

8. *Hantgan R., Hermans J.* Assembly of fibrin. Light scattering study // *J. Biol. Chem.*—1979.—254, N 22.—P. 11272—11282.
9. *Варецкая Т. В.* Строение и свойства фибриногена и фибрина. Самосборка волокон фибрина: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.—Киев, 1977.—40 с.
10. *Keil B.* Trypsin // *The enzymes*; Ed. P. D. Boyer.—New York: Acad. press, 1971.—Vol. 3.—P. 249—275.
11. *Roberts P. S., Hughes H. N., Fleming P. B.* Effects of Hepes buffer on clotting tests, assay of factors V and VIII and on hydrolysis of esters by thrombin and thrombokinase // *Thromb. and Haemost.*—1976.—35, N 1.—P. 202—210.
12. *Human thrombin: Preparative evaluation, structural properties, and enzymic specificity* / J. W. Fenton, B. H. Landis, D. A. Walz et al. // *Chemistry and physiology of human plasma proteins* / Ed. D. H. Bing.—New York: Pergamon press, 1979.—P. 151—173.
13. *Варецкая Т. В.* Микрогетерогенность фибриногена: Кривофибриноген // *Укр. биохим. журн.*—1960.—32, № 1.—С. 13—27.
14. *Варецкая Т. В.* Получение фибрин-мономера и изучение некоторых его свойств // *Там же.*—1965.—36, № 4.—С. 194.
15. *Human thrombins: production, evaluation, and properties of thrombin* / J. W. Fenton, M. J. Fasco, A. B. Stackrow et al. // *J. Biol. Chem.*—1977.—252, N 11.—P. 3587—3598.
16. *Lewis S. D., Shafer J. A.* A thrombin assay based upon the release of fibrinopeptide A from fibrinogen: definition of a new thrombin unit // *Thromb. Res.*—1984.—35, N 2.—P. 111—120.
17. *Steven F. S., Griffin M. M.* Inhibition of thrombin cleavage of fibrinogen by polyestradiol phosphate; interaction with the crucial arginine residues in fibrinogen required for enzymic cleavage // *Int. J. Biochem.*—1982.—14, N 3.—P. 699—700.
18. *Fusco M. J., Fenton J. W. II.* Specificity of thrombin. I. Esterolytic properties of thrombin with derivatives of *pNPGb* // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1973.—159, N 4.—P. 802—812.
19. *Kull F. J., Vellekamp G. J., Button E.* Ionic strengths and enzyme activities // *TIBS.*—1982, September.—P. 318.
20. *Алексеевко Л. П.* Методы определения активности протеолитических ферментов // *Соврем. методы в биохимии.*—М.: Медицина, 1977.—С. 119—120.
21. *Belitscr V. A., Varetskaja T. V., Malneva G. V.* Fibrinogen-fibrin interaction // *Biochim. et biophys. acta.*—1968.—154, N 2.—P. 367—375.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии АН УССР, Киев

Получено 28.08.89

NDK 535 577

© Н. П. Остапенко, Ю. А. Скрышевский,
А. К. Гадацук, Ю. В. Рубин

ПРИРОДА ДЕФЕКТНЫХ СОСТОЯНИЙ В КРИСТАЛЛАХ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Метод термостимулированной люминесценции применен для исследования дефектных состояний в кристаллах оснований нуклеиновых кислот (ОНК) различной степени чистоты, облученных УФ-светом в интервале 5—300 К или γ -лучами при 77 и 300 К. Обнаружены люминесцентные носители заряда в чистых кристаллах. На основе сравнения кривых термостимулирования (ТВ) кристаллов цитозина и его метилпроизводных и сопоставления их с результатами квантовохимических расчетов потенциалов ионизации таутомерных форм молекул цитозина сделан вывод о наличии таутомеров в исследованных кристаллах. В кристаллах цитозина моногидрата, облученных γ -лучами, обнаружены дефекты, образованные в результате взаимодействия молекул цитозина с продуктами радиолитической воды.

