

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ И НЕФТЕХИМИИ

на правах рукописи

ШЕИНА ГАЛИНА ГРИГОРЬЕВНА

УДК 577.1; 577.3;
548.75; 541:623

ПРОТОТРОПНАЯ ТАУТОМЕРИЯ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ
ОСНОВАНИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

02.00.10 - Биоорганическая химия, химия природных и физиологически
активных веществ

03.00.02 - Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени доктора химических наук
в форме научного доклада

Киев - 1992



Робота виконана в Фізико-технічному інституті

ім. Б.І.Верківець

О ф и ц и а л ь н ы е о п п о н е н т ы :

доктор химических наук, профессор

Е.В.Титов

доктор химических наук, профессор

Л.М.Роєв

доктор химических наук, в.н.с.

В.И.Брусков

В е д у щ а я о р г а н и з а ц и я :

Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского

Российской Академии Наук

Защита состоится " 9 " О К Т Я Б Р Я 1992, в "10" час, на
заседании специализированного совета Д.016.65.01 при Институте
Биоорганической химии и нефтехимии АН Украины (253160, г. Киев,
Харьковское шоссе, 50).

Диссертация (в форме научного доклада)

разослана " 4 " сентября 1992 г.

Ученый секретарь

специализированного совета

Д.М.Федоряк

Актуальность проблемы. Проблема прототропной таутомерии нуклеотидных оснований связана с пониманием метаболизма нуклеиновых кислот и сохранения генетической информации как источника развития живой материи. Пиримидиновые и пуриновые нуклеотидные основания имеют большее количество протоноакцепторных центров (N, O), чем число подвижных протонов. В зависимости от физических характеристик среды могут реализовываться различные таутомеры. Исследование таутомерии оснований в твердом теле не отражает истинных возможностей молекул, так как в кристаллах определенная молекулярная структура формируется характером водородных связей и силовым полем кристаллической решетки (Rich, 1970). В воде, в силу высокой диэлектрической проницаемости среды в соответствии с моделью Онзагера (1936), индуцируются таутомеры с высоким значением дипольного момента (Сухоруков, 1964). Для биоорганических молекул, в частности, ДНК, белков, нуклеопротеидных комплексов, экспериментальные значения ϵ составляют ~ 2 (Шеголева, 1983), теоретические оценки дают $\sim 2-5$ (Волькенштейн, 1975). Энергии стабилизации для различных таутомеров нуклеотидных оснований в условиях низких и высоких значений ϵ среды рассчитаны современными квантовохимическими методами (Katritzky, 1991). Несмотря на совершенствование расчетных методик и прогресс вычислительной техники, величины относительных энергий прототропных таутомеров имеют приближенные значения, поэтому полученные ряды стабильности таутомеров требуют экспериментального подтверждения. Исследования таутомерии оснований в растворах нейтральных растворителей затруднены в связи с низкой растворимостью соединений, изучение в газовой фазе почти невозможно вследствие термолабильности веществ на фоне высоких значений теплот сублимации. Развиваемый в последние годы экспериментальный метод, соединяющий преимущества газовой фазы и нейтрального окружения – метод изоляции молекул в матрицах инертных газов при низких температурах – позволяет получить оптимальные условия для изучения прототропной таутомерии нуклеотидных оснований. В настоящее время в литературе исследованиями таутомерии оснований в растворах и кристаллах различными физическими методами (ЯМР, ИК, КР, УФ спектроскопии, нейтроно- и рентгенографии) установлено, что предпочтительной таутомерной формой является лактам-аминная, доля имино и енольных таутомеров составляет менее 0.01%. Теоретическими предпосылками для дальнейших исследований редких таутомеров

являются данные квантовохимических расчетов (Buda, 1983; Norinder, 1987; Kwiatkowski, 1989 и др.) относительных стабильностей различных таутомерных форм, предсказывающих преимущественную стабильность amino-енольных форм либо равную вероятность нескольких типов структур.

Цель исследования состояла в экспериментальном обнаружении различных прототропных таутомеров нуклеотидных оснований, предсказанных теоретически, а также в изучении их физико-химических свойств, моделирующих взаимодействие оснований с биологически активными агентами на молекулярном уровне.

Основные задачи работы:

1. Получить спектральную информацию в ИК, УФ диапазоне для изолированных молекул нуклеотидных оснований и их модельных соединений в инертном окружении твердого аргона.

2. Произвести интерпретацию колебательных спектров в рамках группового функционального анализа и решения колебательной задачи.

3. Установить спектральные характеристики прототропных таутомеров пуриновых и пиримидиновых оснований и изучить механизм образования редких форм.

4. Исследовать особенности прототропной таутомерии оснований при межмолекулярных взаимодействиях в процессе гидратации и автоассоциации.

5. Изучить структуру оснований, модифицированных заместителями (биологически активные соединения) и их свойства в образовании прочных водородных связей.

6. Показать, что при взаимодействии с сильными электроноакцепторами пуриновые и пиримидиновые основания образуют комплексы с переносом заряда и ион-радикальные соли.

Научная новизна. Обнаружена способность нуклеотидных оснований к таутомерным превращениям. Реакция осуществлялась в насыщенных парах оснований в ячейке Кнудсена в температурном интервале 100 - 250°С. Применяемый метод зондирования таутомерной системы - ИК спектроскопия замороженной газовой фазы в аргоновых матрицах - позволил идентифицировать продукты реакции. Впервые экспериментально наблюдались редкие amino-енольные формы таутомеров гуанина, цитозина, изоцитозина, гипоксантина, находящиеся в равновесии с keto-аминными формами изученных соединений. Измеренные значения констант таутомерного равновесия свидетельствуют, что кетонные и енольные формы находятся в равных соотношениях, либо

равновесие значительно сдвинуто в сторону amino-енольных форм. Урацил и тимин обладают стабильной дикетонной структурой и не образуют других таутомеров. Введение заместителей в 5-, 6-положения урацила также не приводит к образованию енольных форм, как это постулировалось Watson (1976). Однако, под влиянием заместителей значительно изменяются протондонорные свойства соединений и, как следствие, способность к образованию с основаниями прочных водородных связей с переносом протона. Показано, что нуклеотидные основания однозначно обладают свойством образования комплексов с переносом заряда. Предложен механизм образования amino-енольных таутомеров через синхронный перенос протона посредством двух водородных связей димеров в газовой фазе. Все перечисленные выше результаты получены впервые.

Ряд полученных нами данных по наблюдению amino-енольных форм оснований были подтверждены исследованиями зарубежных авторов и цитируются в оригинальных работах различных научных центров: Person, W., Szczepaniak, K., et al, 1989-1991, University of Florida, USA; Nowak, M., 1990, 1991, Institute of Physics, Warsaw; Kwiatkowski, J., 1988-1991, Nicolas Copernicus University, Torun, Poland; Zeegers-Huyskens, T., 1990, Catholic University of Leuven, Belgium и другие. Работы по комплексам с переносом протона цитируются в монографии под ред. Ratajczak, H., Orville-Thomas, W., "Molecular interactions", 1981. Все опубликованные нами работы по спектральным и структурным данным пиримидиновых и пуриновых оснований в инертных отвердевших газах вошли в библиографическое издание по матричной изоляции, 1954-1985 г.г., 1988, под ред. Ball, D., Kafafi, Z. et al., Houston, Texas, а также в "Банки и базы данных по строению и свойствам веществ", Новосибирск, 1990-1991.

Практическая ценность работы. Получение и наблюдение в матрицах аргона редких енольных таутомеров оснований нуклеиновых кислот имеет принципиальное практическое значение. В частности, при изучении химических и физических констант различными методами, например, потенциалов ионизации, электронного сродства, а также различных типов межмолекулярных комплексов и ион-молекулярных реакций в газовой фазе, необходимо учитывать, что во всех процессах участвуют минимум две равновероятные структуры. Реальное существование гуанина и гипоксантина в енольных формах и дальнейшая разработка их функции на молекулярном уровне в биосистемах станет возможной в результате настоящей работы. Можно высказать следующие

соображения по поводу роли енольных форм. Пары гуанин-урацил, реально существующие в составе большинства транспортных РНК, могут образовываться через две водородные связи гуанина в енольной форме и урацила в кетонной, что по стабильности не уступает уотсон-криковским аденин-урацил парам. Таким образом, причиной некомплементарного спаривания гуанина с тимином может быть переход гуанина в енольную форму и, как следствие, ошибки репликации, чем можно объяснить имеющиеся в биологии факты, по которым участки генома, обогащенные гуанин-цитозин парами наиболее подвержены мутациям (Freese, 1963; Drake, 1966). Способность нуклеотидных оснований образовывать комплексы с переносом заряда и с переносом протона может быть использована для конструирования лекарственных веществ противоопухолевого, антибактериального, противовирусного спектра действия.

Апробация работы и публикации. Материалы работы докладывались и обсуждались на 3,4,5,6,7 Всесоюзных конференциях по спектроскопии биополимеров, Харьков, 1977, 1981, 1984, 1988, 1991; Всесоюзном симпозиуме по водородной связи, Харьков, 1977; на 4 и 5 Советско-польских симпозиумах по водородной связи, Москва, 1985, Черновцы, 1989; на 3 Всесоюзном совещании по комплексам с переносом заряда и ион-радикальным солям, Рига, 1976; на 13 и 19 Европейских конгрессах по молекулярной спектроскопии, Вроцлав, 1977, Дрезден, 1989; на Всесоюзных семинарах "Фотоника органических молекул и модельных соединений", Ленинград, 1978, 1980, 1982, 1986, 1988; на Всесоюзном симпозиуме "Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов", Рига, 1982; на Всесоюзном биофизическом съезде, Москва, 1982; на Международной конференции по квантовой химии, биологии и фармакологии, Киев, 1978; на симпозиумах стран СЭВ по биофизике нуклеиновых кислот и белков, Таллин, 1981, Фридрихсроде, 1980, Брно, 1985; на Международной конференции "Лазерная спектроскопия биологических объектов", Прага, 1986; на 6 и 7 Всесоюзных симпозиумах "Конформационные изменения биополимеров в растворах", Тбилиси, 1985, 1990; на 2, 3, 4, 5 Всесоюзных совещаниях по химии низких температур, Москва, 1982, 1985, 1988, 1991; на Международной конференции "Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины", Харьков, 1988; на 7 Всесоюзном симпозиуме по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул, Новосибирск, 1990.

Содержание работы отражено в 51 опубликованной статье.

ЧАСТЬ 1. ТАУТОМЕРИЯ ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ

[21, 23-28, 40, 41, 43, 45, 50, 51]

В настоящей работе использован метод матричной изоляции молекул, разработанный Pimentel (1957) для изучения спектров простых молекул (NH_3 , H_2O). По мере совершенствования техники низких температур за последнее десятилетие этот метод в мировой практике используется для изучения структуры и реакционной способности органических соединений, их нестабильных радикалов. На Украине метод матричной изоляции получил развитие в Физико-техническом институте низких температур АН Украины в биофизических и оптических исследованиях. Суть метода: при совместной конденсации паров исследуемого вещества и инертного газа на охлажденной оптической подложке образуется замороженная газовая фаза, которая может быть изучена различными физическими методами: ИКС, СКР, УФ, ЭПР спектроскопии. Особенно эффективно использование ИК спектроскопии. Слабое взаимодействие органических молекул с инертным газом снижает неоднородное уширение колебательных полос, жесткая фиксация молекул в матрице при низких температурах снимает вращательные степени свободы, в результате чего происходит сужение колебательных полос, спектр имеет почти линейчатый характер, что открывает дополнительные возможности для изучения структурных особенностей молекул.

В нашем эксперименте использовался гелиевый криостат производства ФТИНТ АН Украины с оптической приставкой, оснащенной блоком испарителей (ячейка Кнудсена) и низкотемпературными кварцевыми микровесами для измерений интенсивностей молекулярных потоков исследуемых веществ и матричного газа (Радченко, 1981). Спектры поглощения регистрировались с помощью ИК спектрометра "Specord 75 IR" (Zeiss, Jena), УФ спектрометра "Hitachi M 356" (Япония), отдельные образцы записаны на фурье-спектрометре "Bruker IFS-113v". Частоты и интенсивности нормальных колебаний вычислялись в рамках приближения валентно-силового поля, (Грибов, Дементьев, 1981).

1.1. Кето-енольная таутомерия оксо-, amino-пиримидинов.

