ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ «МЕЖДУНАРОДНЫЙ ТОМОГРАФИЧЕСКИЙ ЦЕНТР» СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ПАНОВ МИХАИЛ СЕРГЕЕВИЧ

КОСВЕННОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ КОРОТКОЖИВУЩИХ ИНТЕРМЕДИАТОВ РЕАКЦИЙ С УЧАСТИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫХ МОЛЕКУЛ МЕТОДОМ ИМПУЛЬСНОГО ЯМР ^{1}H И ^{13}C

01.04.17 – Химическая физика, горение и взрыв,
физика экстремальных состояний вещества

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель

д.ф.-м.н. Юрковская Александра Вадимовна

Новосибирск-2019

Оглавление

Введение **5**

Глава 1. Обзор литературы **10**

1.1. Химически индуцированная поляризация ядер (ХПЯ). 10

1.1.1. Радикально-парный механизм возникновения ХПЯ 10

1.1.2. Зависимость сигнала ХПЯ от времени 15

1.1.3. Зависимость интенсивности сигнала в спектре ХПЯ от значения константы сверхтонкого взаимодействия. 17

1.1.4. Зависимость ядерной поляризации от напряженности магнитного поля. 18

1.2. Когерентный перенос поляризации в скалярно связанных системах ядерных спинов .. 19

1.3. Физико-химические свойства используемых реагентов. 24

1.3.1. Фотореакции с участием карбоксибензофенонов 24

1.3.2. Фотореакции с участием L-гистидина. 28

1.3.3. Фотореакции с участием цистеина и его S-алкилпроизводных 30

1.3.4. Фотореакции с участием S-метилглутатиона. 33

1.4. Эксцизионная репарация оснований ДНК под действием алкиладенин ДНК гликозилазы 35

1.5. Изучение динамики раскрытия ДНК дуплексов методом ЯМР 37

Глава 2. Экспериментальная часть **39**

2.1. Методы исследования 39

2.1.1. ХПЯ с временным разрешением (ВР-ХПЯ). 39

2.1.2. ХПЯ в переменных магнитных полях. 41

2.1.3. Запись двумерных спектров ЯМР. 45

2.1.4. Измерение кинетики обмена протонов с растворителем. 46

2.1.5. Измерение pH. 49

2.1.6. Квантово-химические расчеты. 49

2.2. Материалы и реактивы. 49

2.2.1. ДНК дуплексы. 50

2.2.2. Приготовление образцов растворов ДНК дуплексов. 50

2.3. Математическая обработка результатов. 51

Глава 3. Результаты и обсуждение. ... 52

3.1. Когерентные эффекты переноса поляризации имеют решающее значение для интерпретации данных низкополевой ХПЯ. ... 52

3.1.1. Проявление переноса поляризации в экспериментах по измерению низкополевой ХПЯ. 52

3.1.2. Когерентный перенос поляризации. ... 56

3.1.3. Эксперименты по непосредственному наблюдению когерентных биений в релаксации поляризации н-бутиламина ... 59

3.1.4. Заключение. ... 65

3.2. Фотоокисление гистидина 3,3',4,4' бензофенонтетракарбоновой кислотой в водном растворе. ... 66

3.2.1. Спектры ^{13}C ХПЯ. ... 66

3.2.2. Корреляция между интенсивностями в спектре ^{13}C ХПЯ и рассчитанными КСТВ... 69

3.2.3. Полевая зависимость сигналов ^{1}H ХПЯ. ... 71

3.2.4. Заключение. ... 73

3.3. Механизм реакции между ароматическими аминокислотами и триплетно-возбужденными карбоксибензофенонами, выявленный методом ХПЯ ... 74

3.3.1. Введение ... 74

3.3.2. Спектры геминальной ХПЯ ... 77

3.3.3. Пропорциональность между КСТВ и интенсивностью ХПЯ ... 78

3.3.4. Пропорциональность между КСТВ и интенсивностью ХПЯ ^{13}C в фотореакции ТСВР и гистидина ... 83

3.3.5. Заключение ... 84

3.4. Исследование фотосенсибилизированного окисления S-метилцистеина и S-метилглутатиона методом ХПЯ в водном растворе. ... 85

3.4.1. Спектры ВР-ХПЯ и кинетики. ... 85

3.4.2. Полевые зависимости ^{1}H ХПЯ. ... 92

3.4.3. Заключение. ... 97

3.5. Исследование динамики открытия-закрытия двойной спирали тридекамерных ДНК дуплексов методом ЯМР. ... 99

3.5.1. Отнесение сигналов протонов. ... 99

3.5.2. Температурная стабильность дуплекса. ... 101

3.5.1. Обмен протонов с молекулами воды. ... 104

3.5.2. Связь устойчивости дуплекса с механизмом репарации ферментом AAG. 109

3.6. Совпадающие сигналы в спектрах в жидкостном и твердофазном ^{1}H-фото-ХПЯ-ЯМР спектрах циклогексанона..... 112

3.6.1. ХПЯ в твердых телах 112

3.6.2. Спектры ХПЯ в циклогексане-d_{12}..... 114

3.6.3. Спектр ХПЯ в твердой матрице..... 117

3.6.4. Заключение..... 119

Основные результаты и выводы 120

Список используемых сокращений..... 122

Список литературы 124

Приложение 1..... 138

Введение

Актуальность темы исследования. Короткоживущие свободные радикалы играют важную роль во многих быстропротекающих химических и биохимических реакциях [1], поэтому исследование строения и реакционной способности свободных радикалов является актуальной задачей. Особый интерес вызывают свободные радикалы в биологических системах, однако их изучение сильно затруднено в тех случаях, когда радикалы либо не имеют сильной характерной полосы поглощения для исследования оптическими методами, либо являются слишком короткоживущими для их детектирования методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В таких ситуациях косвенный метод детектирования радикалов, основанный на явлении химической поляризации ядер (ХПЯ), может быть особенно полезным. Метод ХПЯ позволяет достоверно зарегистрировать радикалы с временем жизни даже на наносекундной шкале [2,3]. Регистрация осуществляется по сигналам диамагнитных продуктов реакции в спектрах ядерного магнитного резонанса (ЯМР), интенсивности которых, например, для геминальных продуктов пропорциональны константам сверхтонкого взаимодействия (СТВ) электрона с магнитными ядрами в радикале. На основе анализа амплитуды и знака этих сигналов в спектре ЯМР высокого разрешения с помощью ХПЯ можно установить структуру участвующих в геминальной реакции свободных радикалов. Дополнительным преимуществом этого метода является то, что он может быть применен при физиологических условиях (комнатная температура, водные растворы). В основе явления ХПЯ лежит спин-селективная рекомбинация радикальных пар, которая, в свою очередь, является результатом сохранения спина в ходе химических реакций. Это проявляется в том, что, хотя в спин-коррелированном триплетном состоянии радикалы формируются парами, только одно состояние радикальной пары (обычно синглетное) является реакционноспособным. Поскольку скорость синглет-триплетной эволюции радикальной пары зависит от ядерного спинового состояния радикалов, то продукты радикальной реакции образуются с разной скоростью для различных ядерных спиновых состояний. Как следствие, диамагнитные продукты рекомбинации имеют неравновесные населенности ядерных спиновых состояний, что проявляется в виде аномальной фазы и интенсивности сигналов ЯМР продуктов реакции. Изучая зависимость интенсивности сигналов ХПЯ от времени можно получить информацию о кинетике быстрых радикальных реакций. Зависимости ХПЯ от напряженности магнитного поля позволяет получить количественную информацию о соотношении сверхтонких взаимодействий электрона с магнитными ядрами в радикале и разности электронных взаимодействий с магнитным полем, обусловленных различием g-факторов радикалов и отвечающих за Δg-механизм синглет-триплетной эволюции РП. Поэтому, обладая таким набором данных, можно сделать определенные выводы об

электронной структуре короткоживущих промежуточных радикальных частиц и исследовать кинетику и механизм химических реакций, протекающих с их участием.