Кристаллы ОНК являются модельными объектами для изучения процессов радиационного повреждения, а также оптических и фотоэлектрических свойств сложных биологических систем. Экспериментальные данные о дефектах в этих кристаллах крайне малочисленны и получены в основном методами фотопроводимости и термостимулированной люминесценции (ТСЛ) [1—3]. Однако природа этих дефектов до сих пор оставалась неизвестной.

Установлено, что в свободном состоянии молекулы ОНК претерпевают различные таутомерные превращения, например, кетонольные и амин-иминные [4, 5]. Данные о существовании таутомеров в кристаллах ОНК отсутствуют. Из рентгеноструктурных исследований извест-

но, что эти кристаллы образованы молекулами канонической формы [6, 7]. Вместе с тем молекулы таутомеров, внедренные в кристалл, представляют собой дефект решетки и могут создавать ловушки для экситонов и носителей заряда.

В данной работе методом ТСЛ исследована природа дефектов решетки в кристаллах ОНК. ТСЛ представляет собой излучение, возникающее при нагреве предварительно облученных кристаллов вследствие рекомбинации носителей заряда противоположных знаков. Для ее

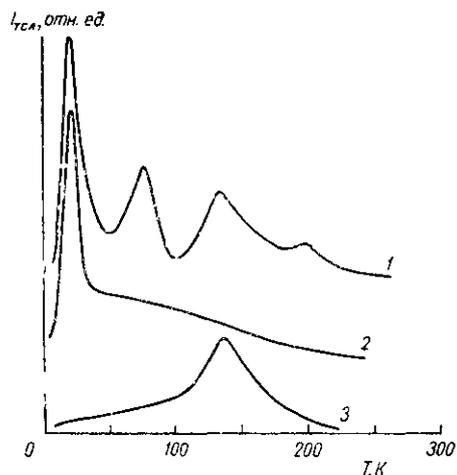


Рис. 1. Кривые ТВ кристаллов цитозина (1), 1-МЦ (2) и 1, 4-ДМЦ (3), облученных УФ-светом при $T_{обл}=5$ К

Fig. 1. TL glow curves of cytosine crystals (1), 1-MC (2) and 1,4-DMC (3) excited with UV-light at $T_{ex}=5$ K

Рис. 2. Зависимость кривых ТВ кристалла ЦМГ, облученного УФ-светом, от $T_{обл}$: 1—5; 2—50; 3—80; 4—150; 5—200 К

Fig. 2. TL glow curves of CMH crystals excited with UV-light at T_{ex} : 1—5 K, 2—50 K, 3—80 K, 4—150 K, 5—200 K

возбуждения образцы облучали при $T_{обл}=5-300$ К светом ртутной лампы ДРШ-500М или при $T_{обл}=77$ и 300 К γ -лучами с энергией 1,25 МэВ от источника ^{60}Co . Далее образцы нагревали с постоянной скоростью 5 К/мин. Сигнал ТСЛ регистрировали ФЭУ-106. Спектры флюоресценции и фосфоресценции записывали на спектрометре СДЛ-1.

Исследовали поликристаллические порошки цитозина, 1-метилцитозина (1-МЦ), 1, 4-диметилцитозина (1, 4-ДМЦ), аденина, гуанина, тимина, урацила и кристаллы цитозина моногидрата (ЦМГ) в зависимости от чистоты исходных препаратов и условий возбуждения ТСЛ. Использовали препараты ОНК чистоты «хч», «ч», «чда», а также очищенные многократной перекристаллизацией. Кристаллы ЦМГ выращивали из растворов цитозина в бидистилляте.

Энергетический спектр ловушек носителей заряда определен методом частичного ТВ [8]. Точность определения глубин ловушек составляет $\pm 10\%$.

Установлено, что для всех исследованных кристаллов ОНК наблюдается ТСЛ, т. е. все кристаллы содержат дефекты. При этом кривые ТВ являются структурными только в случае цитозина, 1-МЦ, 1, 4-ДМЦ (рис. 1), ЦМГ (рис. 2) и гуанина. Кривые ТВ аденина, тимина и урацила имеют одну широкую слабоструктурную полосу, расположенную в интервале 5—250 К, с максимумами соответственно при 130, 110 и 140 К.