Высокоинформативные ИК спектры пиримидиновых оснований в

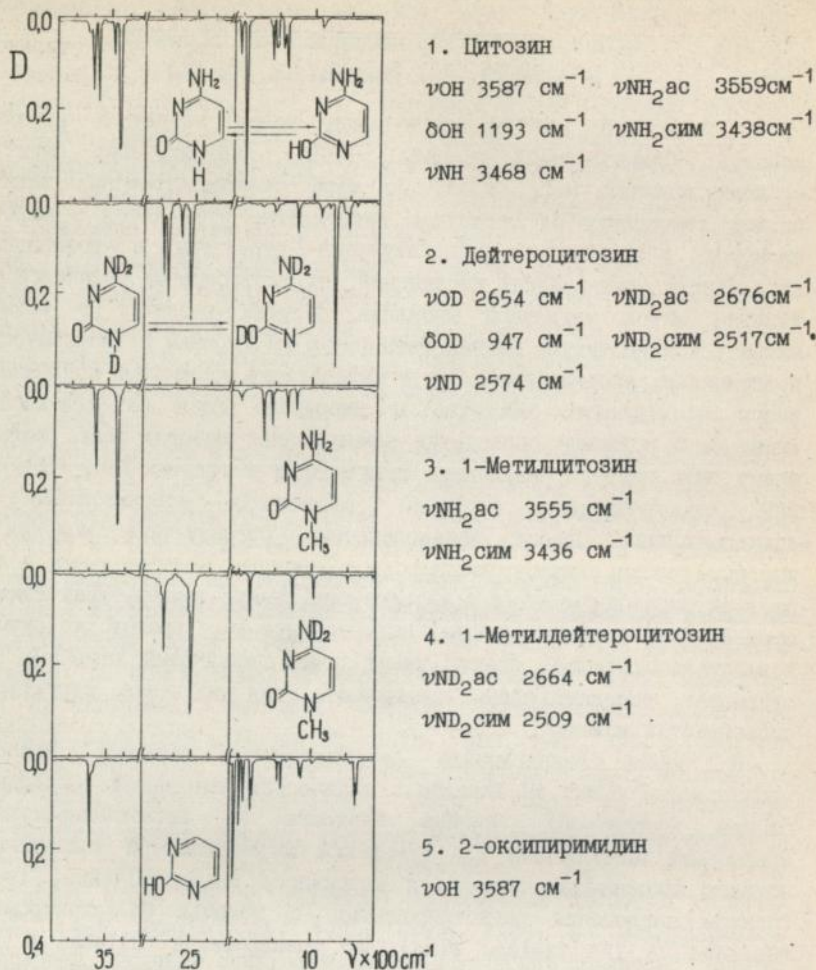


Рис. 1.1.1. Валентные и деформационные колебания amino и окси групп пиримидиновых оснований.

матрицах аргона выгодно отличаются от известных в литературе. На рис. 1.1.1 при 11 К представлены спектры цитозина, его метильного производного, дейтерозамещенных этих соединений и 2-оксопиримидина. Обработка спектров простым методом функционально-группового анализа дала возможность впервые идентифицировать интенсивную полосу поглощения OH группы ν 3587 см^{-1} (ν OD 2574 см^{-1}) с соответствующим ей деформационным колебанием δ OH 1193 см^{-1} (δ OD 947 см^{-1}). Одновременно наблюдались полосы ν N₁H 3468 см^{-1} и ν C=O 1714 см^{-1} , характерная для поглощения карбонила. Амино группы цитозина и изоцитозина имеют характеристические полосы симметричного и асимметричного ν NH₂ колебания. Однозначность отнесения полос колебаний групп, имеющих подвижные протоны подтверждается характерным изотопным сдвигом частот пропорционально $\sim \sqrt{2}$. Константы таутомерного равновесия, рассчитанные из пиковых интенсивностей [$K=I(\text{OH})/I(\text{NH})$, для цитозина $K=2$, изоцитозина $K=4$], показывают, что в газовой фазе в равновесии находятся amino-кетонная и amino-енольная формы соединений. Отсутствие полосы поглощения имино группы, свидетельствуют о том, что в газовой фазе не образуются имино- таутомеры. Таким образом, при температурах испарения цитозина (175– 200°C) и изоцитозина (195°C) и давлении насыщенных паров превалирует кето-енольное равновесие. Как показали данные квантовохимических расчетов для изолированных молекул цитозина [Breen, Flurry (1971), Goddard et al (1975), Buda, Sygula (1983), Norinder (1987), Kwiatkowski (1989)] относительная стабильность енольных форм выше кетонных, аминных – выше иминных (рис. 1.1.2.). Однако известно, что в растворах и кристаллах энергетически выгодные енольные таутомеры не удалось обнаружить. Аномальная температурная зависимость полученная нами для полос колебаний изоцитозина в D₂O предполагает перестройку химических связей в цикле, что согласуется со сдвигом таутомерного равновесия.

Традиционное использование УФ спектроскопии для изучения нуклеотидных оснований в случае матричной изоляции несет дополнительную информацию об электронных переходах прототропных таутомеров. Главной отличительной особенностью является хорошо выраженная колебательная структура УФ спектров пиримидиновых оснований. Новым результатом является получение значений частот чисто электронных (0-0) переходов: 32260 и 36150 см^{-1} , относящихся к первой π^* полосе соответственно кетонного и

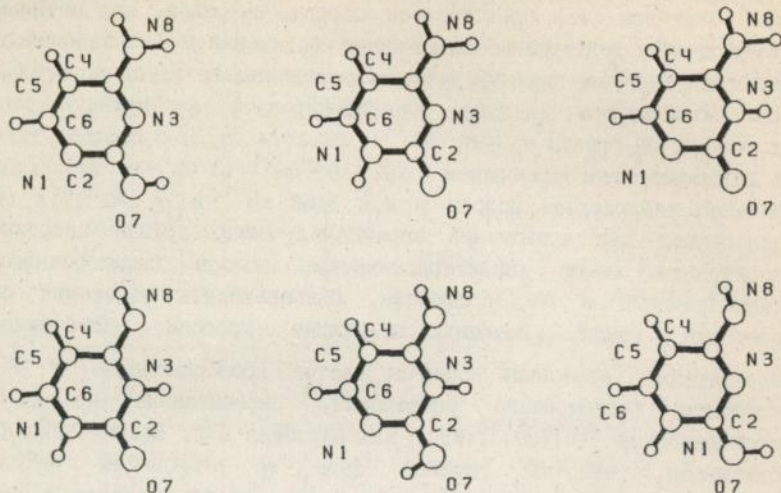


Рис. 1.1.2. Вероятные прототропные таутомеры цитозина в порядке понижения стабильности (Gould I.R., Hillier I.H., 1989).

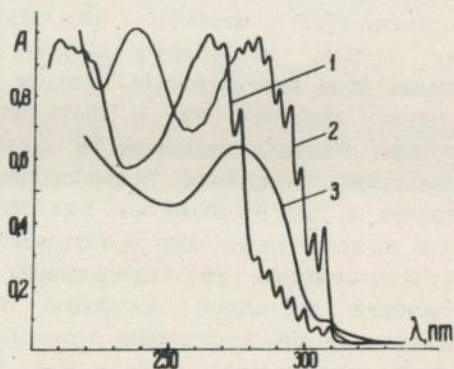


Рис. 1.1.3. УФ спектры цитозина (1), 1-метилцитозина (2) в аргонной матрице и цитозина в твердой фазе (3).

енольного таутомеров цитозина (рис. 1.1.3). 1-Метилцитозин, моделирующий нуклеотид цитидин, находится в фиксированной кето-аминной форме, чисто электронный переход которого 32500 см^{-1} . Урацил (O-O переход 36170 см^{-1}) и тимин (O-O переход 35490 см^{-1}) имеют слабовыраженную колебательную структуру с одним O-O переходом, что свидетельствует об одном типе таутомеров. Понятно, что значения максимумов огибающей электронно-колебательной полосы (растворы, твердые образцы) носят относительный характер и не могут быть использованы так же эффективно, как O-O переходы для идентификации таутомеров. Таким образом, на основании найденных значений ИК частот валентных и деформационных полос поглощения OH, NH, NH₂ групп цитозина, 1-метилцитозина, 2-оксипиримидина, их дейтероаналогов, а также значений чисто электронных переходов изученных молекул установлено, что в замороженной газовой фазе наблюдается равновесие кето-аминных и аминокето-енольных форм с одинаковым соотношением или с преимуществом енольных таутомеров в отличие от растворов и конденсированного состояния, где обнаружены только кето-аминные формы - 99.99% (Pullman, 1962; Сухоруков, 1964; Katritzky, 1966; Полтев, 1971; Wong, 1973 и др.)

1.2. Колебательные характеристики кето-аминных и аминокето-енольных таутомеров.

В связи с тем, что отсутствует возможность выделить редкие енольные таутомеры с целью изучения их молекулярных характеристик, нами использованы экспериментальные данные, полученные для смеси таутомеров в матрице аргона. Для расчета колебательных спектров использовались естественные координаты, представляющие собой изменения длин связей по отношению к равновесным длинам связей, изменения валентных углов, изменения углов между связями и плоскостями и двугранных углов между плоскостями, проведенными через тройки атомов в молекуле. Расчеты выполнялись в гармоническом приближении полуэмпирическим методом (Грибов, Дементьев, 1981). В связи с отсутствием прямых данных о силовых полях как енольных, так и кетонных форм на первом этапе была решена обратная спектральная задача для вспомогательных соединений (2-амино; 2-окси; 4-оксипиримидины), моделирующих нуклеотидные основания. При переносе силовых полей из модельных соединений в более сложные структуры проводилась коррекция силовых постоянных растяжения связей, основанная на зависимости "силовая постоянная связи - π порядок

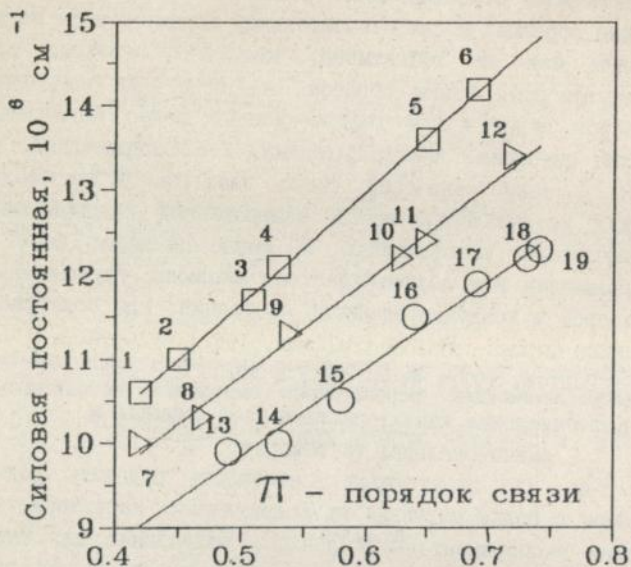
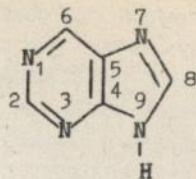
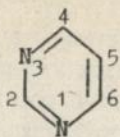


Рис. 1.2.1. Зависимости силовых постоянных связей С-С (o), С-N (Δ) и С=O (□) от π -электронных порядков связей пуриновых и пиримидиновых оснований.

NN	СВЯЗЬ	СОЕДИНЕНИЕ	NN	СВЯЗЬ	СОЕДИНЕНИЕ
1	C2-O2'	цитозин енол	11	C8=N9	гуанин кетон
2	C6-O6'	гипоксантин енол	12	C6=N6'	аденин имин
3	C4-O4'	4-гидроксипиримидин	13	C4-C5	урацил
4	C2-O2'	2-гидроксипиримидин	14	C5-C6	гуанин кетон
5	C4-O4'	урацил	15	C4-C5	аденин
6	C2-O2'	урацил	16	C4-C5	пиримидин
7	C4-N4'	цитозин кетон	17	C5=C6	цитозин кетон
8	C2-N2'	гуанин кетон	18	C5=C6	тимин
9	N1-C2	пиримидин	19	C5=C6	урацил
10	C8=N9	аденин			

связи" (рис. 1.2.1). Корректность проведенной интерпретации экспериментальных спектров подтверждается рассчитанными значениями интенсивностей нормальных колебаний. Рассмотрим наиболее сложную область спектра $2000-400 \text{ см}^{-1}$, которая может быть интерпретирована только при помощи расчета. Колебания $\nu \text{ C=O}$, $\delta \text{ NH}_2$, $\nu \text{ C=C}$ идентифицированы в области $1700-1800 \text{ см}^{-1}$. Деформационное колебание $\delta \text{ C=O}$ расположено около 500 см^{-1} и в значительной степени смешивается с деформационными колебаниями кольца, а также связей C-N аминогруппы. Максимальную чувствительность проявляют к кето-енольным переходам валентные колебания связей кольца, "кето-енольное" расщепление которых в области $1700-1400 \text{ см}^{-1}$ достигает $40-50 \text{ см}^{-1}$. Полосы деформационных колебаний расщепляются лишь в некоторых случаях до $\sim 10 \text{ см}^{-1}$. Неплоские колебания различных таутомеров в экспериментальных спектрах имеют мало различимые частоты. Таким образом, колебательные спектры цитозина, изоцитозина, имеющие в матричном образце более 50 полос (расчетное значение 33), интерпретированные как суммарные спектры енольного и кетонного таутомеров, подтверждены расчетным методом. Табулированы ИК спектроскопические характеристики кето-аминных и амино-енольных таутомеров пиримидиновых оснований: частоты колебательных переходов, относительные интенсивности, силовые постоянные, формы нормальных колебаний.