Окислительное разрушение белков лежит в основе ряда патологических воздействий: радиации, фотооблучения, неблагоприятных условий окружающей среды, различного рода заболеваний и биологического старения. При окислении белков те аминокислоты, в составе которых есть атом серы (метионин и цистеин), чаще всего подвергаются этому воздействию с образованием различных радикальных частиц. При этом установлено, что вышеупомянутые радикалы участвуют во многих процессах: реакции нейтрализации активных форм кислорода при окислительном стрессе [4], репарации ДНК [5], деградации центральной нервной системы, приводящей к болезням Паркинсона и Альцгеймера [4].

Наиболее общим механизмом окисления серосодержащих остатков является формирование катион-радикалов с радикальным центром на атоме серы. При этом известно [6,7], что механизм реакции и структура радикалов зависят от протонированного состояния ближайшего атома азота, а именно, от того есть ли на концевой аминогруппе неподеленная электронная пара или положительный заряд. Сильное спин-орбитальное взаимодействие, характерное для атома серы, вызывает синглет-триплетные переходы в РП. Это приводит к тому, что для синглет-триплетной эволюции роль магнитных взаимодействий, обусловленных различием электронных зеемановских частот (Δg- механизм) и сверхтонкое, становится несущественной. Поскольку они отвечают за спин-зависимый канал синглет-триплетных переходов в радикальных парах, формирование спиновой электронной и ядерной поляризации происходит неэффективно, что приводит к тому, что сигналы химической поляризации электронов и ядер (ХПЭ и ХПЯ) в таких радикалах либо очень малы, либо не регистрируются совсем. Несмотря на очень низкую интенсивность сигналов, методом ХПЯ было установлено [8–11], что механизм реакции и структура радикалов в большой степени зависят от того, что находится на ближайшем атоме азота: неподеленная пара или положительный заряд на концевой аминогруппе. Для S-центрированных радикалов свободной аминокислоты и дипептидов при расположении метионина на N-конце методом ХПЯ определено, что при взаимодействии с парой электронов на атоме азота образуется пятичленные циклические радикалы, содержащие трехэлектронные двухцентровые связи между атомами серы и азота [9]. Для цистеина и цистеин-содержащих олигопептидов подобные исследования ранее не проводились, но они были проведены в настоящей работе.

Помимо возникновения и гибели короткоживущих реакционноспособных радикалов, в контексте защиты организмов от химической деградации, интерес представляют также процессы репарации биополимеров, особенно ДНК. В работе систем ферментативной репарации ДНК, которые участвуют в устранении повреждений, открытым оставался вопрос о том, по какому

признаку происходит распознавание поврежденного участка молекулярными системами репарации [2]. Одна из гипотез состояла в том, что химически модифицированные азотистые основания образуют менее прочные водородные связи и менее эффективно связаны стэкинг-взаимодействиями с соседними основаниями по сравнению с их нативными аналогами, что сдвигает равновесие между открытым и закрытым состоянием двойной спирали ДНК для таких сайтов в сторону открытой формы. В свою очередь, увеличение времени, проводимого поврежденным основанием в открытом состоянии, и может послужить сигналом для запуска ферментативной системы репарации на данном участке ДНК. Для проверки этой гипотезы в данной работе методом ЯМР были экспериментально получены данные о константах скорости прямой и обратной реакций, а также о константах равновесия для реакции обратимого выворачивания азотистых оснований в тридекамерных дуплексов, содержащих в позиции 7 химически модифицированные азотистые основания, и проведено сравнение полученных данных с константами скорости реакции этих же дуплексов с ферментом системы репарации ДНК.

Цели и задачи исследования.

Целью данной работы было определение кинетических и магниторезонансных параметров короткоживущих радикалов биологических молекул различными методами ЯМР. Задачи:

- создание установки по измерению ХПЯ на ядрах ^{13}C;

- определение констант СТВ ^{13}C и структуры радикала 3,3',4,4'-тетракарбоксибензофенона (ТСВР) в его реакции с гистидином по спектрам ХПЯ ^{13}C, полученным с микросекундным временным разрешением;

- установление механизма реакции и магниторезонансных параметров короткоживущих радикалов серосодержащих аминокислоты S-метилцистеина и пептида S-метилглутатиона методами ХПЯ с временным разрешением и зависимости ХПЯ от магнитного поля;

- исследование механизма реакций ТСВР с ароматическими аминокислотами гистидином, тирозином и триптофаном;

- выявление переноса спиновой поляризации в диамагнитных продуктах реакций за счет скалярного взаимодействия в сильно-связанных спиновых системах;

- первое наблюдение ^{1}H ХПЯ в твердом теле при вращении образца под магическим углом.

- отработать методику и провести измерения динамики раскрытия ДНК тридекамерных дуплексов, содержащих химически модифицированные азотистые основания, с целью выявить, является ли реакции выворачивания оснований лимитирующей стадией процесса распознавания при энзиматической репарации ДНК.

Научная новизна. Методом ХПЯ было исследовано фотоокисление гистидина, S-метилцистеина и S-метилглутатиона в реакции с ТСВР, получены магниторезонансные

параметры короткоживущих частиц, возникающих при их одноэлектронном окислении. Впервые был получен спектр ХПЯ ^{13}C на природном содержании магнитного изотопа, из анализа полученного спектра были извлечены относительные константы СТВ с ядрами ^{13}C, что позволило установить структуру промежуточного радикала фотосенсибилизатора (3,3’,4,4’-тетракарбоксибензофенона, ТСВР).

Впервые были получены сайт-специфичные данные о константах равновесия между открытой и закрытой формами азотистых оснований в тридекамерных ДНК дуплексах, канонического строения и содержащих химически модифицированные нуклеотиды в положении 7.

Впервые был получен спектр ^{1}H ХПЯ в твердой матрице при вращении исследуемого образца под магическим углом.

Практическая значимость работы. На основе полученных данных о константах СТВ ядер ^{13}C была определена структура радикалов ТСВР, возникающих в ходе реакции фотоокисления ароматических аминокислот гистидина, тирозина и триптофана.

