае D-iCyt переходы N₁H ↔ N₃H; неизменность интенсивности $\nu_{\text{C=O}}$ свидетельствует об отсутствии кето-енольной таутомерии. Единственной возможной причиной наблюдаемых изменений в области колебаний кольца, таким образом, является таутомерия типа амин-имин.

В CH_3OD ($\epsilon_{\text{CH}_3\text{OD}}^{25} \sim 33$), как в растворителе существенно менее полярном, чем D_2O ($\epsilon_{\text{D}_2\text{O}}^{25} = 78,3$), преобладающей должна быть таутомерная форма *D-iCyt* с более низким значением дипольного момента молекулы. В соответствии с расчетными данными [4], для изолированной формы молекулы изоцитозина: $\mu_{\text{амина}}^{\text{кето}} = 3,79$ Д, $\mu_{\text{имины}}^{\text{кето}} = 2,79$ Д. Известно, что в ИК-спектре присутствие ими́на сопровождается наличием частоты 1660 см^{-1} , характерной для экзоциклической группы $\text{C}=\text{N}$ [6]. Для *D-iCyt* в метаноле широкая полоса 1642 см^{-1} с плечом

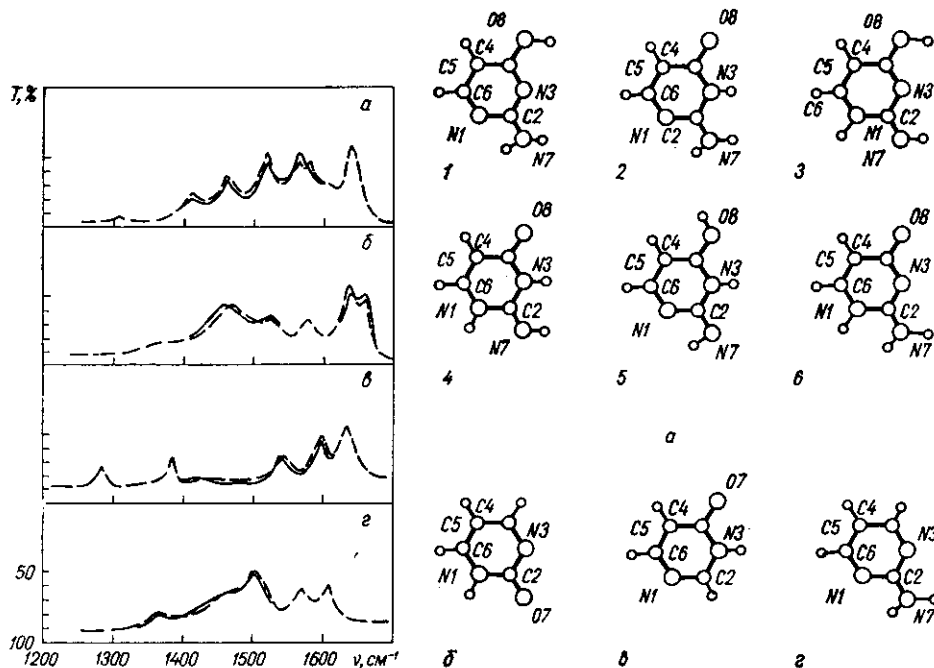


Рис. 2. Зависимости спектров водных (в D_2O) растворов изученных соединений от температуры: *a* — *D-iCyt*; *б* — 4-OD-Пуґ; *в* — 2-OD-Пуґ; *г* — 2-ND₂-Пуґ. Спектры, снятые при комнатной температуре, обозначены штриховой линией, при температурах 98 (*a, в, г*) и 97 °С (*б*) — сплошной

Рис. 3. Формулы изученных соединений: *a* — возможные таутомерные формы изоцитозина (1 — енол-амин; 2 — кето-амин, N_3H ; 3 — енол-имин, N_1H ; 4 — кето-имин, N_1H , N_3H ; 5 — енол-имин, N_3H ; 6 — кето-амин, N_1H); *б* — 2-оксопиримидин; *в* — 4-оксопиримидин; *г* — 2-аминопиримидин

1670 см^{-1} , вероятно, обусловлена вкладом в поглощение наряду с $\nu\text{C}=\text{O}$ валентного колебания группы $\text{C}=\text{N}$ (экзо). С учетом этого более высокой температуре водного раствора и переходу от воды к метанолу, по-видимому, соответствует повышение концентрации редкой ими́нной формы молекул *iCyt*.

Резюме. Для виявлення рідкісних таутомерних форм ізоцитозину (*iCyt*) в розчинах та виявлення фізико-хімічних умов їх існування досліджено температурні зміни коливальних спектрів водних розчинів *iCyt* та його модельних сполук в діапазоні 23—98 °С; одержано ІК-спектри метанольних розчинів цих речовин. На основі проведеного аналізу спектрів та співставлення з літературними даними зроблено висновок про таутомерну рівновагу *iCyt* по типу кето-амин—кето-імін. Аргументом на користь зростання концентрації рідкісної іміної форми з підвищенням температури розчину є міркування про енергетичну вигідність існування в менш полярному оточенні таутомеру з меншим дипольним моментом.