1.3. Особенности структуры 2,4-диоксопиримидинов

Полученные для 2,4-диоксопиримидина (урацил) и 2,4-диоксо-5-метилпиримидина (тимин) ИК спектры в матрице аргона имеют пики, соответствующие $\nu \text{ N}_1\text{H}$ и $\nu \text{ N}_3\text{H}$ колебаниям. Отнесение $\nu \text{ N}_1\text{H}$, как высокочастотной полосы по сравнению с $\nu \text{ N}_3\text{H}$ ($\Delta\nu \approx 50 \text{ см}^{-1}$), выполнялось с помощью 1-метил и 3-метилурацилов. В любых концентрационных соотношениях 2,4-диоксопиримидинов и аргона, отсутствуют полосы поглощения OH групп, т.е. реализуется традиционная дикето-структура соединений, несмотря на то, что по данным квантовохимических расчетов (Goddard, 1975; Buda, 1983) наиболее стабильны полностью ароматические диенольные таутомеры с локализацией водорода на атомах кислорода. Спектральные характеристики в области колебаний C=O групп ($1800-1600 \text{ см}^{-1}$) имеют большее число полос, чем это следует из расчета. Принятому в литературе объяснению (ферми-резонансное расщепление (Maltese, 1984)) было выдвинуто альтернативное представление о плоских и

неплоских конформациях 2,4-дикетопиримидинов. Конформации 2,4-дикетопиримидинов были рассчитаны методом молекулярной механики (Степаньян, 1987). Найдено, что для 2,4-диоксо-5,6-дигидропиримидина (минорное основание РНК) наиболее выгодной является неплоская структура типа твист-лодка. Вторая по стабильности также неплоская конформация на ~ 10 кДж/моль превышает энергию твист-лодки. Рентгеноструктурными данными (Rohrer, 1970) показано, что в твердом состоянии реализуется единственная конформация 5,6-дигидроурацила - твист-лодка. Принципиальной особенностью тимина и урацила является близость энергий плоской и нескольких неплоских конформаций (различия ~ 1.5 кДж/моль). В случае неплоских конформаций отклонения $C_2=O$ и $C_4=O$ от плоскости, проходящей через остальные атомы остова не превышают 0.2 и 0.4 Å соответственно. Величины двугранных углов излома кольца лежат в пределах 13-19°. Расчеты колебательных спектров с учетом неплоских структур показали, что наибольшие различия частот наблюдаются для $C=O$ связей (разница 20 cm^{-1}), а также для $C_5=C_6$ связи кольца. Таким образом, увеличенное число полос в области 1800-1600 cm^{-1} для 2,4-диоксопиримидинов, их 5-, 1-, 3- метил, 5,6-дигидропроизводных связано с равновесием плоских и неплоских структур молекул в изолированном состоянии. Возможно, значительное различие дипольных моментов ($\Delta\mu \sim 1D$) урацила и тимина в малополярных жидкостях также вызвано неплоскими структурами. В последние годы показано, что цепочки из нескольких пар аденин-тимин, строго повторяющихся через шаг двойной спирали ДНК, ответственны за ее изгибы (Trifonov, 1985). Изгибы ДНК несомненно могут реализовываться за счет выхода из плоскости отдельных групп тимина, урацила. Это определяет рельеф поверхности ДНК, зависящий от первичной последовательности, что возможно имеет решающее значение для белково-нуклеинового узнавания.

ЧАСТЬ 2. ТАУТОМЕРНЫЕ ПЕРЕХОДЫ В ПУРИНОВЫХ ОСНОВАНИЯХ

/ 29 - 35, 37, 38 /

Наличие в молекулах различных пуриновых соединений amino- и карбонильных групп, а также подвижного протона в имидазольном кольце, обуславливает большие возможности для образования различных таутомеров. Квантовохимическое рассмотрение относительных энергий таутомеров показывает предпочтительную возможность двух типов переходов: кето-енольного и перехода по имидазольному кольцу

2.1. Гуанин, гипоксантин

Экспериментальный спектр 9-метилгуанина (аналог гуанозина) был интерпретирован при помощи спектральных характеристик $N_2, N_2, 9$ -триметилгуанина, 2-аминопиримидина, изоцитозина, пурина, ND_2, N_1, D -9-метилгуанина. Показано, что ν OH 3566 см^{-1} имеет практически одинаковую относительную интенсивность с ν NH 3430 см^{-1} . Сложный контур полосы ν NH₂ вызван различием частот симметричного и асимметричного колебаний двух таутомеров: енольного и кетонного. Расчет колебаний пуринового остова выполнялся с использованием силовых полей и электрооптических параметров пиримидина и имидазола. Полученные в настоящей работе значения коэффициентов изотопных сдвигов ($K_{\text{OH}} = 1.35$; $K_{\text{NH}_2\text{ас}} = 1.33$; $K_{\text{NH}_2\text{сим}} = 1.37$; $K_{\text{NH}} = 1.35$), как средние значения в ряду для ~ 10 соединений, использовались для уточнения силовых полей, расчетов и интерпретации спектров гуанина и гипоксантина. В спектре гипоксантина реперную частоту ν OH 3568 см^{-1} удалось обнаружить только после значительного увеличения общей интенсивности спектра. К колебаниям кетонного таутомера отнесена сильная характеристическая полоса валентного колебания ν N₃H 3428 см^{-1} . Анализ интенсивностей полос ν OH и ν N₃H показывает, что при температуре испарения 250°C около 5% молекул гипоксантина и 50% 9-метилгуанина находятся в енольной форме. Деформационные колебания δ OH 1185 ; 1175 см^{-1} этих соединений характеристичны и при дейтерировании сдвигаются в соответствии с коэффициентом изотопного сдвига. Интенсивные полосы в области $1800 - 1600 \text{ см}^{-1}$ соответствуют валентным колебаниям C=O групп и C=C связей кольца, расщепляющихся при переходе от сопряженной структуры пиримидиновой части пурина к его кетонной форме. Константа keto-енольного равновесия 9-метилгуанина ($K = I_{\text{OH}}/I_{\text{NH}} = 1.35$), полученная экспериментально, подтверждает наибольшую вероятность енольных структур в keto-енольном равновесии. На основании исследованного ряда соединений (таблица 2.1.1) удастся выявить некоторые закономерности влияния различных заместителей, а также их положения в кольце на значения констант keto-енольных равновесий. Так, кислород во втором положении пиримидинового цикла (между двумя азотами кольца) обладает наибольшим сродством к протону. Введение аминогруппы увеличивает степень сопряжения в цикле и значительно сдвигает

ТАБЛИЦА 2.1.1

Характеристичные полосы ИК поглощения пиримидиновых и пуриновых оснований нуклеиновых кислот, изолированных в матрицах аргона.

Цитозин			Тимин			Аденин			9-CH ₃ -Гуанин		
ω	I	ТИП	ω	I	ТИП	ω	I	ТИП	ω	I	ТИП
3587	14	νOH				3564	19	νNH ₂ ac	3566	8	νOH
3559	12	νNH ₂ ac				3556	14				νNH ₂ ac
3468	7	νN ₁ H	3478	19	νN ₁ H	3497	24	νNH	3534	4	νNH
3438	20	νNH ₂ c	3433	15	νN ₃ H	3488	19		3453	10	νNH ₂ c
						3447	24	νNH ₂ c	3434	10	
						3440	24				
1714	56	νC=O	1766	74	νC ₂ O	1644	28		1752	17	νC=O
			1749	57	νC ₄ O	1637	65	δNH ₂ ac	1741	36	
			1744	50		1632	100		1656	7	δNH ₂ ,E
1670	17	δNH ₂	1710	100	νC ₅ O ₆	1624	18	ν к.	1640	23	ν к.,К
1665	19		1681	15	ν к.	1618	21	δNH ₂	1622	42	ν к.,E
1655	51	νC=C	1667	11	ν к.	1612	29	ν к.	1592	37	ν к.,E
1620	100	νN ₁ C ₂				1598	20	ν к.	1580	10	ν к.
1617	100	ν к.							1561	15	ν к.,E
1595	25	νN ₃ O ₄							1525	3	ν к.,К
1559	17	ν к.	1470	23	ν к.	1481	6	ν к.	1482	5	ν к.
1473	29	νC ₂ O	1456	2	δCH	1472	20	δCH	1465	12	δ CH
1438	97	ν к., δC ₅ H	1451	2	δC ₆ H	1421	12	ν к.	1439	18	δCH ₃
			1434	2	δCH	1418	12		1434	20	δCH ₃
1426	82	ν к.	1404	21	δN ₃ H				1430	5	ν к.
									1411	16	νC-O
1376	23	νC ₂ O	1388	4	ν к.	1388	14	ν к.	1385	2	ν к.
1331	17	νC ₄ N,К	1365	1	δCH	1328	14	ν к.	1371	2	δCH ₃
1318	28	νC ₄ N,E				1325	12		1328	14	δC ₈ H
1242	5	ν к.,К	1291	1	νC ₅ CH ₃	1288	40	δCH	1296	2	δCH
1223	9	ν к., δC ₅ H				1246	6	δCH	1274	12	ν к.,К
						1239	27	νC-NH ₂	1225	8	νN-CH ₃
						1227	9	δNH ₂	1203	4	νC-NH ₂
1193	33	δOH, ν к.	1198	3	δC ₆ H				1175	17	δOH

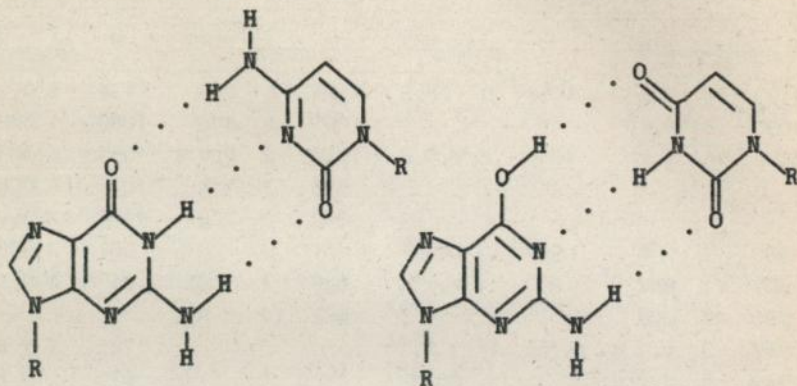
ТАБЛИЦА 2.1.1 (продолжение)

Цитозин			Тимин			Аденин			9-CH ₃ -Гуанин		
ω	I	ТИП	ω	I	ТИП	ω	I	ТИП	ω	I	ТИП
1123	10	ν к	1182	31	δN ₁ H	1126	3	δCH	1134	8	ν, γ к
1090	8	ν к, γ к				1061	8	δCH	1080	1	δNH ₂ , К
1082	15		1086	5	ν, γ к	1017	2	ν, γ к	1053	5	δCH ₃
						958	2	γ к	1045	6	δCH
						888	9	ρCH	1004	12	γ, ν к
980	3	ν к	959	3	δCH				987	2	δCH ₃
807	21	ρNH ₂	890	4	ν, γ к	849	4	γ к	817	1	γ к
780	17	ρCH				802	10	γ к			
767	3	ν, γ к	762	11	γ к,				725	7	χ к
749	5	γ, ν к			δC ₆ H				673		γ к
			752	10	γ к	655	6	δ к	642		ρOH
635	5	γ, ν к	661	17	ρNH, CH	612	3	δ к	634		γ к
613	15	γ к				592	37	ρNH ₂	593		χ к
574	7	γ, ν к				582	29		584		ρNH ₂
535	5	γ к				566	38	ρNH ₂	577		ρNH ₂
519	32	δC=O	543	21	δC ₂ O,	512	37	ρNH	520		χ к
507	14	ρNH ₂			γ к						
498	15	δC=O, δC-N	453	6	δC ₄ O, δC ₂ O						

Примечание: ν - валентные колебания; δ и γ - деформационные колебания; χ и ρ - внеплоскостные колебания; к - кольцо. Приведены относительные пиковые интенсивности.