Используя сайт-специфичные данные о константах равновесия между открытой и закрытой формами ДНК дуплексов с химически модифицированными азотистыми основаниями, был сделан вывод, что на скорость репарации влияет не стабильность двойной спирали дуплекса, а скорость химических процессов гидролиза гликозидной связи.

Впервые полученный спектр ^{1}H ХПЯ в растворе циклогексанона указывает на сходство механизмов создания эффектов ХПЯ в твердом теле и в жидкости.

Методы исследования. В работе было использовано комплементарное сочетание времяразрешенной ХПЯ и зависимости ХПЯ от магнитного поля, что позволяет определить такие магниторезонансные параметры, как константы СТВ, разность g-факторов и времена ядерной парамагнитной релаксации короткоживущих радикалов. Также в работе были использованы методики ЯМР высокого разрешения, такие как спектроскопия в присутствии химического обмена и двумерные варианты ЯМР. Также в работе были проведены расчеты структуры и магниторезонансных параметров методом функционала плотности (DFT).

Положения, выносимые на защиту. На защиту выносятся:

1. Установлен механизм и структура радикалов на геминальной стадии фотореакции ТСВР с ароматическими аминокислотами из сравнительного анализа интенсивностей сигналов в спектрах ХПЯ ^{13}C и ^{1}H и данных о константах СТВ, рассчитанных методом DFT.
2. Структуры короткоживущих радикалов S-метилцистеина и S-метилглутатиона и механизм реакции при различных значениях pH водных растворов.
3. Первое наблюдение ^{1}H ХПЯ в твердой матрице.

4. Данные о константах скорости и о равновесии между открытой и закрытой формами для ряда тридекамерных ДНК дуплексов, содержащих химически модифицированные азотистые основания, полученные из зависимости скорости обмена протонов этих оснований от концентрации акцепторов протона в водном растворе.

Степень достоверности полученных результатов. Достоверность выводов и результатов обеспечена использованием достаточно хорошо известных и апробированных методов. Вновь полученные результаты согласуются с известными ранее данными, а в некоторых случаях позволяют дискриминировать различные гипотезы относительно механизмов протекающих процессов.

Апробация результатов. Результаты, представленные в диссертационной работе, докладывались соискателем и обсуждались на следующих конференциях: Spin Physics, Spin Chemistry and Spin Technology (2018, Новосибирск, Россия), Modern Development of Magnetic Resonance (2015 Казань, Россия), Российский симпозиум «Белки и пептиды» (2015, Новосибирск, Россия), 14th International Symposium on Spin and Magnetic Field Effects in Chemistry and Related Phenomena (2015, Калькутта, Индия), Modern Development of Magnetic Resonance (2014 Казань, Россия), School for Young Scientists “Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics” (2014 Новосибирск, Россия), Международная студенческая конференция “Студент и научно-технический прогресс” (2014, Новосибирск, Россия).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 научных статей в международных рецензируемых WoS и Scopus научных изданиях, рекомендованных ВАК. Материалы диссертации полностью изложены в опубликованных работах.

Личный вклад соискателя. Весь объем экспериментальных данных выполнен лично либо при непосредственном участии соискателя. Автор также участвовал в разработке плана исследований, обсуждений результатов, формулировке выводов и написании статей по теме диссертационной работы.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов, списка используемых сокращений, списка литературы и приложения. Полный объем диссертации составляет 142 страниц с 71 рисунками и 9 таблицами. Список литературы содержит 217 наименований.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Химически индуцированная поляризация ядер (ХПЯ).

Метод химической поляризации ядер (ХПЯ) [3] является косвенным методом детектирования короткоживущих свободных радикалов, который применяется для исследования механизма быстрых радикальных реакций в растворе, для определения констант скорости реакции, а также структуры и магниторезонансных параметров радикальных интермедиатов, а также и для создания сильной нетермической поляризации (называемой также гиперполяризацией) ядерных спинов. ХПЯ формируется в процессе селективной по электронным спинам рекомбинации радикальных пар (РП). Эффекты ХПЯ обусловлены зависимостью скорости синглет-триплетной конверсии в РП от состояний ядерных спинов, что приводит к образованию диамагнитных продуктов реакции с избытком или недостатком определенных спиновых состояний ядер. Продукты радикальных реакций приобретают сильную спиновую поляризацию ядер, которая сохраняется в течение времени ядерной релаксации, и которая регистрируется в виде аномальной интенсивности сигналов – усиленной адсорбции и эмиссии с помощью метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

ХПЯ является полезным инструментом [4, 5] для изучения короткоживущих радикальных пар, которые зачастую практически невозможно зарегистрировать методами ЭПР-спектроскопии при нормальных условиях из-за их короткого времени жизни и низкой стационарной концентрации. Тем не менее, совместное действие спиновой динамики в синглет-триплетных переходах радикальных парах и зависимости реакции рекомбинации радикалов от спинового состояния может приводить к значительным коэффициентам усиления для эффектов ХПЯ в диамагнитных продуктах реакции. Хотя ядерная поляризация в радикальных парах формируется на наносекундной временной шкале, она сохраняется в диамагнитных продуктах реакции в течение времени ядерной T_1-релаксации (несколько секунд), поэтому эффекты ХПЯ могут быть изучены с помощью ЯМР-спектроскопии. Таким образом, явление ХПЯ лежит в основе метода ХПЯ, который является косвенным методом получения данных об ЭПР параметрах при помощи спектроскопии ЯМР. Метод ХПЯ позволяет исследовать радикальные реакции с участием короткоживущих радикалов в растворах. В данном разделе обзора литературы будут рассмотрены основные подходы к определению таких параметров короткоживущих радикалов, как константы СТВ, g-факторы и времена парамагнитной релаксации ядер.

1.1.1. Радикально-парный механизм возникновения ХПЯ

В основе явления ХПЯ лежит спиновая селективность химических реакций с участием свободных радикалов. ХПЯ проявляется в виде неравновесной заселенности ядерных спиновых состояний в диамагнитных продуктах реакции, что проявляется в экспериментах как аномальные

интенсивности в спектрах ядерного магнитного резонанса (ЯМР) диамагнитных продуктов радикальных химических реакций [3, 6]. Радикальные пары являются ключевыми интермедиатами для объяснения эффектов ХПЯ. В реакциях получения радикалов из нерадикальных предшественников, например, при гомолитическом разрыве связей или передаче электрона, радикалы создаются парами.