Summary. Studies on temperature changes in vibrational spectra of aqueous solutions of isocytosine (*i-Cyt*) and its model compounds in the range from 23 °C to 98 °C are aimed at revealing rare tautomeric forms of *i-Cyt* in solutions and at clearing up phy-

sicochemical conditions of their existence. IR-spectra of methanol solutions of the above compounds are obtained. Spectral analysis and comparison between results obtained and literature data allow to conclude that tautomeric equilibrium of *i*-Cyt is of keto-amine—keto-imine type. The supposition of the energetic advantage of the existence of the tautomer with lesser dipole moment due to the lesser polar environment gives an argument for the increase of the rare imine form concentration at the increase of the solution temperature.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.— М.: Мир, 1987.— 584 с.
2. *Experimental* and theoretical studies of molecular structure features of cytosine/ E. D. Radchenko, G. G. Sheina, N. A. Smorygo, Yu. P. Blagoi // *J. Mol. Struct.*— 1984.— **116**.— P. 387—396.
3. *Инфракрасные спектры и таутомерия изоцитозина в аргоновой матрице* / С. Г. Степаньян, Г. Г. Шенна, Е. Д. Радченко, Ю. П. Благой // *Журн. физ. химии.*— 1989.— **63**, № 11.— С. 3008—3014.
4. *MNDO* and IR spectroscopic studies of tautomerism of isocytosine / S. G. Stepanian, E. D. Radchenko, G. G. Sheina, Yu. P. Blagoi // *J. Mol. Struct.*— 1990.— **216**.— P. 77—90.
5. *Keto-enol* tautomer of uracil and thymine / Y. Tsuchija, T. Tamura, M. Fujii, M. Ho // *J. Phys. Chem.*— 1988.— **92**.— P. 1760—1765.
6. *Tautomerism* in cytosine and 3-methylcytosine. A thermodynamic and kinetic study / M. Dreyfus, O. Bensaude, G. Dodin, I. E. Dubois // *J. Amer. Chem. Soc.*— 1976.— **98**, N 20.— P. 6338—6349.
7. *Tautomerism* of purines. 2. Amino-imino tautomerism in 1-alkyl-adenines / M. Dreyfus, G. Dodin, O. Bensaude, I. E. Dubois // *Ibid.*— 1977.— **99**, N 21.— P. 7027—7037.
8. *Квантовохимическое и УФ-спектроскопическое исследование изоцитозина* / С. Г. Семенов, А. А. Тулуб, А. И. Стеценко, Е. К. Скалецкий // *Журн. общ. химии.*— 1988.— **58**, № 4.— С. 901—905.
9. *Спектроскопическое и квантовохимическое исследование изоцитозина* / А. А. Тулуб, С. Г. Семенов, А. И. Стеценко, Е. Е. Юдович // *Теор. и эксперим. химия.*— 1988.— № 1.— С. 29—36.
10. *Sharma B. O., McConnel I. E.* The crystal and molecular structure of isocytosine // *Acta crystallogr.*— 1965.— **19**, N 5.— P. 797—806.
11. *Platinum (II) complexes with aminopyrimidines* / K. I. Yakovlev, A. I. Stetzenko, A. A. Tulub et al. // 5th Int. symp. on platinum and other coordination compounds in cancer chemotherapy (Padua, 29 Jun.— 2 Jul. 1987).— Padua, 1987.— P. 361—362.
12. *Беллами Л.* Инфракрасные спектры сложных молекул.— М.: Изд-во иностр. лит., 1963.— 590 с.
13. *Conserved* unpaired adenine residues are important for ordered structures of 5S ribosomal RNA / S. Böhm, S. Yu. Venyaminov, H. Fabian et al. // *J. Biochem.*— 1985.— **147**.— P. 503—510.

Физ.-техн. ин-т низких температур АН Украины,
Харьков

Получено 03.07.91

УДК 577.3:547.963.3

Е. Б. Круглова

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОВЕДЕНИЯ РАСТВОРОВ ДНК В ВОДЕ И ПРИ НИЗКИХ ИОННЫХ СИЛАХ

С помощью УФ-спектроскопии изучены концентрационные зависимости гиперхромного эффекта растворов ДНК с разным составом пар оснований в воде. Показано, что в воде и при низких ионных силах протонизация ДНК начинается с АТ-пар. Получены значения констант протонизации АТ-пары K_1 в зависимости от концентрации противоионов. Проведено сравнение K_1 с константой протонизации GC-пар ДНК K_2 при разных ионных силах. Обсуждаются ранее полученные экспериментальные данные на основе предложенного механизма протонизации.

Введение. Исследование влияния ионной силы и pH растворов на процессы комплексообразования ДНК с биологически активными веществами, ионами щелочноземельных и переходных металлов имеет важное

© Е. Б. КРУГЛОВА, 1992