таутомерное равновесие в сторону образования енольных форм. Таким образом, способность 9-метилгуанина и гипоксантина существовать в енольной форме является реальной физико-химической характеристикой. Различные возмущающие факторы среды (химические агенты, излучение)

могут способствовать переходам гуанина и гипоксантина в енольную форму, что вызовет неправильное спаривание с урацилом, тиминном, вместо правильного с цитозином:



Гуанин - Цитозин

Гуанин - Урацил

Способность гуанина и гипоксантина к таутомерным переходам в составе нуклеиновых кислот под влиянием межмолекулярных сил, очевидно, сильно понижается, в противном случае это приводило бы к значительным ошибкам в работе генетического аппарата по передаче и сохранению информации. Однако, ошибки, называемые мутациями, происходят. Таутомерные переходы в нуклеотидных основаниях могут явиться источником мутаций. В настоящей работе показано, что среди пуриновых оснований, замещенных по девятому положению, специфическим свойством существовать одновременно в двух таутомерных формах обладают гуанин и гипоксантин (9-метилпроизводные, моделирующие соответствующие нуклеозиды). Повидимому, "неправильные" пары оснований в реальных биополимерах должны одним из компонентов иметь гуанозин либо инозин. Действительно, пары гуанин-урацил реально существуют в составе большинства транспортных РНК (Мацука, 1976). Термодинамическая стабильность этих пар, изученная на модельных додекамерных олигонуклеотидах (Alkema, 1982), не уступает стабильности уотсон-криковской пары аденин-урацил. Если на одной из стадий метаболизма нуклеиновых кислот гуанин переходит в енольную форму, то удается объяснить ряд известных в молекулярной биологии фактов, например, экспериментально установленную концепцию "горячих точек"

(Freese, 1963; Drake, 1966), по которой участки генома, обогащенные парами гуанин-цитозин, наиболее подвержены мутациям. Необходимо отметить, что результаты наших исследований способствовали дальнейшему изучению парного взаимодействия нуклеотидных оснований в условиях вакуума масс-спектрометрическим методом (Теплицкий, Полтев, 1991), в результате чего установлено образование стабильных "неправильных" пар гуанин-урацил.

2.2. Прототропная таутомерия по имидазольному кольцу

Согласно квантовохимическим расчетам N_7H и N_9H таутомеры аденина, гуанина имеют близкие энергии образования. В исследованном ряду: пурин, аденин, гипоксантин наблюдаются две интенсивные полосы ν_{N_7H} , ν_{N_9H} колебаний, отличающихся по частоте на $\sim 10 \text{ см}^{-1}$ (рис. 2.2.1). Этот результат демонстрирует большие возможности низкотемпературной ИК спектроскопии по обнаружению прототропных таутомеров. Константы таутомерного равновесия $K = I_{N_9H}/I_{N_7H}$ (аденин 1.0; гипоксантин 1.8; пурин 0.6) в исследованном ряду имеют отличающиеся значения, что связано с различной степенью сопряжения молекул и влиянием заместителей. В спектре кетонного таутомера гипоксантина наибольшей чувствительностью к $N_7H \rightleftharpoons N_9H$ переходам обладают валентные колебания $C=O$ связи и $C_4=C_5$ связи кольца ($\Delta\nu = 17$ и 6 см^{-1} соответственно). Основной причиной расщепления валентных колебаний амино-группы аденина является ее стерическое взаимодействие с протоном в положении N_7H , величина расщепления ν_{NH_2} составляет несколько см^{-1} (рис. 2.2.1), что подтверждается расчетными значениями. В отличие от гипоксантина пиримидиновое сопряженное кольцо аденина мало чувствительно к $N_7H \rightleftharpoons N_9H$ таутомерии. Величина таутомерного расщепления имидазольных колебаний кольца не превышает $\Delta\nu 10 \text{ см}^{-1}$, при переходе в низкочастотную область наблюдается ее уменьшение. Относительные интенсивности большинства дублетов в ИК спектре аденина близки по значению, что также указывает на одинаковое содержание N_7H , N_9H таутомеров. Таким образом, аномально увеличенное число полос поглощения в экспериментальных ИК спектрах показывает, что молекулы аденина, гипоксантина, пурина существуют в виде N_7H и N_9H таутомеров.

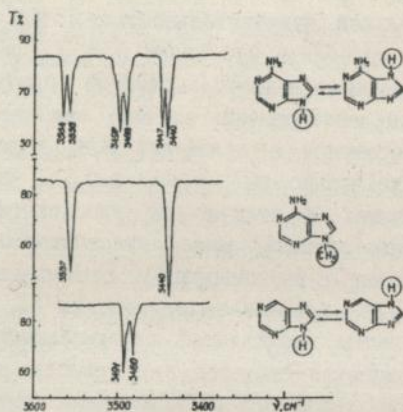
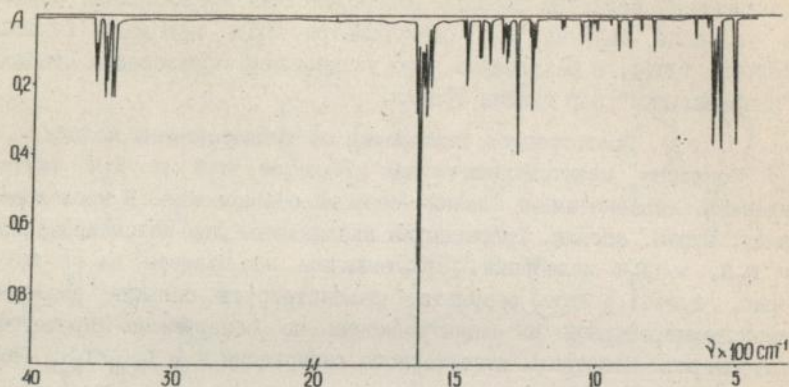


Рис. 2.2.1. ИК спектр аденина в матрице аргона, 1:1000. Внизу - $\nu(\text{NH}_2)$, $\nu(\text{NH})$ колебания аденина, 9- CH_3 -аденина и пурина, высокочувствительные к прототропии по имидазольному кольцу.

3.1. Ассоциация и гидратация

Сравнительный анализ спектральных характеристик молекул в изолированном и конденсированном состоянии показывает их значительное различие. Однако, до сих пор отсутствует информация об изменении спектральных характеристик при переходе от изолированного состояния молекул к их автоассоциатам и гидратам, а также не исследовано влияние межмолекулярного взаимодействия на структурные переходы молекул. Для изучения автоассоциатов пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот в матрицах аргона использовались два подхода: первый - изучение концентрационных зависимостей спектральных характеристик, второй - отжиг матрицы. Для получения автоассоциатов цитозина с водой на низкотемпературную подложку KBr одновременно напылялись три компонента: цитозин, вода и аргон в молярном соотношении 1:50:1000. В опытах использовались H_2O и D_2O , что расширило спектральную область прозрачности. Как при автоассоциации, так и при гидратации пиримидиновых оснований в матрице реализуются всевозможные контакты молекул, в том числе и различные термодинамически неравновесные конфигурации комплексов. 1-Метилцитозин, моделирующий нуклеозид цитидин, при автоассоциации в матрице дает несколько новых полос колебаний, связанных с образованием ассоциатов различной стехиометрии и геометрии: 3513, 3320, 3173, 2850 cm^{-1} . В цитозине также имеются близкие по частоте новые полосы νNH_2 связ. 3512, 3300, 3100, 2930 cm^{-1} . Полуширины полос автоассоциатов 1-метилцитозина и цитозина возрастают в вышеназванной последовательности со снижением максимума полосы. В гидратированном цитозине (рис. 3.1.1.) широкая дублетная полоса ν 3530, 3517 cm^{-1} вызвана колебанием NH_2 группы, связанной с различным числом молекул воды. Сдвиги валентных колебаний νNH гетероциклического азота определены на основании данных спектральных характеристик ассоциированного урацила: $\Delta\nu N_1H$ 8 и $\Delta\nu N_3H$ 6 cm^{-1} , при этом пиковая интенсивность полос νNH снижается, а полуширина увеличивается почти в 2 раза. Полосы деформационных колебаний δNH , δON урацила и цитозина оказались чувствительными к межмолекулярным взаимодействиям в ассоциатах и гидратах. Частота деформационного колебания енольной формы цитозина δON 1193 cm^{-1} смещается в сторону высоких частот: 1225 cm^{-1} (гидрат), 1220 cm^{-1} (ассоциат) и уширяется в ~ 3 раза. Полосы деформационных колебаний

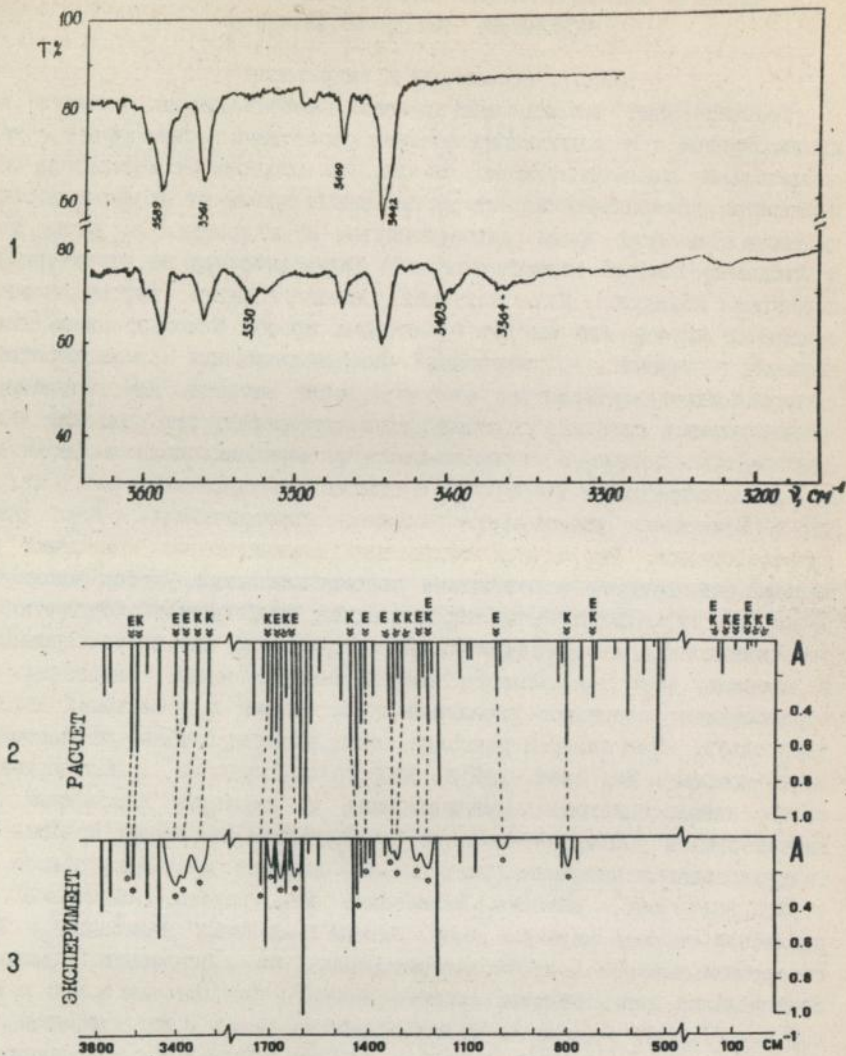


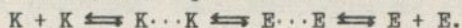
Рис. 3.1.1. Экспериментальный (1,3) и рассчитанный (2) колебательные спектры гидратов таутомерных форм цитозина (x - отмечены экспериментальные полосы колебаний гидратов).