Важным для описания характера движения радикальной пары в растворе является понятие клеточного эффекта. Когда радикалы пары находятся в контакте, т.е. в момент рождения пары или в последующих повторных встречах, в спиновом гамильтониане преобладает обменное взаимодействие. Вследствие этого два неспаренных электрона являются неразличимыми и их собственные состояния, синглет и триплет, выглядят следующим образом:

$$|S\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}}(|\alpha\beta\rangle - |\beta\alpha\rangle)$$

$$|T_{-1}\rangle = |\beta\beta\rangle, |T_0\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}}(|\alpha\beta\rangle + |\beta\alpha\rangle), |T_{+1}\rangle = |\alpha\alpha\rangle$$

С другой стороны, когда радикалы находятся далеко друг от друга, обменное взаимодействие стремится к нулю, то есть неспаренные электроны теперь могут быть различены, например, по g-фактору, или путем связывания радикалов, а собственными теперь являются четыре дублетные функции:

$$\left|\mathrm{D}_{-1/2,-1/2}\right\rangle = |\beta\beta\rangle\ (\equiv |T_{-1}\rangle), \qquad \left|\mathrm{D}_{-1/2,+1/2}\right\rangle = |\beta\alpha\rangle$$

$$\left|\mathrm{D}_{+1/2,+1/2}\right\rangle = |\alpha\alpha\rangle\ (\equiv |T_{+1}\rangle), \qquad \left|\mathrm{D}_{+1/2,-1/2}\right\rangle = |\alpha\beta\rangle$$

Можно заметить, что функции $|\beta\beta\rangle$ и $|\alpha\alpha\rangle$ являются собственными независимо от расстояния между радикалами.

Хотя другие две функции являются собственными только в специальных ситуациях (состояния $|S\rangle$ и $|T_0\rangle$ на контакте; $|\alpha\beta\rangle$ и $|\beta\alpha\rangle$ при бесконечном разделении), каждый набор является тем не менее полным набором базисных функций, которые могут быть использованы для описания состояния спинов. $|S\rangle$ и $|T_0\rangle$ являются наиболее удобными для этой цели, потому что они являются собственными в начале и в конце их диффузионных перемещений. В промежутке между рождением и гибелью радикалов спиновое состояние $|X\rangle(\mathrm{t})$, которое обычно зависит от времени, всегда может быть представлено в виде линейной комбинации:

$$|X\rangle(\mathrm{t}) = \mathrm{c_S}(\mathrm{t})|S\rangle + \mathrm{c_{T_0}}(\mathrm{t})|T_0\rangle$$

с зависящими от времени коэффициентами $\mathrm{c_S}$ и $\mathrm{c_{T_0}}$.

Зависимость обменного взаимодействия от расстояния открывает возможность интеркомбинационной конверсии радикальной пары. Пусть пара родилась, например, в состоянии $|T_0\rangle$, и затем за счет диффузионного движения разошлись на расстояние, где J=0. В это

время спиновое состояние эволюционирует под действием спинового гамильтониана. Если c_S становится отличным от нуля при повторной встрече, пара приобретает некоторый синглетный характер. Но в этот момент, обменное взаимодействие действует снова и заставляет пару переходить в одно из собственных состояний, и это означает, что в ансамбле из радикальных пар определенная доля будет переходить в синглетное состояние при повторной встрече, т.е. будет претерпевать интеркомбинационную конверсию.

Зависимость обменного взаимодействия J от расстояния имеет решающее значение для эволюции спинового состояния пары. Обычно предполагается экспоненциальное уменьшение с ростом расстояния между радикалами. [7] Типичные кривые потенциальной энергии для синглета и триплета показаны на рисунке 1. Во внешнем магнитном поле Зеемановское взаимодействие является причиной дополнительного расщепления триплета на три подуровня, как показано на рисунке 1.

Возможны две ситуации, когда J исчезает и, следовательно, интеркомбинационная конверсия является наиболее эффективной. Во-первых, для расстояний больших, чем нескольких молекулярных диаметров, состояния $|S\rangle$ и $|T_0\rangle$ становятся вырожденными. Это условие выполняется для большей части диффузионных движений, если только диффузия не ограничена (как например, в случае мицелл или бирадикалов), таким образом, процесс типа $|S\rangle \leftrightarrow |T_0\rangle$ обеспечивает наиболее эффективный и наиболее общий путь интеркомбинационной конверсии (ИКК) радикальных пар. Во-вторых, на некотором критическом расстоянии существует пересечение уровней $|S\rangle$ и $|T_{-1}\rangle$ для J<0; либо, при положительного обменного взаимодействия, $|T_{+1}\rangle$. Поскольку интеркомбинационная конверсия является медленным процессом, система должна провести значительное время в области, где величина обменного взаимодействия соответствует зеемановскому расщеплению триплетных подуровней, и ИКК по механизму $|S\rangle \leftrightarrow |T_{\pm 1}\rangle$ реализуется обычно только для бирадикалов [8], либо в мицеллах.

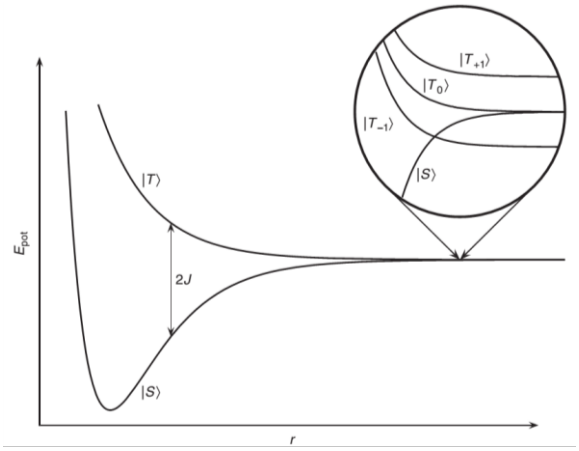


Рисунок 1. Потенциальная энергия радикальной пары как функция межрадикального расстояния r. Обменный интеграл J – это половина расщепления синглетной и триплетной функций по энергии. На вставке показано расщепление триплетных уровней в магнитном поле.

Кулоновское притяжение между заряженными радикалами не учитывается. Изображение взято из [6]. Для дальнейших пояснений см. текст.

Векторная диаграмма [9] (рисунок 2) позволяет на качественном уровне визуализировать механизм интеркомбинационной конверсии между состояниями $|S\rangle$ и $|T_0\rangle$. Спины электронов каждого радикала изображены стрелками, что дает возможность представить процесс в случае двух несвязанных индивидуальных радикалов. Это представление противоречит принципу Паули для связанных спинов в синглетном и $|T_0\rangle$ состояниях; несмотря на это ограничение, диаграммы дают качественно правильное представление. Синглетное состояние не имеет магнитного момента, и два вектора, изображающих спины, должны быть антипараллельны. $|T_0\rangle$ обладает ненулевым магнитным моментом, но нулевой z-компонентой; следовательно, два вектора можно изобразить так, как показано на правой стороне рисунка 2. В ситуации, когда два радикала не взаимодействуют, спины электронов прецессируют независимо. При наличии СТВ, для разных состояний каждого ядра, прецессия, в общем случае, происходит с разными частотами. Таким образом, сначала система стартует из состояния $|S\rangle$, затем состояния, изображаемые двумя стрелками, будут выходить из фазы, как показано в центре рисунка 2, в конечном итоге достигнут состояния $|T_0\rangle$, затем постепенно вернутся в состояние $|S\rangle$, и так далее. Интеркомбинационная конверсия между $|S\rangle$ и $|T_0\rangle$ является, таким образом, когерентным процессом, вызванным разностью частот прецессии спинов радикалов.