Рассмотрим особенности ТСЛ кристаллов ОНК на примере цитозина и ЦМГ. Из рис. 1 (кривая 1) и рис. 2 видно, что кривые ТВ этих кристаллов состоят из четырех хорошо разрешенных полос. Глубины соответствующих ловушек в кристаллах цитозина и ЦМГ соответственно равны 0,05; 0,09; 0,17; 0,36 и 0,06; 0,10; 0,27; 0,58 эВ.

Исследования показали, что формы кривых ТВ изученных кристаллов зависят от способа облучения (УФ-свет или γ -лучи), $T_{обл}$, времени облучения ($t_{обл}$) и степени чистоты исходных препаратов.

Зависимость интенсивности полос ТВ от $t_{обл}$ вначале имеет линейный характер, а затем наступает насыщение и спад, что связано с процессами захвата носителей заряда в ловушки различной глубины. Причем увеличение времени облучения не приводит к накоплению новых дефектов в кристалле, что согласуется с результатами, полученными для аденина [3]. Таким образом, кристаллы ОНК являются радиационно стойкими.

Увеличение $T_{обл}$ от 5 до 50 К приводит к уменьшению интенсивности всех полос ТВ кристалла ЦМГ примерно на 40% (рис. 2). При дальнейшем росте $T_{обл}$ наряду с уменьшением интенсивности ТСМ происходит исчезновение наиболее низкотемпературных полос ТВ, если их $T_{max} \leq T_{обл}$, что связано с процессами освобождения носи-

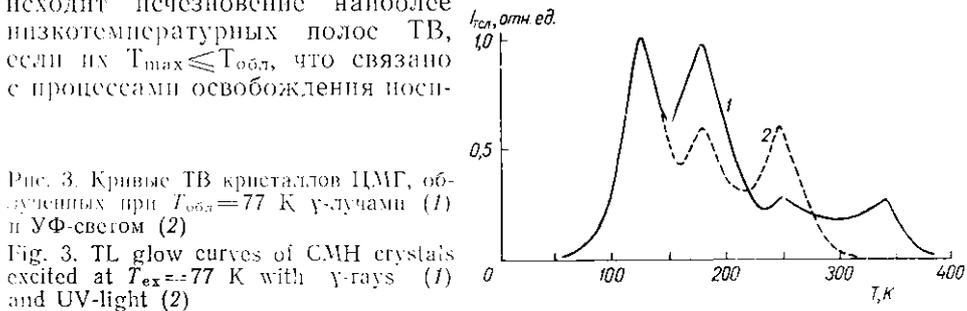


Рис. 3. Кривые ТВ кристаллов ЦМГ, облученных при $T_{обл}=77$ К γ -лучами (1) и УФ-светом (2)

Fig. 3. TL glow curves of CMH crystals excited at $T_{ex}=77$ K with γ -rays (1) and UV-light (2)

телей заряда из соответствующих ловушек. Следует подчеркнуть, что облучение кристаллов ОНК при $T_{обл} \geq 77$ К, характерное для известных работ [3, 9], приводит к потере части информации о дефектных состояниях в кристаллах.

Заметим, что после облучения кристаллов ОНК при достаточно высоких температурах, например при 77 К, и последующем их охлаждении до 5 К наблюдается длительное послесвечение, отличающееся гиперболической кинетикой затухания. Это свидетельствует о туннельной рекомбинационной люминесценции [3].