δ NH ассоциатов урацила и цитозина также уширены и меняют положения максимумов по сравнению с одиночными молекулами: 1309, 1303, 1300, 1224 см^{-1} (урацил); 1340, 1253 см^{-1} (цитозин). При гидратации цитозина (рис. 3.1.1) полосы в области 1750–1600 см^{-1} значительно уширяются и сливаются. В 1-метилцитозине исчезает интенсивная полоса δ NH₂ 1737 см^{-1} , смещаясь к низким частотам, при этом уширяется полоса 1724 см^{-1} , и растет новая полоса 1681 см^{-1} . Необходимо отметить, что для всех изученных соединений наблюдается появление новых полос: 1632 см^{-1} (ассоциат урацила), 1684 см^{-1} (гидрат цитозина), 1681 см^{-1} (ассоциат 1-метилцитозина), пиковая интенсивность которых растет с увеличением степени ассоциации. Такое поглощение вызвано валентным колебанием C=O группы, связанной водородными связями в автоассоциатах и гидратах оснований нуклеиновых кислот. Гидратация двух таутомерных форм цитозина также была исследована с использованием метода молекулярной механики. Рассчитанные значения энергий стабилизации гидратов показывают, что енольная форма уступает по энергиям взаимодействия кетонной форме. Так, средняя энергия взаимодействия кетонной формы составляет 34.6 кДж/моль (для $n=5$ в пересчете на одну молекулу воды), в то время как соответствующая величина для енольной формы имеет значение 24.7 кДж/моль. В среднем различие энергий взаимодействия составляет 9.9 кДж/моль на одну молекулу воды. Расчет энергий взаимодействия показывает, что в изолированных в аргоне кластерах содержание кетонного таутомера повышается по сравнению с изолированными молекулами. Колебательные спектры гидратов (рис. 3.1.1., п.2) и ассоциатов цитозина, рассчитанные по методу "супермолекулы", выявляют избирательную чувствительность к процессам межмолекулярного взаимодействия полос валентных, деформационных и внеплоскостных колебаний амино, окси, имино групп, однако, колебания кольца мало чувствительны к этим процессам. Таким образом, изученные структура, энергетические и колебательные характеристики автоассоциатов и гидратов цитозина с учетом существования двух таутомерных форм – енольной и кетонной, показали, что в ряду ассоциатов кетон-кетон, енол-кетон, енол-енол энергия стабилизации димеров уменьшается, и это приводит к повышению содержания кетонного таутомера в матрице.

3.2 Механизм кето-енольных переходов

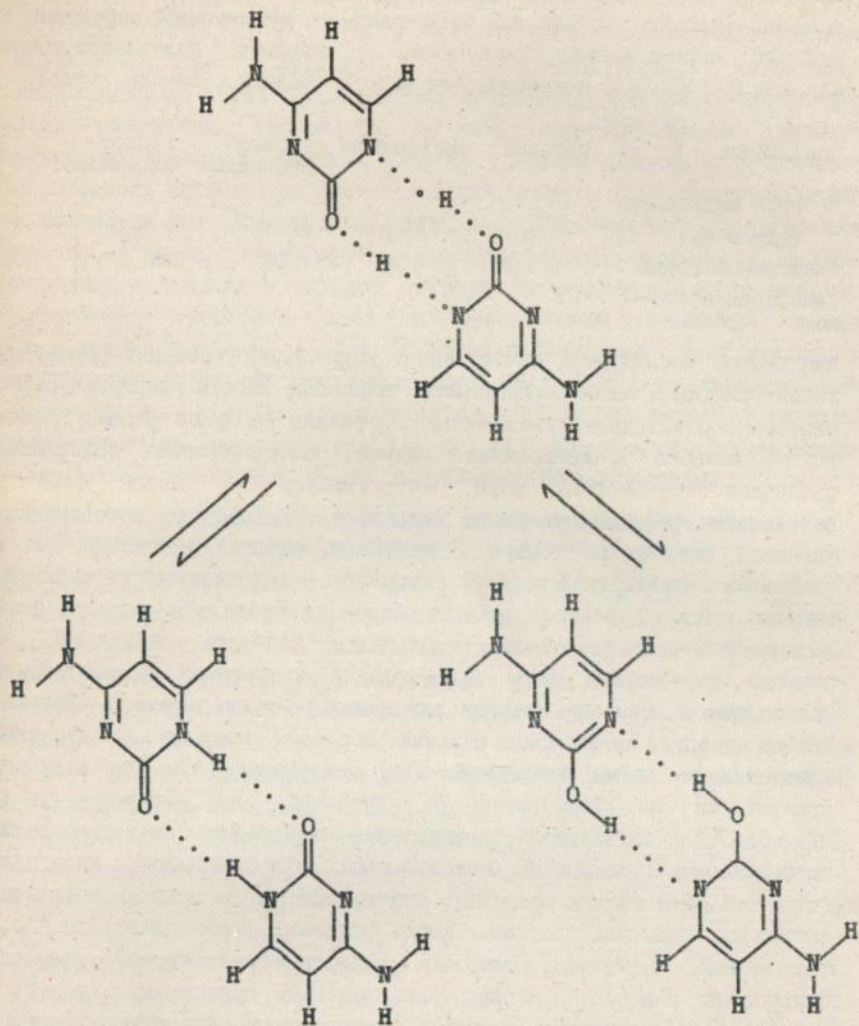
Рассмотрены возможные модели переноса протона при таутомерных переходах кетон-енол и амин-имин. Для этого проанализированы

процессы происходящие в ячейке Кнудсена при изучении низкотемпературных ИК спектров пиримидиновых оснований в инертных матрицах. Приготовление образцов исследуемых веществ производилось путем одновременного напыления молекулярных пучков пиримидиновых оснований и аргона на оптическую подложку, охлажденную до 11К. Для получения молекулярных потоков соединений использовалась ячейка Кнудсена, диффузионное отверстие которой имело форму и размеры, обеспечивающие молекулярный характер истечения, что контролировалось линейной зависимостью изменения частоты кварцевого резонатора от температуры. В кристаллическом состоянии молекулы цитозина и изоцитозина существуют в виде кето-аминных таутомеров, связанных водородными связями двух типов: N-H...N и NH₂...O=C (Barker, 1964). В процессе сублимации веществ в ячейке Кнудсена водородные связи разрушаются, молекулы переходят в паровую фазу в кетоаминной форме. Известно, что при нагревании веществ в ячейке Кнудсена устанавливается динамическое тепловое равновесие конденсированная фаза ↔ пар. Молекулы в газовой фазе находятся в состоянии непрерывного хаотического движения, сталкиваются, образуя комплексы из двух и более молекул. Между столкновениями молекулы проходят свободно некоторый путь λ, длина которого обратно пропорциональна давлению пара (0.01 - 0.3 торр (Clark, 1965)). Оценочные значения λ пиримидиновых оснований в ячейке Кнудсена при P = 0.01-0.3 торр меньше 0.5 см. В матрице аргона замораживается паровая фаза веществ в том же качественном состоянии в котором она находится в ячейке Кнудсена. Так как экспериментально в матрице аргона наблюдаются аминноольные формы цитозина и изоцитозина, то очевидным является процесс переноса протона в комплексе кетон...кетон с последующей перестройкой химических связей:



Направление такой реакции будет определяться относительной стабильностью таутомерных форм, в данном случае реакция идет с выходом енольных форм. В то же время для осуществления реакции необходимо, чтобы расстояние, которое должен пройти протон, было укорочено за счет образования сильных водородных связей. Методом полевой масс-спектропии (Янсон, 1979) установлено что две водородные связи в димере цитозина в газовой фазе имеют энергию 73.3 кДж/моль. Таким образом, вполне обоснован выбор модели таутомерных переходов как процесса переноса протона в димерных системах через водородные связи. Перенос протона при этом

происходит по следующему механизму: "димер аминокетона" \rightarrow "переходное состояние" \rightarrow "димер аминокенола".



Поскольку димерные системы на всем протяжении координаты реакции обладают симметричной структурой, речь идет фактически о синхронном переносе двух протонов, (Lowdin, 1987; Kuogoku, 1978) то есть

рассчитывается реакция вдоль одной координаты, при этом нахождение седловой точки, контролируется расчетом вторых производных от энергии. Ниже приведены расчетные значения энергий активации реакции переноса протона для кето-енольных таутомерных переходов в димерах пиримидиновых оснований, полученные полуэмпирическим методом ССП МО ЛКАО в приближении MNDO/H (Войтук, Близнюк, 1987).

Соединение	: Цитозин	Изоцитозин	2-оксо- пиримидин	4-оксо- пиримидин
Энергия активации (кДж/моль)	: 50.0	39.1	28.1	52.5
% енольной формы (эксперимент)	: 50%	80%	100%	50%

Как видно, наблюдается качественная корреляция указанных расчетных характеристик и экспериментальных: понижение высоты энергетического барьера соответствует увеличению содержания енольной формы, вплоть до ее полного доминирования. Однако, количественное содержание различных таутомерных форм, образующихся в газовой фазе в результате реакции двойного переноса протона в кето-аминных димерах, связано не только с величиной энергии активации, но и зависит в значительной мере от выигрыша в энергии продукта реакции. Понятно, что в процессе реакции переноса протона в газовой фазе устанавливается равновесие нескольких наиболее стабильных по энергии таутомерных форм при условии нагревания и достижения необходимого значения энергии активации реакции переноса протона. Анализ энергий активации реакций переноса протона в гидратных комплексах с двумя молекулами воды показывает, что эти величины практически не отличаются от значений для димеров (37-49 кДж/моль). Для случая водного окружения сдвиг таутомерных равновесий пиримидиновых оснований определяется относительными энергиями гидратных комплексов различных таутомеров, а не только энергиями активации переноса протона. Таким образом, установлено, что при таутомерных переходах наиболее вероятным механизмом является синхронный перенос протона через систему водородных связей в димерах и в комплексах с водой. Направление таутомерного сдвига определяется величиной энергии активации, а также относительной энергией исходных и конечных продуктов реакции.

**ЧАСТЬ 4. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА АНТИМЕТАБОЛИТОВ
ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИИ**

Физиологическая активность лекарственных соединений противоопухолевого спектра действия { 6-фтор-5-метилурацил; 3-метил-2,4-диоксопиримидо-[5,6]-1,2,4-триазин (реумицин); 6-метил-5-ди(2-хлорэтил)-аминоурацил (допан) }, а также антивирусных и противомикробных агентов: 5-нитро-, 5-бром- урацилов связана с нарушением метаболизма нуклеиновых кислот. Данные Drake (1970) свидетельствуют о включении галоидзамещенных урацилов в ДНК бактерий; по сведениям Auerbach (1978) существует корреляция между включением в ДНК аналогов оснований и выходом мутаций. В основе одной из моделей мутагенного действия аналогов нуклеотидных оснований лежит выдвинутый Уотсоном и Криком принцип нарушения избирательного спаривания оснований при репликации ДНК. С целью проверки этой гипотезы мы провели экспериментальное исследование структуры вышеназванных аналогов урацила и их способности образовывать комплексы с водородной связью с нуклеиновыми основаниями.

4.1. Влияние заместителей на строение замещенных урацила [2-4,6,7,39,44,47].

На основании данных ИК-спектров для изолированных молекул в матрицах аргона введение заместителей в 5-,6- положения, а также конденсация по 5,6 с триазиновым циклом (реумицин) не изменяют прототропной таутомерии соединений. Все замещенные урацила находятся в характерной кето-форме. Низкотемпературные инфракрасные спектры фиксируют частоты колебаний ν NH групп (при отсутствии ν OH), хорошо согласующиеся со значениями частот соответствующих колебаний матрично-изолированных урацила и тимина. Таблица 4.1.1 (значения частот колебаний в см^{-1}).

Соединение	ν N ₁ H	ν N ₃ H	δ N ₁ H	δ N ₃ H	ν C ₂ =O	ν C ₄ =O
5-нитроурацил	3456	3419	1377	1307	1766	1741
5-бромуррацил	3471	3425	1390	1303	1765	1726
6-флортимин	3463	3438	1282	1375	1764	1717
тимин	3478	3431	1177	1404	{1764 1749}	{1744 1722}

Сдвиг к низким частотам колебаний ν NH 5-нитро- и 5-бромуррацила

связан со снижением порядка связи NH групп при введении заместителей. Максимальное влияние на снижение частоты ν NH оказывает нитрогруппа. Изменение $\Delta\nu$ N₃N для 5-бром-, 5-метил-, 5-нитрозамещенных урацила подчиняется линейной зависимости от приращения потенциала ионизации соединений, аналогично мета-производным бензола. Влияние заместителей через π -связь C₅=C₆ в ~ 3 раза эффективнее, чем через одинарные связи.