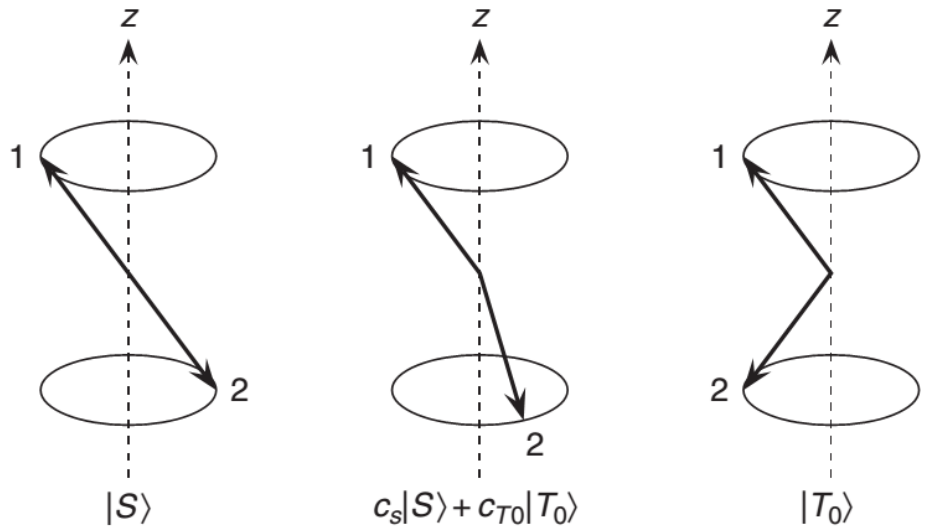


Рисунок 2. Векторная модель визуализации интеркомбинационной конверсии радикальной пары в высоких магнитных полях. Слева: синглетное состояние; центр: суперпозиция состояний; справа: состояние $|T_0\rangle$. Изображение взято из [6]. Для дальнейших пояснений, см. текст.

Рассмотрим процессы, приводящие к возникновению геминальной ХПЯ в ходе обратимой фотореакции (схема на рис.3). Пусть в растворе есть молекулы сенсибилизатора, поглощающего

свет, и молекулы, которые являются тушителями по отношению к фотовозбужденному состоянию сенсибилизатора. Молекула D, поглощая квант света, переходит из основного синглетного состояния S_0 в некоторое возбужденное синглетное состояние S_i. За счет интеркомбинационной конверсии (ИКК) молекула фотосенсибилизатора D из состояния S_i переходит в триплетное состояние T_i, после чего за счет внутренней конверсии молекула D переходит в нижнее по энергии (долгоживущее) триплетное состояние T_1. Затем, в результате диффузионного движения в растворе происходит встреча триплетно-возбужденной молекулы с молекулой-партнером, которая тушит триплетное состояние по механизму переноса электрона или атома водорода. Реакция тушения может протекать с константами скорости $k_q \sim 10^7 \div 10^{10} M^{-1}c^{-1}$, и радикальная пара (РП), образующаяся в ходе этой реакции, сохраняет спиновое состояние предшественника. Чтобы произошла обратная реакция внутри клетки из молекул растворителя, радикальной паре необходимо перейти из триплетного в синглетное состояние.

$$D \xrightarrow{h\nu} {}^{S_i}D^* \xrightarrow{\text{ИКК}} {}^{T}D$$

$$\begin{tikzcd}
{}^{T}D + {}^{\alpha}_{\beta}Q \arrow[r, "\text{тушение}"] & {}^{T}\overline{\left(D^{\cdot} + {}^{\alpha}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} \arrow[r, "S-T_0"] \arrow[d, "\text{выход из клетки}"] & {}^{S}\overline{\left(D^{\cdot} + {}^{\alpha}Q^{\cdot}\right)} \arrow[r, "\text{рекомбинация}"] & D + {}^{\alpha}Q \\
& D^{\cdot} + {}_{\beta}Q^{\cdot} & &
\end{tikzcd}$$

Рисунок 3. Схема фотореакции, приводящая к возникновению ХПЯ при геминальной рекомбинации радикальных пар.

Как известно, в этот переход запрещен из-за сохранения спина, но его вероятность становится отличной от нуля если учесть магнитные спиновые взаимодействия с ядрами в РП. Если РП находится в сильном магнитном поле, то спиновая часть гамильтониана РП в пренебрежении обменным взаимодействием J может быть записана следующим образом [3]:

$$H = g_1\beta_e B_z \hat{S}_{1z} + g_2\beta_e B_z \hat{S}_{2z} + \sum_i A_i^{(1)} \hat{S}_{1z} \hat{I}_{iz} + \sum_j A_j^{(2)} \hat{S}_{2z} \hat{I}_{jz} \qquad (1.1)$$

Где g_1, g_2 – g-факторы радикалов, β_e – магнетон Бора, B_z – напряженность внешнего магнитного поля, $\hat{S}_{1z}, \hat{S}_{2z}$ – z-компоненты операторов спинов электронов, находящихся, соответственно, в первом и во втором радикалах, i,j – нумерация магнитных ядер в первом и во втором радикалах соответственно, $\hat{A}_k^{(n)}$ – константа сверхтонкого взаимодействия (СТВ) k-го ядра в n-ом радикале (n =1,2), $\hat{I}_{kz}$ – z-компонента оператора спина ядра с номером k.

Как было обсуждено выше, в рассматриваемой ситуации происходит смешение уровней $|S\rangle$ и $|T_0\rangle$. Рассмотрим матричный элемент $T_0 \leftrightarrow S$ переходов для конкретных ядерных состояний $m_k = \{m_i, m_j\}$.

$$\omega_{T_0 \leftrightarrow S} = \frac{1}{2\hbar}\left(\Delta g \beta B_z + \sum_i A_{1i} m_i - \sum_j A_{2j} m_j\right) \quad (1.2)$$

Здесь $\Delta g = (g_1 - g_2)$ – разность g-факторов радикалов, m_k –значение проекции спина ядра с номером k на ось z.

Из выражения (1.2) видно, что скорость синглет-триплетной конверсии зависит от того, в каких именно спиновых состояниях находятся ядра в паре. В итоге, это приводит к тому, что в диамагнитных продуктах геминальной рекомбинации будут преобладать определенные спиновые состояния ядер. Для ядер со спином ½ Робертом Каптейном было сформулировано следующее правило [10], по которому можно определить знак интегральной поляризации ядер:

$$\Gamma_{nk} = \mu \varepsilon \Delta g A_{nk} \quad (1.3)$$

где μ = +1 или -1 для триплетного или синглетного предшественника; ε = +1 или -1 для продуктов геминальной рекомбинации или внеклеточной; Δg – разность g-факторов радикала, которому принадлежит рассматриваемое k-ое магнитное ядро, и радикала партнера; A_{nk} – изотропная часть константы СТВ с ядром с номером k в составе радикала n (n=1,2), поляризация которого рассматривается.