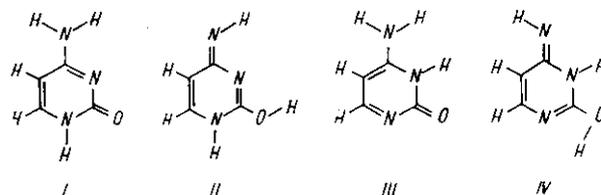
На рис. 3 приведены кривые ТВ кристаллов ЦМГ, облученных γ -лучами и УФ-светом при $T_{обл}=77$ К. Видно, что при облучении γ -лучами на кривых ТВ наблюдается новая полоса с максимумом при $T_{max} \approx 340$ К, исчезновение которой сопровождает процесс дегидратации ЦМГ. По-видимому, эта полоса связана с дефектами, образованными в результате взаимодействия молекул цитозина с продуктами радиолиза воды, поскольку на кривых ТВ γ -облученных кристаллов цитозина дополнительных полос нет.

Исследования кривых ТВ кристаллов цитозина различной чистоты показали, что при прочих одинаковых условиях число полос на кривых ТВ цитозина зависит от чистоты препарата. При этом на кривых ТВ всех партий цитозина всегда наблюдаются две самые низкотемпературные полосы с максимумами при 25 и 75 К, отвечающие самым мелким ловушкам с глубинами 0,05 и 0,09 эВ соответственно. Эти ловушки не могут быть связаны с дефектами структуры, например с дислокациями, так как экспериментально установлено, что наблюдаемые ловушки образованы моноэнергетическими уровнями в отличие от квази-непрерывного распределения, характерного для ловушек структурного происхождения [3, 10]. Связь с димерами также исключается, поскольку глубины соответствующих ловушек, согласно расчетам [11], значительно больше и составляют примерно 0,3 эВ.

Следовательно, самые мелкие ловушки в цитозине и ЦМГ с глубинами 0,05 и 0,09 эВ, присутствующие во всех препаратах независимо от их чистоты, по-видимому, образованы молекулами, подобными молекулам кристалла, например конформерами и таутомерами. Остальные более глубокие ловушки, наличие которых зависит от чистоты препарата, возможно, связаны с неконтролируемыми примесями.

Согласно рентгеноструктурным данным [6, 7], в кристаллах цитозина и ЦМГ молекулы плоские, т. е. образование конформеров в кристаллах маловероятно. Поэтому возможно, что дефекты решетки в данном случае связаны с таутомерами.

Поскольку основными носителями заряда в кристаллах ОНК являются дырки [1], можно предположить, что полосы на кривых ТВ связаны с ловушками дырок. Следовательно, в кристаллах цитозина и ЦМГ ловушки могут создавать только те таутомеры, которые имеют более низкие потенциалы ионизации, чем у молекул канонической формы (I). Согласно результатам квантовохимических расчетов [12, 13], существуют три такие таутомерные формы (II) — (IV).



Для проверки этого предположения исследованы кривые ТВ кристаллов метилпроизводных цитозина, процессы таутомеризации в которых существенно зависят от положения заместителей. В случае 1-МЦ возможна только одна таутомерная форма с низким потенциалом ионизации. В 1, 4-ДМЦ образование таутомеров будет значительно затруднено, так как введение заместителя в аминогруппу увеличивает энергию связи атомов азота и водорода [14].

Из рис. 1 (кривые 2 и 3) видно, что на кривой ТВ 1-МЦ присутствует только одна низкотемпературная полоса с максимумом при 25 К, а в 1, 4-ДМЦ отсутствуют обе низкотемпературные полосы. Это подтверждает наше предположение о связи мелких ловушек в цитозине и ЦМГ с таутомерами.

Таким образом, на основе исследований кривых ТВ 1-МЦ и 1, 4-ДМЦ можно предположить, что таутомерная форма (II) молекулы цитозина ответственна за полосу ТВ с максимумом при 25 К, а одна из форм (III) или (IV) — за полосу при 75 К.

Полученные данные показывают, что метод ТСЛ является эффективным инструментом исследования дефектных состояний в кристаллах ОНК. Он демонстрирует возможность изучения природы дефектов как в препаратах различной степени чистоты, так и подвергнутых γ -облучению. Установлено, что спектры флюоресценции и фосфоресценции менее чувствительны к идентификации дефектных состояний в кристаллах ОНК.

Авторы выражают благодарность С. А. Самоїленко за предоставление препаратов цитозина и обсуждение результатов.