Валентные и деформационные, симметричные и асимметричные N=O колебания (ν 1550, 1538; ν 1350, 1307, 1341; δ 626, 621; δ 594, 590 см⁻¹) имеют высоко- и низкочастотные плечи, связанные с поворотом нитрогруппы, при этом наиболее стабильной является структура с ортогональным расположением нитрогруппы к плоскости кольца. Эта структура на 29.4 кДж/моль стабильнее плоской конформации, что связано с сильным отталкиванием в плоской структуре кислорода карбонильной группы C₄=O и кислорода нитрогруппы. Введение заместителей в 5,6 положения урацила отмечается интенсивными полосами поглощения: ν C-F 1194, ν C-Br 1048, ν C-NO₂ 1324 см⁻¹. Для 5-бром- и 5-нитроурацилов, в отличие от собственно урацила, характерно упрощение спектра в области C=O колебаний. Экспериментально наблюдаются две полосы: ν C₂=O и ν C₄=O, что свидетельствует о присутствии в матрице только одной конформации молекул. Конформационный расчет показал энергетическую стабильность плоской конформации. Анализ вкладов различных составляющих общей энергии молекулярной системы (в рамках метода молекулярной механики) определил, что основной причиной дестабилизации неплоских структур является взаимодействие между диполями связей C₂=O, C₄=O и диполем связи C₅-X. Таким образом, включение в ДНК вместо тимина плоских молекул 5-бромурасила должно изменять характер изгиба ДНК и ее функцию.

4.2. УФ спектры и физико-химические свойства антиметаболитов урацила [1,5,8-12,19,20,23].

Модификация нуклеотидных оснований сопровождается существенными изменениями электронной структуры и оказывает значительное влияние на кислотно-основное равновесие соединений. Слабое влияние на электронные переходы оказывают следующие заместители по пятому положению: CH₃, F, CH₂OH, N(C₂H₄Cl)₂. Введение 5-галоген-, 6-аза-, 5-нитро- заместителей не только значительно смещает максимум полосы первого π - π^* перехода, но и увеличивают константу ионизации на 1-4 порядка по сравнению с урацилом. В водных буферных растворах

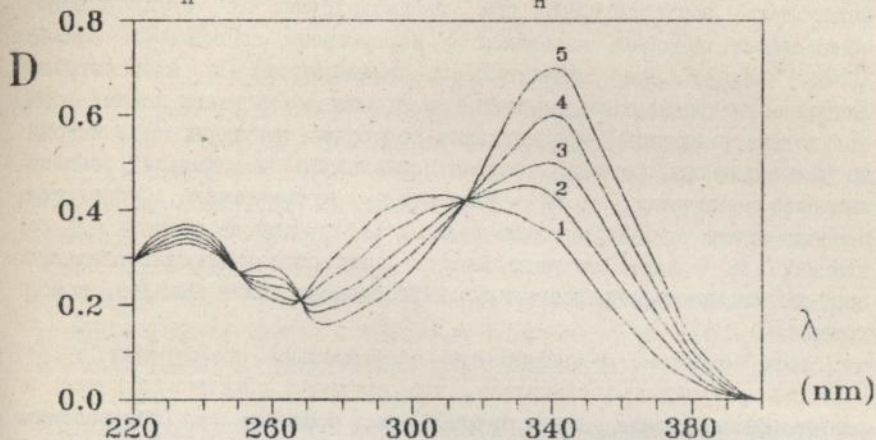
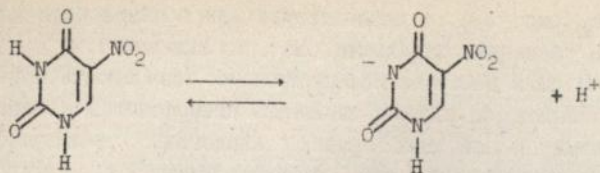


Рис. 4.2.1. УФ спектры 5-нитроурацила в фосфатном буфере при различных температурах (Т,К): 1-282; 2-302; 3-320; 4-339; 5-358.

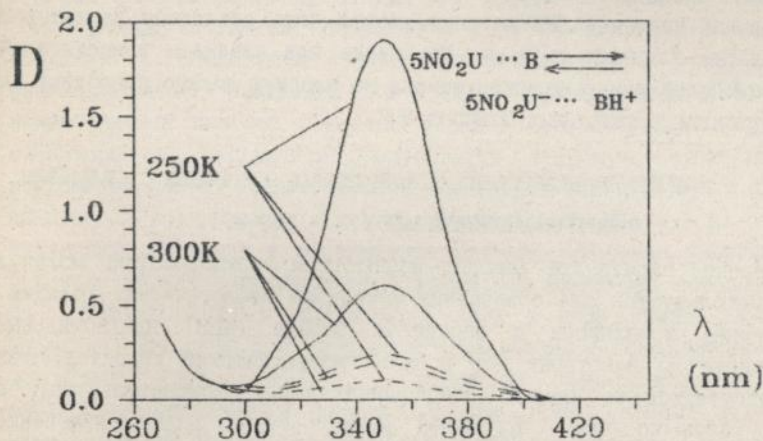


Рис. 4.2.2. Дифференциальный спектр 5-нитроурацила с основаниями (В): цитозином (—), 9-метиладеновином (---), 9-метилгуанином (- - -) при положительных и отрицательных температурах (Т,К).

5-нитроурацил (рис. 4.2.1) диссоциирует как обыкновенная кислота с положительным значением энтальпии ($\Delta H \approx 20$ кДж/моль).

Ранее нами была показана принципиальная возможность образования комплексов с переносом протона изомеров нитрофенолов с азаароматическими аминами в неводных средах. Аналогично, 5-нитроурацил в апротонных растворителях при взаимодействии с нуклеотидными основаниями образует комплексы с характерным поглощением аниона (рис. 4.2.2). При отрицательных температурах в ацетонитриле динамическое равновесие смещается в сторону образования ионных форм вследствие увеличения концентрации водородно-связанных пар. Исходя из установленных значений констант связывания и энтальпий реакции переноса протона ($-\Delta H$ кДж/моль) нуклеотидные основания располагаются в ряд: цитозин ($-\Delta H = 16$) > аденин ($-\Delta H = 1,5$) > гуанин ($-\Delta H = 0,5$), из чего следует, что образовать неправильную пару с цитозином 5-нитроурацилу энергетически более выгодно, чем с гуанином.

Таким образом, в результате исследования прототропии 5-,6-замещенных урацила установлено, что введение электронодонорных и электроноакцепторных заместителей не приводит к образованию енольных форм, как это предполагалось (Watson, 1976) для объяснения их роли при ошибочном включении в НК вместо урацила и тимина. Вероятно, присущие антимаболитам свойства быть ингибиторами ферментов и нарушать ДНК-матрицу, могут быть объяснены характером их кислотно-основных свойств. Изменение под влиянием заместителей неплоской конформации урацила, тимина на плоскую должно приводить к трансформации в локальных изгибах ДНК.

ЧАСТЬ 5. КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ОСНОВАНИЙ С СИЛЬНЫМИ ЭЛЕКТРОНОАКЦЕПТОРАМИ [13 - 16, 29].

Перенос заряда при донорно-акцепторном взаимодействии молекул часто используется для объяснения механизма биологических реакций. Образование комплексов с переносом заряда (КПЗ) нуклеотидными основаниями до некоторых пор носило гипотетический характер, так как отсутствовали прямые экспериментальные доказательства, а имелись лишь косвенные аргументы неоднозначного плана: изменение значений максимумов основных полос поглощения в УФ, ИК спектральном диапазоне; корреляция констант ассоциации компонентов с потенциалом ионизации пуриновых и пиримидиновых оснований (Tsibris, 1965;

Briegleb, 1969; Slifkin, 1970). Однако, до наших работ не было данных прямого наблюдения электронных переходов, отвечающих за перенос заряда с основания на акцептор. Актуальность исследования КПЗ пуриновых и пиримидиновых оснований связана с возможностью электронного транспорта в стопках ДНК и фармакологической активностью интеркалирующих лекарственных соединений.

5.1. Получение комплексов с переносом заряда и ион-радикальных солей нуклеотидных оснований с

7,7,8,8 - тетрацианохинодиметаном (ТЦХМ).

Основания НК имеют слабые электронодонорные свойства, их потенциалы ионизации составляют $I = 8,0 - 9,5$ эВ, поэтому для образования комплексов был использован сильный электроноакцептор ТЦХМ, электронное сродство которого $E = 2,75$ эВ. Твердые кристаллические комплексы цитозина, 1-метилцитозина, 9-метил-аденина, 9-метилгуанина с ТЦХМ были получены путем самопроизвольной кристаллизации из растворов при нормальных температурах. Для цитозиновых и адениновых комплексов характерен перенос заряда в основном состоянии с образованием ион-радикальных солей; в молекулярном комплексе гуанина перенос электрона происходит лишь при поглощении кванта света. Для наблюдения полос переноса заряда реакция фиксировалась на стадии КПЗ путем замораживания при 77 К сонепляемых азотистых оснований и ТЦХМ на охлажденную кварцевую подложку с последующим спектросфотометрированием. Специфическое взаимодействие оснований и ТЦХМ характеризуется широкой асимметричной полосой переноса заряда, отсутствующей у донора и акцептора и являющейся результатом переноса электрона при поглощении света соответствующей энергии $h\nu$ (рис. 5.1.2). π -Характер комплексов подтверждается общей линейной зависимостью $h\nu$ от I для пуриновых оснований и производных бензола. Значения энергий полос переноса заряда пиримидиновых комплексов, максимумы которых скрыты π^* -полосой ТЦХМ и проявляются лишь в виде крыла, вычислены: $h\nu_{\text{КПЗ}}^* = I - E - C$, где $C = 2,73$ эВ в исследованном гомологическом ряду оснований (табл. 5.1.1). Образование ион-радикальных солей азотистыми основаниями происходит при отжиге пленок и переходе комплексов из аморфного состояния в кристаллическое. На основании вышеизложенного делается вывод, что нуклеотидные основания однозначно обладают свойством образования комплексов с переносом заряда, отвечающим всем классическим требованиям: наблюдаются

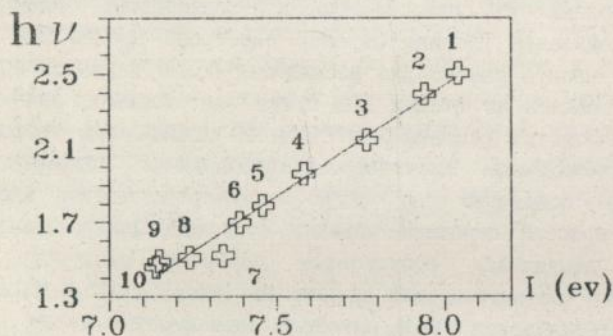
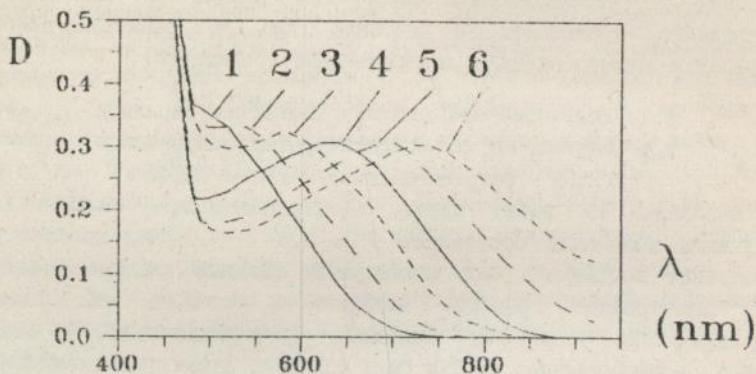
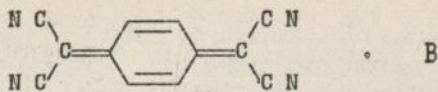


Рис. 5.1.1. Полосы переноса заряда комплексов пуриновых оснований (В) и тетрацианохиноидиметана в тонких пленках при 77К.

Рис. 5.1.2. Зависимость значений энергии полос переноса заряда от потенциала ионизации пуриновых оснований и замещенных бензола.