Если для некоторого ядра знак Γ_{nk} положительный, то в диамагнитных продуктах это ядро будет поляризовано таким образом, что заселенность состояния с α-проекцией спина ядра будет выше, и в спектре ЯМР продуктов будет наблюдаться усиленная абсорбция. При отрицательных Γ_{nk} преимущественно будут заселяться состояния с β-проекцией ядерного спина, а в спектре ЯМР будет наблюдаться эмиссия.

1.1.2. Зависимость сигнала ХПЯ от времени

Поляризация ядер, возникающая в результате синглет-триплетных переходов в радикальных парах, имеет характерную зависимость от времени. Во-первых, так как при возникновении геминальной поляризации не изменяется заселенность ядерных спинов, а происходит лишь их сортировка между диамагнитными продуктами и вышедшими в объем радикалами, то в радикалах, которые избежали рекомбинации в исходной радикальной паре и вышли в объем, поляризация равна по величине поляризации геминальных продуктов, но имеет противоположный знак. Следовательно, если при повторных встречах в так называемых F-парах (от англ. Free pairs) образуются такие же продукты, как в геминальных парах, то, без учета спиновой эволюции, в таких парах поляризация должна была бы спадать с характерным временем τ, которое для бимолекулярной реакции радикалов в объеме определяется произведением $k_d * R_0$, где R_0 – начальная концентрация радикалов. За счет модуляции анизотропной части СТВ в радикалах достигается высокая скорость продольной релаксации ядер (T_1~1÷10^3 мкс [11]), что приводит к эффективному выравниванию заселенностей ядерных уровней. Если для ядра время T_1 в радикале короче характерного времени рекомбинации $\tau_{рек}$, то

поляризация этих спинов в продуктах реакции не только не будет спадать, но даже может нарастать на микросекундной шкале благодаря формированию ХПЯ при S-T_0 конверсии в F-парах, что часто наблюдается в экспериментах по измерению кинетики ХПЯ [6, 12].

Еще одним фактором, влияющим на кинетику формирования ХПЯ, является вырожденный электронный обмен между радикалом и диамагнитной молекулой. Этот процесс возможен, если радикалы, вышедшие в объем, отличаются только одним электроном от диамагнитных молекул, находящихся в растворе. При этом обмене электроном суммарная поляризация спадает по тем же причинам, что и при рекомбинации F-пар. За счет того, что концентрация диамагнитных молекул обычно намного выше, чем концентрация короткоживущих свободных радикалов, вырожденный электронный обмен приводит к быстрому спаду поляризации за время, которое определяется произведением концентрации диамагнитных молекул на константу скорости k_{ex}. Одним из способов избежать потери поляризации из-за вырожденного электронного обмена является подбор такого значения pH, чтобы радикал и диамагнитная исходная частица не участвовали в обмене. Подбор такого значения pH становится возможным благодаря тому, что во многих случаях константы кислотности этих частиц различаются на несколько порядков [13, 14].

Все эти процессы можно описать следующей кинетической системой уравнений (уравнения 2.1-2.10), изображенной ниже. Для простоты будем считать, что в радикальной паре есть только одно ядро, со спином ½.

$$D \xrightarrow{h\nu} {}^{S_i}D^* \xrightarrow{k_{\text{ИКК}}} {}^{T}D \xrightarrow{\tau_0} D \tag{2.1}$$

$$D^T + {}^{\alpha}_{\beta}Q \xrightarrow{k_q} {}^{T}\overline{\left(D^{\cdot} + {}^{\alpha}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} \text{ (Тушение)} \tag{2.2}$$

$${}^{T}\overline{\left(D^{\cdot} + {}^{\alpha}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} = {}^{T_0}\overline{\left(D^{\cdot} + {}^{\alpha}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} + {}^{T_+}\overline{\left(D^{\cdot} + {}^{\alpha}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} + {}^{T_-}\overline{\left(D^{\cdot} + {}^{\alpha}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} \tag{2.3}$$

$${}^{T_0}\overline{\left(D^{\cdot} + {}^{\alpha}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} \xrightarrow{k_{ST}} {}^{S}\overline{\left(D^{\cdot} + {}^{\alpha}Q^{\cdot}\right)} \xrightarrow{k_R} D + {}^{\alpha}Q \text{ (Геминальная рекомбинация)} \tag{2.5}$$

$${}^{T}\overline{\left(D^{\cdot} + {}^{\alpha}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} \xrightarrow{k_d} D^{\cdot} + {}_{\beta}Q^{\cdot} \text{ (Выход из клетки)} \tag{2.4}$$

$${}_{\beta}Q^{\cdot} \xrightarrow{1/T_1} {}^{\alpha}_{\beta}Q^{\cdot} \text{ (Продольная релаксация в радикале)} \tag{2.6}$$

$${}_{\beta}Q^{\cdot} + {}^{\alpha}_{\beta}Q \xrightarrow{k_{ex}} {}_{\beta}Q + {}^{\alpha}_{\beta}Q^{\cdot} \text{ (Вырожденный электронный обмен, спад ХПЯ)} \tag{2.7}$$

$$D^{\cdot} + {}_{\beta}Q^{\cdot} \xrightarrow{k_d} {}^{F}\overline{\left(D^{\cdot} + {}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} \text{ (Повторные встречи)} \tag{2.8}$$

$${}^{F}\overline{\left(D^{\cdot} + {}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} = {}^{S}\overline{\left(D^{\cdot} + {}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} + {}^{T_0}\overline{\left(D^{\cdot} + {}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} + {}^{T_+}\overline{\left(D^{\cdot} + {}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} + {}^{T_-}\overline{\left(D^{\cdot} + {}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} \tag{2.9}$$

$${}^{S}\overline{\left(D^{\cdot} + {}_{\beta}Q^{\cdot}\right)} \xrightarrow{k_R} D + {}_{\beta}Q \text{ (рекомбинация РП при встрече радикалов в объеме,}$$

компенсация геминальной поляризации,

приводящая к спаду ХПЯ) (2.10)

Для такой кинетической схемы с целью проверки теории, описывающей ХПЯ, в работе [15] были предложены следующие уравнения, описывающие кинетику формирования ХПЯ в сильных магнитных полях ($g_i\beta_e B_z >> |A_{ik}|$):

$$R(t) = \frac{R_0}{1+k_R R_0 t} \quad (2.11)$$

$$\frac{dP(R)}{dt} = -k_R P(R)R(t) - k_R\beta(R(t))^2 - \frac{P(R)}{T_1} - k_{ex}P(R)C_0 \quad (2.12)$$

$$\frac{dP(Pr)}{dt} = k_R P(R)R(t) + k_R\beta(R(t))^2 + k_{ex}P(R)C_0 \quad (2.13)$$

Здесь используются обозначения: *R(t)* – концентрация радикалов (радикальных пар) от времени; R_0 – начальная концентрация радикалов; k_R – константа скорости бимолекулярной реакции гибели радикалов; *P(R)* – поляризация в радикалах; *P(Pr)* – поляризация в продуктах рекомбинации; T_1 – время ядерной релаксации в радикалах; $\beta = \gamma P^G/R_0$ – параметр; P^G – геминальная поляризация; γ – постоянная, показывающая во сколько раз поляризация в F-парах больше поляризации в геминальных парах. Теоретическое значение $\gamma = 3$. В статье [15] было показано, что при значении $\gamma = 2.8$ экспериментальные данные для целого ряда радикальных реакций в растворах с низкой вязкостью хорошо описываются уравнениями (2.11-2.13).