THE NATURE OF DEFECTIVE STATES IN CRYSTALS OF NUCLEIC ACID BASES

N. I. Ostapenko, Yu. A. Skryshevsky, A. K. Kalashchuk, Yu. V. Rubin
Institute of Physics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The thermostimulated luminescence method was applied to study defective states in crystals of nucleic acid bases of various purity degrees, irradiated with the UV light within a range of 5-300 K or with γ -rays at 77 and 300 K. Carrier traps have been found in pure crystals. Comparing thermoluminescence curves for crystals of cytosine and its methyl derivatives and using results of quantum-mechanical calculations of ionization potentials of tautomeric forms of cytosine molecules, a conclusion has been drawn that some tautomers are present in the crystals studied. Defects resulting from interaction of cytosine molecules with water radiolysis products have been found in cytosine monohydrate crystals irradiated with γ -rays.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Subertova E., Silinsh E., Prosser V.* Some photoelectric properties of the nucleic acid bases in thin layers // *Czech. J. Phys.* В.- 1973.— 23, N 3.— P. 356-367.
2. *Черкасова Ю. А., Киселева М. Н., Додонова Н. И.* Квантовый выход фотогенерации носителей заряда в антрацене и основаниях нуклеиновых кислот в области энергий фотонов 3-10 эВ // *Оптика и спектроскопия.*— 1978.— 45, № 6.— С. 1126—1129.
3. *Jelinek O., Tule I. A.* Thermoluminescence and long afterglow of adenine in the solid state // *J. Luminescence.*— 1975.— 10, N 6.— P. 371—379.
4. *Пюльман Б., Пюльман А.* Квантовая биохимия.— М.: Мир, 1965.— 654 с.
5. *Инфракрасные спектры цитозина и его производных в аргоновой матрице при низкой температуре* / Е. Д., Радченко, А. М. Плохотниченко, Г. Г. Шенна, Ю. П. Благый // *Биофизика.*— 1983.— 28, № 4.— С. 559—563.
6. *Jeffrey G. A., Kinoshita J.* The crystal structure of cytosine monohydrate // *Acta Cryst.*— 1963.— 16, N 1.— P. 20—28.
7. *Barker D. L., Marsh R. E.* The crystal structure of cytosine // *Ibid.*— 1964.— 17, N 12.— P. 1581—1587.
8. *Thermal activation energies in NaCl and KCl crystals* / A. Halperin, A. A. Brauer, A. Ben-Zvi, N. Kristianpoller // *Phys. Rev.*— 1960.— 117, N 2.— P. 416—422.
9. *Tatake V. G., Desai T. S., Sano P. V.* Isothermal luminescence and thermoluminescence of nucleic acid bases following γ -irradiation // *Photochem. and Photobiol.*— 1976.— 24, N 4.— P. 463—472.
10. *Силинши Э. А.* Электронные состояния органических молекулярных кристаллов.— Рига: Зинатне, 1978.— 344 с.
11. *Курик М. В., Силинши Э. А.* Экситонные процессы в органических молекулярных кристаллах с дефектами // *Изв. АН ЛатвССР. Сер. физ. и техн. наук.*— 1984.— № 3.— С. 47—64.
12. *Goddard J. D., Mezey P. G., Csizmadia J. G.* A note on a non-empirical molecular orbital study of some cytosine and thymine tautomers // *Theoret. chim. acta (Berl.)*— 1975.— 39, N 1.— P. 1—6.
13. *Buda A., Sygula A.* MNDO study of the tautomers of nucleic bases. Part I. Uracil, thymine and cytosine // *J. Mol. Structure.*— 1983.— 92, N 3.— P. 255—265.
14. *Сандул Г. В., Куц В. С., Походенко В. Д.* Исследование методом ПМР термодинамики ассоциации ароматических аминов с основными растворителями // *Журн. общ. химии.*— 1973.— 43, № 1.— С. 180-186.

Ин-т физики АН УССР, Киев

Получено 05.06.89