- | | | |
|-------------------|----------------------------|---------------------|
| 1 - 9-метилгуанин | 5 - N2,9-диметилгуанин | 9 - м-фенилендиамин |
| 2 - кофеин | 6 - N2,N2,9-триметилгуанин | 10 - диметиланилин |
| 3 - гуанин | 7 - N-метиланилин | |
| 4 - 9-метилгуанин | 8 - п-толуидин | |

ТАБЛИЦА 5.1.1.

Спектральные характеристики тонких пленок пуриновых, пиримидиновых оснований и 7,7,8,8-тетрацианохинодиметана (ТЦХМ) при 77 К.

Основание	Полосы переноса заряда		Потенциал ионизации донора, I эВ [Орлов, 1977]
	Эксперимент λ макс., нм	Расчет, $h\nu_{\text{КПЗ}} = \lambda$ макс., нм	
$N_2, N_2, 9-(CH_3)_3$ -Гуанин	729	-	7,39
$N_2, 9-(CH_3)_2$ -Гуанин	695	-	7,46
9- CH_3 -Гуанин	630	-	7,58
Гуанин	582	-	7,77
Кофеин	520	-	7,94
9- CH_3 -Аденин	510	-	8,04
Аденин	-	471	8,26
Гипоксантин	-	441	8,44
Ксантин	-	422	8,55
Цитозин	-	403	8,68
1- CH_3 -Цитозин	-	320	9,50
1, $N_4-(CH_3)_2$ -Цитозин	-	342	9,25
Урацил	-	336	9,32
Тимин	-	383	8,87
1,3- $(CH_3)_2$ -Тимин	-	473	8,25

специфические широкие асимметричные полосы переноса заряда, линейно связанные с потенциалом ионизации оснований, и диссоциация комплексов на компоненты под влиянием растворителя и температуры.

5.2. Модель взаимодействия интеркалирующих в ДНК лекарственных соединений

Группа противомикробных красителей, противоопухолевых лекарственных соединений, некоторых мутагенов образуют комплексы за счет интеркалирования в ДНК. Рентгеноструктурные исследования показывают, что упаковка интеркаляторов в ДНК сходна со структурой комплексов с переносом заряда ТЦХМ. В связи с этим нами проверялась модель, в которой рассматривается конкуренция связывания способных к интеркаляции соединений с резко различающимися значениями

электронного сродства, но с близкой гидрофобностью. Таким условиям отвечают молекулярные и катионные формы биологически активных красителей. В работе установлены спектральные различия этих форм для акрихина (хлористоводородная соль 2-метокси-6-хлор-(4-диэтиламино-1'-метил)-бутиламиноакридин /АКР/) и мутагенного соединения 9-(3'-диметиламино)-пропиламиноакридина /9-ДМА/. Показано, что катионные формы производных акридина в видимой области спектра имеют полосу с ярко выраженной колебательной структурой. Особенно хорошо вибронные компоненты разрешаются при снижении температуры водноспиртовых растворов до 190° С (451, 425, 403, 385 нм для АКР). Колебательная структура полос поглощения в видимой области для акридиновых катионов сохраняется и при интеркалировании в ДНК. Отличительной особенностью молекулярных форм являются полосы формы Лоренца со сдвигом максимума на 30-40 нм в коротковолновую область по сравнению с катионом. Исследование связывания АКР и 9-ДМА с нативной ДНК тимуса теленка было выполнено в границах соотношений компонентов, ионной силы и рН буферных растворов, обеспечивающих процесс интеркаляции. Показано, что с ДНК связываются акридиновые производные лишь в катионной форме. Даже при рН > 9, когда интеркаляторы находятся преимущественно в молекулярной форме, при комплексообразовании с ДНК равновесие смещается в сторону катиона. В щелочных буферах, константы связывания в 1,5-2 раза ниже, чем в нейтральных и слабокислых средах. Полученный результат о преимущественном связывании с ДНК катионных форм изученных акридиновых соединений не противоречит тому, что многие химиотерапевтические препараты имеют форму хлористоводородных солей с положительным зарядом на органической составляющей молекулы. Другой тип лекарственных соединений это полициклические системы со звеном хинона. Все эти соединения имеют хорошо выраженные электроноакцепторные свойства, так что при интеркалировании в ДНК могут взаимодействовать с основаниями благодаря перекрыванию орбиталей донора и акцептора и переносу заряда. Локальные взаимодействия нуклеотидных оснований и интеркаляторов приводят к увеличению термической стабильности ДНК, нарушению вторичной структуры и функции ДНК в клетке.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. В результате выполненного в настоящей работе исследования показаны уникальные возможности низкотемпературной спектроскопии в изучении структурных характеристик и свойств биоорганических молекул - нуклеотидных оснований, лекарственных соединений, аминокислот.

2. Впервые экспериментально обнаружены редкие лактимные таутомеры пуриновых и пиримидиновых нуклеотидных оснований. Для соединений, содержащих одну карбонильную группу, в газовой фазе при давлении насыщенных паров (температура 150 - 250 °C) и замороженных в окружении аргона, фиксируется прототропное таутомерное равновесие типа лактам - лактим. Измеренные константы лактам-лактимного равновесия свидетельствуют о равной вероятности лактамных и лактимных форм для гуанина. В цитозине, изоцитозине таутомерное равновесие смещено в сторону редких лактимных форм, в гипоксантине - в сторону лактама.

3. Пиримидиновые канонические основания - тимин, урацил, содержащие две карбонильные группы, в изолированном состоянии в матрице аргона, находятся в дикетонной форме, что противоречит данным квантовохимических расчетов относительных энергий стабилизации с преимуществом для диенольных форм.

4. Пуриновые основания с незамещенным водородом по имидазольному кольцу, независимо от степени сопряжения в пиримидиновом цикле, образуют равновесие $N_7H \rightleftharpoons N_9H$ таутомеров. Получены значения констант прототропного равновесия по имидазольному кольцу для аденина, гипоксантина, пурина.

5. Впервые измерены ИК спектральные характеристики (частоты полос поглощения, относительные интенсивности) изолированных молекул всех канонических оснований, некоторых минорных нуклеотидных оснований, а также около 20 вспомогательных соединений пуринового и пиримидинового класса. Особенно полезной является спектральная информация для редких енольных таутомеров, которые были впервые получены и идентифицированы в изолированном состоянии в аргоновых матрицах. Полуэмпирическим методом в рамках модели валентно-силового поля рассчитаны и интерпретированы колебательные спектры нуклеотидных оснований, а также пуриновых и пиримидиновых производных, являющихся основой многочисленного ряда биомолекул и лекарственных соединений. На основании установленных значений молекулярных параметров - электрооптических и силовых постоянных для изученных

соединений была составлена база данных для типовых расчетов колебательных спектров любых производных пурина и пиримидина.

6. Изучен механизм образования лактам-лактимных равновесий. Квантово-химическим методом МПДП/ВС показано, что таутомерное равновесие устанавливается в процессе синхронного переноса протона в системе двух водородных связей в димерах и комплексах с водой.

7. Для пуриновых и пиримидиновых оснований в отвердевшем аргоне получены значения максимумов полос чисто электронных переходов, которые наряду со значениями колебательных мод электронно-колебательного спектра были использованы для обнаружения таутомерного равновесия.

8. Введение заместителей в 5 и 6 положения урацила (физиологически активные соединения) фиксирует кетонные формы молекул и не приводит к образованию енольных таутомеров, как это на протяжении 20 лет постулировалось в литературе. Однако, обнаруженное для производных урацила свойство образовывать комплексы с переносом протона с основаниями может приводить к нарушению принципа комплементарного спаривания.

9. Показано, что нуклеотидные основания образуют комплексы с переносом заряда и ион-радикальные соли. Этот вывод явился основой модельного представления об интеркаляции в ДНК соединений с выраженными электроноакцепторными свойствами. Исследование связывания ДНК с катионными и молекулярными формами акридиновых соединений подтверждает выбранную модель.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые для исследования задач биоорганической химии и биофизики использован метод низкотемпературной оптической спектроскопии молекул, изолированных в матрицах отвердевших инертных газов. Инертные газы – аргон, ксенон, криптон, используемые обычно в качестве матриц, обладают рядом существенных преимуществ: они прозрачны в широком спектральном диапазоне – от вакуумного УФ до дальней ИК области, кроме того, исследуемые молекулы, окруженные атомами инертного газа, испытывают очень слабое возмущение со стороны матрицы, о чем свидетельствуют незначительные сдвиги частот колебательных переходов матрично-изолированных соединений по сравнению с газовыми спектрами (Nowak, 1980). В этом смысле метод матричной изоляции дает возможность сопоставлять экспериментальные результаты с данными

квантовохимических расчетов, широко применяемых в биоорганической химии. Высокая информативность колебательных (линейчатый спектр) и электронно-колебательных (тонкая структура) спектров позволяет решать фундаментальные задачи биофизики и биоорганической химии: структуры и динамики молекул; процессов межмолекулярного взаимодействия; внутримолекулярной водородной связи; воздействия широкого спектра излучения на биоорганические молекулы.

Экспериментальные результаты настоящей работы по изучению прототропной таутомерии нуклеотидных оснований широко цитируются в литературе и были подтверждены спустя 1-5 лет в работах крупнейших научных центров мира.

На следующем этапе исследований в нашей лаборатории получены новые данные о структуре изолированных в аргоне аминокислот [41, 51], что в дальнейшем позволит моделировать тонкие особенности строения пептидов и получить прецизионные экспериментальные данные межмолекулярного взаимодействия нуклеотидных оснований и аминокислот.

Результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Луцкий А.Е., Волченко С.А., Каневская З.М., Шеина Г.Г. О некоторых закономерностях в электронно-колебательных спектрах тризамещенных бензола // Журн. прикл. спектроскоп. - 1970. - 13, N 2. - С. 293-300.
2. Луцкий А.Е., Семенов С.В., Шеина Г.Г., Гранжан В.А. Электронное взаимодействие в полифункциональных органических соединениях // Журн. физ. химии. - 1971. - 45, N 4. - С. 754-758.
3. Луцкий А.Е., Шеина Г.Г. Взаимодействие функциональных групп полизамещенных анилина и фенола // Журн. общей химии. - 1971. - 41. - С. 1136-1142.
4. Луцкий А.Е., Шеина Г.Г., Конельская В.М., Белоус А.В. Валентные колебания нитрогруппы полизамещенных бензола // Журн. прикл. спектр. - 1971. - 45, N 5. - С. 855-859.
5. Близнюков В.И., Луцкий А.Е., Шеина Г.Г. Электронно-колебательные спектры аминитроанизолов // в сб. Вестник Харьк. политехн. ин-та, сер. хим. - Харьков: изд. ХГУ. 1971. - С. 10-12.
6. Луцкий А.Е., Шеина Г.Г., Семенов С.В., Белоус А.В. Корреляция характеристик колебательных спектров с параметрами электронного

- взаимодействия функциональных групп // Теоретич. и эксперим. химия. - 1972. - 8, N 2. - С. 162-168.
7. Луцкий А.Е., Шеина Г.Г., Горохова Н.И. Корреляция частот валентных колебаний $\nu(\text{NH})$ и $\nu(\text{OH})$ со значениями π -электронных зарядов на атомах N и O // Оптика и спектроск. - 1972. - 32. - С. 628-630.
 8. Луцкий А.Е., Кривелева Н.А., Шеина Г.Г. О влиянии электронно-акцепторных заместителей на протонодонорную способность группы NH в нафтилацетамидах // Журн. общей химии. - 1975. - 45. - С. 427-432.
 9. Луцкий А.Е., Кривелева Н.А., Шепель А.В., Погорелый В.К., Шеина Г.Г., Митичкин А.И. Протонодонорная способность группы C-H во внутримолекулярной водородной связи // Журн. общей химии. - 1975. - 45. - С. 663-672.
 10. Луцкий А.Е., Клепанда Т.И., Шеина Г.Г., Батракова Л.П. ИК-спектры систем с кислотно-основным взаимодействием молекул в недиссоциирующих средах. 1. Взаимодействие фенолов с триэтиламином // Журн. общей химии. - 1976. - 46. - С. 1356-1361.
 11. Луцкий А.Е., Клепанда Т.И., Шеина Г.Г., Батракова Л.П. ИК-спектры систем с кислотно-основным взаимодействием молекул в недиссоциирующих средах. 2. Взаимодействие фенолов с азаароматическими аминами // Журн. общей химии. - 1976. - 46. - С. 1361-1368.
 12. Луцкий А.Е., Клепанда Т.И., Шеина Г.Г., Батракова Л.П. ИК-спектры и взаимодействие с аминами фенолов с внутримолекулярной водородной связью // Журн. прикл. спектроск. - 1976. - 25, N 4. - С. 735-737.
 13. Шеина Г.Г., Благой Ю.П. Комплексы с переносом заряда азотистых оснований нуклеиновых кислот. - 1976. - 21 с. (Препринт/АН УССР: ФТИНТ 86).
 14. Шеина Г.Г., Радченко Е.Д., Благой Ю.П., Веркин Б.И. Комплексы с переносом заряда оснований нуклеиновых кислот // Докл. АН СССР. - 1978. - 240, N 2. - С. 463-466.
 15. Sheina G.G., Radchenko E.D., Egupov S.A., Blagoi Yu.P., Orlov V.M. Charge transfer interactions between nucleic acid bases acceptor // Int. J. Quant. Chem. - 1979. - 16. - P. 387-394.
 16. Шеина Г.Г., Радченко Е.Д., Егупов С.А., Благой Ю.П., Орлов В.М. Взаимодействия с переносом заряда оснований нуклеиновых кислот с сильным акцептором // в кн. Успехи квантовой химии и