Вид зависимости интенсивностей сигналов ХПЯ от времени определяется соотношением времени релаксации T_1, характерного времени бимолекулярной гибели $\tau_{рек} \sim 1/(k_d \times R_0)$ и вырожденного электронного обмена $\tau_{ex} \sim 1/(k_{ex} \times C_0)$. Все эти параметры могут быть извлечены при математическом моделировании кинетики ХПЯ и сравнении с экспериментальными данными.

1.1.3. Зависимость интенсивности сигнала в спектре ХПЯ от значения константы сверхтонкого взаимодействия.

Количественный анализ амплитуды сигналов может быть очень полезен при изучении радикалов, потому что соотношение сигналов в спектре геминальной ХПЯ позволяет определить отношение констант СТВ для различных ядер в короткоживущих радикалах. Было показано [16], что для РП в невязких растворах ($\sqrt{\tau_c \omega_{T_0 \leftrightarrow S}} \ll 1$, то есть когда время жизни РП в клетке τ_c много меньше характерного времени синглет-триплетной эволюции), и при достаточно большом числе ядер в радикалах, величина интеграла для сигнала ЯМР в геминальном спектре ХПЯ прямо пропорциональна величине константы СТВ с соответствующим ядром, причем абсолютная величина этой константы пропорциональности общая для всех ядер одного изотопа в диамагнитных продуктах для обоих разикалов пары молекуле, а ее знаки для молекул-партнеров протовоположны, в полном согласии с правилами Каптейна:

$$Pol_{1i} = CA_{1i} \quad \text{и} \quad Pol_{2j} = -CA_{2j} \qquad (3.1)$$

Наиболее часто исследуют ^{1}H ХПЯ, что связано, во-первых, с практически 100% природным содержанием этого изотопа, во-вторых, с его самым высоким гиромагнитным отношением. С одной стороны, ^{13}C ХПЯ является более информативным методом для исследования структуры радикалов, но с другой стороны чувствительность спектроскопии ЯМР ядер ^{13}C ниже, чем ^{1}H на несколько порядков. Понижение чувствительности связано с низким природным содержанием (1,1%) магнитного изотопа ^{13}C и в более низким значением его гиромагнитного отношения по сравнению с протоном.

Соотношение пропорциональнсти между геминальными сигналами ХПЯ ^{13}C и константами СТВ для ^{13}C было успешно применено для их определения в короткоживущих радикалах триптофана и тирозина, образующихся в фотореакции с флавином мононуклеотидом [17]. В этой работе использовались аминокислоты, обогащенные изотопами ^{13}C и ^{15}N по всем положениям. Отметим, что использование 100% ^{13}C изотопно-обогащеных соединений осложняется большим числом констант скалярных спин-спиновых взаимодействий не оолько между близко расположенными изотопами даже между значительно удаленными ядрами ^{13}C, что в спектре ЯМР может сопровождаться наложению мультиплетных сигналов от различных ядер, для поляризации противоположного знака у налагающихмя сигналах это приводит к уменьшению регистрируемых сигналов. Переход от рабочей частоты спектрометра 200 МГц к 600 МГц по протонам позволил получить спектры ^{13}C ХПЯ триптофана без наложения сигналов от различных углеродов.

В случае бирадикалов при фотолизе цилических алифатических кетонов были получены спектры ^{13}C ХПЯ, используя вещества с природным содержанием магнитного изотопа ^{13}C [18, 19]. В данной работе для аминокислоты гистидина при естественном содержании изоопов получены геминальные спектры ^{13}C ХПЯ, на основе анализа которых установлен механизм реакции и получены константы СТВ.

1.1.4. Зависимость ядерной поляризации от напряженности магнитного поля.

Из выражения (1.2) видно, что в зависимости интегральной ХПЯ от напряженности магнитного поля должны наблюдаться экстремумы, поскольку магнитное поле сильно влияет на значение поляризации ХПЯ.

В работе [20] Ф. Дж. Адрианом была предложена модель возникновения ХПЯ в радикальных парах и получены уравнения, описывающие зависимость интенсивности геминальной ХПЯ для случая триплетного предшественника. Уравнение, полученное в статье, описывает вероятность синглет-триплетной конверсии радикальной пары в различных ядерных спиновых состояниях:

$$< P_R{}^{(U)}(ab) > = 0.31k_R\left(\frac{1}{2} - \frac{3}{8}k_R\right) + 0.105k_R{}^2(\left|H^{ab}_{\mathrm{T_0 \leftrightarrow S}}\right|\tau)^{\frac{1}{2}} \quad (4.1)$$

Здесь k_R – константа скорости рекомбинации из синглетного состояния; $H^{ab}_{\mathrm{T_0 \leftrightarrow S}}$ – матричный элемент синглет-триплетного перехода, индексы a и b указывают на определенные состояния ядерных спинов в 1 и 2 радикалах; τ – время между диффузионными смещениями в прыжковой модели диффузионного движения.

Поляризацию каждого ядра можно получить как разность между вероятностями всех переходов, в которых спин выделенного ядра имел проекцию +½ и всех переходов с проекцией данного спина равной –½.

$$Pol_i = \sum_{m_i=+\frac{1}{2}} < \mathrm{P_R^{(U)}}(ab) > - \sum_{m_i=-\frac{1}{2}} < \mathrm{P_R^{(U)}}(ab) > \quad (4.2)$$

В сильном поле ($g_1\beta B_z \gg |A_i|$) для матричных элементов синглет-триплетной конверсии можно пользоваться простым выражением (1.2). Тогда для системы с одним магнитным ядром со спином ½ выражение (4.2) примет вид

$$Pol(B) \sim \sqrt{\left|\Delta g\beta B + \frac{1}{2}A\right|} - \sqrt{\left|\Delta g\beta B - \frac{1}{2}A\right|} \quad (4.3)$$

Из этого выражения следует, что максимум должен наблюдаться при величине магнитного поля $B_{max} = \frac{A}{2\Delta g\beta}$, интенсивность в максимуме пропорциональна корню из константы СТВ.

Такие зависимости экспериментально не наблюдались, потому что в радикальной паре обычно больше одного магнитного ядра, поэтому зависимость ХПЯ от магнитного поля сглаживается, например, в работах [21-23].

Как можно заметить, максимум зависимости (4.3) должен наблюдаться в области $\Delta g\beta B_z \sim A_{\text{эфф}}$; и таким образом по спектру ХПЯ геминальных продуктов можно определить относительные величины констант СТВ в радикалах, а полевая зависимость позволяет определить разность g-факторов и константы СТВ. При наличии данных об ЭПР параметрах (константах СТВ и g-факторе) одного радикала можно установить параметры радикала-партнера, участвующего в реакции.