- квантовой биологии. - Киев: Наукова думка. - 1980. - 2. - С. 457-465.
17. Шеина Г.Г., Благой Ю.П. Криогенно-вакуумная приставка для получения и спектрофотометрирования молекулярных комплексов // Приборы и техника эксперим. - 1980. - N 1. - С. 252-254.
 18. Blagoi Yu.P., Sheina G.G., Luzanov A.V., Silina L.K., Pedash Yu.F., Rubin Yu.V., Leibina Ye.A. Effect of substituents on electron energy redistribution in uracil derivatives and their ionization in polar solvents // Int. J. Quant.Chem. - 1980. - 18. - P. 913-920.
 19. Благой Ю.П., Шеина Г.Г., Лузанов А.В., Силина Л.К., Педаш В.Ф., Рубин Ю.В., Лейбина Е.А. Влияние заместителей на перераспределение электронной энергии производных урацила и их ионизацию в полярных растворителях // в кн. Успехи квантовой химии и квантовой биологии. - Киев: Наукова думка. - 1980. - 2. - С. 25-32.
 20. Sheina G.G., Blagoi Yu.P., Radchenko E.D. Spectroscopic study of intermolecular interaction of nucleic acid bases and biologically active compounds in solution, thin films at low temperature // Studia biophys. - 1980. - 79. - P. 89-90.
 21. Plokhotnichenko A.M., Blagoi Yu.P., Sheina G.G., Radchenko E.D. New data on the molecular structure of monomeric and associated cytosine in noble gas matrix // Studia biophys. - 1982. - 87, N 2/3. - P. 251-252.
 22. Шеина Г.Г., Лиманский А.П., Чернецкий В.П., Алексеева И.В., Педаш В.Ф. Спектральное и квантовохимическое изучение физико-химических свойств производных 6-азаурацила // в сб. Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов. - Рига. - 1982. - С. 139.
 23. Sheina G.G., Plokhotnichenko A.M., Blagoi Yu.P., Radchenko E.D. Intermolecular interactions of matrix-isolated pyrimidine bases of nucleic acids according to electro-oscillation spectrum of DNA // Studia biophys. - 1982. - 87, N 2/3. - P. 249-250.
 24. Шеина Г.Г., Плохотниченко А.М., Радченко Е.Д., Благой Ю.П. Электронно-колебательные спектры пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот в аргоновых матрицах // Биофизика. - 1982. - 27, N 6. - P. 983-987.
 25. Радченко Е.Д., Плохотниченко А.М., Шеина Г.Г., Благой Ю.П.

- Инфракрасные спектры цитозина и его производных в аргоновой матрице при низкой температуре // Биофизика. - 1983. - 28, N 4. - P. 559-563.
26. Радченко Е.Д., Плохотниченко А.М., Шеина Г.Г., Благой Ю.П. Инфракрасные спектры урацила и тимина в аргоновой матрице // Биофизика. - 1983. - 28, N 6. - P. 923-927.
 27. Blagoi Yu.P., Sheina G.G., Radchenko E.D. Studies of structure and molecular interaction of nucleic acid bases by matrix isolation method // Studia biophys. - 1984. - 101. - P. 29-30.
 28. Radchenko E.D., Sheina G.G., Smorygo N.A., Blagoi Yu.P. Experimental and theoretical studies of molecular structure features of cytosine // J. Mol. Struct. - 1984. - 116. - P. 387-397.
 29. Sheina G.G., Limanskii A.P., Stepanova T.F., Blagoi Yu.P. Studies of cationic and neutral forms of acridine compound interaction with nucleic acids // Studia biophys. - 1984. - 100, N 3. - P. 187-194.
 30. Радченко Е.Д., Плохотниченко А.М., Шеина Г.Г., Благой Ю.П. Инфракрасные и электронно-колебательные спектры аденина и его замещенных в матрице аргона // Биофизика. - 1984. - 29, N 6 - С. 553-559.
 31. Шеина Г.Г., Радченко Е.Д., Благой Ю.П. Кето-енольная таутомерия гуанина // Докл. АН СССР. - 1985. - 282, N 6. - С. 1497-1501.
 32. Шеина Г.Г., Радченко Е.Д., Степаньян С.Г., Иванов А.Ю., Благой Ю.П. Колебательные спектры гипоксантина // Биофизика. - 1986. - 31, N 6. - С. 555-560.
 33. Радченко Е.Д., Плохотниченко А.М., Иванов А.Ю., Шеина Г.Г., Благой Ю.П. Кето-енольная таутомерия гуанина и изоцитозина // Биофизика. - 1986. - 31, N 3. - С. 373-381.
 34. Stepanian S.G., Sheina G.G., Radchenko E.D., Blagoi Yu.P. Theoretical and experimental studies of adenine, purine and pyrimidine isolated molecule structure // J. Mol. Struct. - 1985. - 124. - P. 333-346.
 35. Sheina G.G., Radchenko E.D., Stepanian S.G., Blagoi Yu.P. Prototropic tautomerism of nucleic acid purine bases // Studia biophys. - 1986. - 114, N 1/3. - P. 123-131.
 36. Radchenko E.D., Sheina G.G., Blagoi Yu.P. Cytosine tautomeric form hydration // Studia biophys. - 1986. - 111, N 2-3. - P. 115-118.
 37. Sheina G.G., Stepanian S.G., Radchenko E.D., Blagoi Yu.P. IR

- spectra of guanine and hypoxanthine isolated molecules // *J. Mol. Struct.* - 1987. - 158. - P. 275-292.
38. Blagoi Yu.P., Radchenko E.D., Stepanian S.G., Sheina G.G. Vibrational spectra and molecular structure of nucleic acid and protein constituents in low temperature matrices // From: *Laser scattering spectroscopy of biological objects (Studies in Phys. and Theor. Chemistry, vol. 45)* Eds.: J.Stepanek, P.Anzenbacher and B.Sedlacek. - Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo: Elsevier. - 1987. - P. 161-179.
 39. Шеина Г.Г., Есипов С.Е., Иванов А.Ю., Степаньян С.Г. Структура и физико-химические свойства изолированных молекул реумицина // *Антибиотики и медицинская биотехнология.* - 1987. - 32, N 2. - С. 111-115.
 40. Степаньян С.Г., Шеина Г.Г., Радченко Е.Д., Благой Ю.П. Молекулярная структура изолированных молекул урацила и 5,6-дигидроурацила // *Биофизика.* - 1987. - 32, N 3. - С. 512-514.
 41. Шеина Г.Г., Радченко Е.Д., Иванов А.Ю., Степаньян С.Г., Благой Ю.П. Колебательные спектры лейцина // *Журн. физ. химии.* - 1988. - 62, N 4. - С. 985-990.
 42. Шеина Г.Г., Радченко Е.Д., Плохотниченко А.М., Благой Ю.П. ИК-спектры ассоциированных и гидратированных пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот в аргоновой матрице // *Биофизика.* - 1988. - 33, N 5. - P. 741-746.
 43. Степаньян С.Г., Шеина Г.Г., Радченко Е.Д., Благой Ю.П. Инфракрасные спектры и таутомерия изоцитозина в аргоновой матрице // *Журн. физ. химии.* - 1989. - 63, N 11. - P. 3008-3013.
 44. Степаньян С.Г., Радченко Е.Д., Шеина Г.Г., Благой Ю.П. Конформационный анализ 5-замещенных урацила // *Биофизика.* - 1989. - 34, N 5. - С. 753-757.
 45. Stepanian S.G., Radchenko E.D., Sheina G.G., Blagoi Yu.P. MNDO and IR spectroscopic studies of tautomerism of isocytosine // *J. Mol. Struct.* - 1990. - 216. - P. 77-90.
 46. Blagoi Yu.P., Radchenko E.D., Stepanian S.G., Sheina G.G. Vibrational spectra and molecular structure of nucleic acid bases and their complexes in low temperature matrices // *J. Mol. Struct.* - 1990. - 219. - P. 311-316.
 47. Stepanian S.G., Smorygo N.A., Sheina G.G., Radchenko E.D., Yakovleva V.D., Rusavskaya T.N., Studentsov E.P., Ivin B.A., Blagoi Yu.P. Studies of vibrational spectra of 6-fluorothymine

and its methyl derivatives // Spectrochimica Acta. - 1990. - 46A. - P. 355-361.

48. Шеина Г.Г., Степаньян С.Г., Радченко Е.Д., Благой Ю.П. Исследование методом МПДЛ/ВС механизмов межмолекулярного переноса протона в изоцитозине // Журн. физ. химии. - 1991. - 65, N 8. - P. 2120-2124.
49. Степаньян С.Г., Шеина Г.Г., Радченко Е.Д., Благой Ю.П. Теоретическое исследование гидратации, автоассоциации и протонного обмена в пиримидиновых основаниях. - Харьков. - 1991. - 41 с. - (Препринт / АН УССР: ФТИНТ 6-91).
50. Пивоваров В.Б., Шеина Г.Г. Таутомерия изоцитозина в растворе // Биополимеры и клетка. - 1992. - 8, N 1. С. 51-56.
51. Радченко Е.Д., Рева И.Д., Плохотниченко А.М., Степаньян С.Г., Шеина Г.Г., Благой Ю.П. Изучение молекулярной структуры глицина методом ИК-спектроскопии в криоматрицах // Биополимеры и клетка. - 1992. - 8, N 1. С. 62-72.

Соискатель

Шеина

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарю судьбу, подарившую мне возможность учиться в аспирантуре у профессора, доктора химических наук Аркадия Вфимовича Луцкого, получить основные навыки и вкус к научно-исследовательской работе в интересной области знания - спектроскопии органических молекул, ставшей основой настоящей работы.

Я бесконечно благодарна академику АН Украины Борису Иеремьевичу Верияну (к сожалению, ушедшему от нас) за предоставленную возможность проводить исследования в биофизическом отделе ФТИНТ АН Украины и научную помощь в обсуждении результатов.

Настоящее исследование было бы невозможно без принципиальной поддержки директора института, академика АН Украины Виктора Валентиновича Еременко в проведении биофизических исследований и возможности использования материальных ресурсов и криогенно-технической базы института в нетрадиционной области физико-химических исследований.

Выполняю свой приятный долг по отношению к коллегам и выражаю глубокую благодарность

доктору физико-математических наук, профессору Юрию Павловичу Благому в становлении, развитии метода матричной изоляции и широкое обсуждение результатов работы;

кандидату физико-математических наук Евгению Дмитриевичу Радченко и Александру Мартыновичу Плотниченко за сподвижничество в работе, создание низкотемпературной установки и проведение прецезионных спектральных измерений сложных органических молекул при гелиевых температурах;

кандидату физико-математических наук Степану Григорьевичу Степаньяну за проведение расчетов колебательных спектров и решение квантовохимических задач;

научным сотрудникам Александру Юрьевичу Иванову, Валерию Борисовичу Пивоварову, Игорю Дмитриевичу Ребе за частные измерения в рамках моей диссертационной работы.

30 июля 1992 года

Таша

Ав 25.663

ШЕИНА Галина Григорьевна

Ответственный за выпуск - доктор физико-математических наук, профессор БЛАГОЙ В.П.

Подписано к печати 4 августа 1992 г.

Физ.п.л. 2,5 , учетн.изд.л. 2,5, заказ № 118 , тираж 100 экз.

Ротапринт ФТИНТ АН Украины, 310164, Харьков-164, пр.Ленина, 47