1.2. Когерентный перенос поляризации в скалярно связанных системах ядерных спинов

Когерентные эффекты переноса ядерной поляризации в диамагнитных продуктах рекции наблюдаются при выполнении одного из двух условий: (I) сильной связи спинов, что выполняется в слабых магнитных полях, и (II) при неадиабатическом переключении поля. Сильная связь приводит к одновременной поляризации нескольких спинов, в то время как неадиабатические изменения гамильтониана позволяют превращать разницу заселенностей в когерентности и наоборот, когерентности в разницу заселенностей.

Условие сильной (или слабой) связи определяется соотношением между разностью в Зеемановских взаимодействиях спинов $\delta\nu$ и их спин-спинового взаимодействия J. Спины считаются сильно связанными, когда $\delta\nu$ меньше или сравнима с J; противоположная ситуация $\delta\nu \gg J$ соответствует слабой связи. Так как $\delta\nu$ прямо пропорциональна внешнему магнитному полю, ситуация сильно связанных спинов соответствует случаю слабого поля, в то время как в достаточно сильном поле связь между спинами становится слабой.

Понятие сильной связи имеет важное значение для переноса поляризации, потому что сильно взаимодействующие спины всегда имеют коллективные (смешанные) собственные состояния. Как следствие, происходит перенос поляризации [24, 25]: поляризуя один спин, мы также поляризуем другой. Рассмотрим двухспиновую систему в качестве примера. В этом случае перенос поляризации происходит благодаря когерентному смешиванию собственных состояний, характеризуемых нулевой проекцией суммарного спина. В сильном магнитном поле эти собственные состояния, представляют собой прямые произведения односпиновых зеемановских состояний α и β. Однако при B = 0, собственными состояниями являются синглетное (S) и три триплетных состояния T_+, T_0 и T_-. Расщепление между уровнями δE равно $\delta E = \sqrt{J^2 + (\delta\nu)^2}$. При $\delta\nu = 0$ (т.е. нулевом магнитном поле) оно минимально и равно |J|. Эту ситуацию можно рассматривать как антипересечение уровней (АПУ): при $B = 0$ два уровня, как правило, пересекаются, но матричный элемент взаимодействия снимает вырождение и создает разницу энергий |J| (Рис. 4a). В непосредственной близости от АПУ спины наиболее сильно связаны; кроме того, коэффициенты, описывающие смешение $\alpha\beta$ и $\beta\alpha$ в собственные состояния, испытывают резкие изменения при переходе к точке пересечения. Понятия АПУ и "сильной связи" взаимосвязаны: в самом деле, для простейшей двухспиновой системы как АПУ, так и режим сильной связи имеют место в нулевом поле. Для двух спинов есть только одно АПУ, которое имеет место для состояний с $I_z = 0$; оно всегда находится в нулевом поле. Для спиновых систем с числом спинов больше 2 существуют дополнительные АПУ и при $B = B_{АПУ} \neq 0$. Например, в трехспиновой системе есть одно такое АПУ (см. 4b). В общем случае, когда система проходит через АПУ, смешивание спиновых состояний существенно меняется, что также приводит к резким изменениям в эффективности передачи поляризации [25]. По этой причине понятие АПУ занимает центральное место в теории когерентного переноса поляризации.

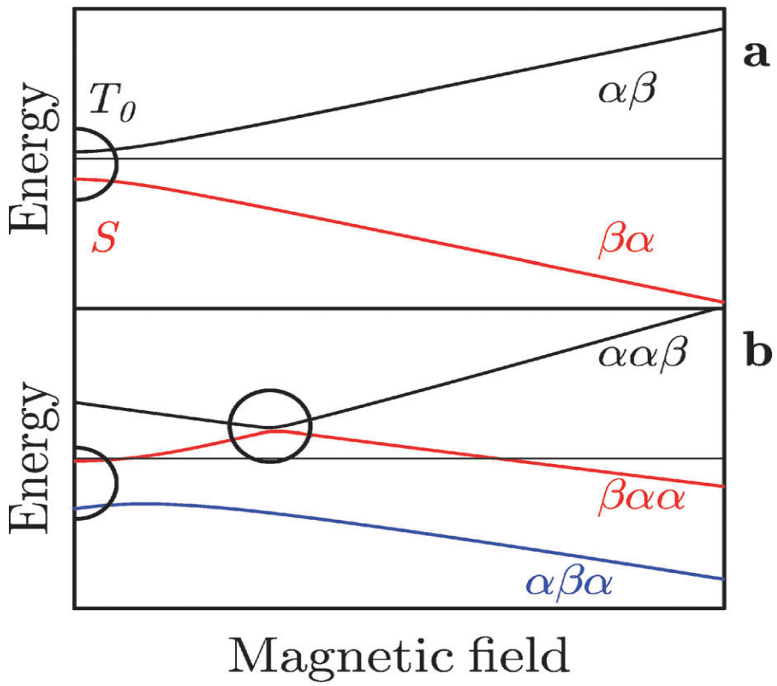


Рисунок 4. Схематическое описание АПУ для двухспиновой системы (a) и системы трех спинов (b). АПУ обозначены кружками, спиновые уровни обозначаются в больших полях и в случае (a), и при нулевом поле. В случае (b), чтобы четко визуализировать АПУ, вычитали большую зеемановскую энергию $\hbar\gamma\beta I_z$ от полной энергии. Изображение взято из статьи [26].

Сильная связь спинов является необходимым, но недостаточным условием для переноса ХПЯ в экспериментах с переключением поля. Это происходит потому, что изначально система поляризована в сильном поле, где спины имеют индивидуальные состояния. Для переноса поляризации очень важно, насколько быстро переключается магнитное поле; говоря более конкретно, изменение поля должно быть неадиабатическим. В общем, для двух собственных состояний $|i\rangle$ и $|j\rangle$ гамильтониана, зависящего от времени, условие адиабатичности описывается параметром $\xi_{ij}(t) = |\alpha_{ij}(t)/2\pi\delta E_{ij}(t)|$, где $\alpha_{ij}(t) = \langle i|(d|j\rangle/dt)$ описывает, как собственные состояния системы изменяются со временем, а δE_{ij} (t) описывает зависящее от времени расщепление между уровнями, выраженное в Гц. Если $\alpha_{ij}(t) \ll 2\pi\delta E_{ij}(t)$ и также выполнено неравенство $\xi_{ij}(t) \ll 1$, то и собственные состояния меняются настолько медленно, что заселенности следуют за адиабатическими состояниям гамильтониана. В противном случае гамильтониан резко меняется, в результате чего матрица плотности спиновой системы должна быть спроецирована на новый базис собственных функций; следовательно, заселенности состояний смешиваются и, кроме того, между ними могут быть сформированы когерентности. В случае двух спинов собственные состояния системы с $I_z = 0$ в произвольном магнитном поле (адиабатические состояния) могут быть записаны в виде

$|1\rangle = \cos\theta\ |\alpha\beta\rangle + \sin\theta|\beta\alpha\rangle$

$|2\rangle = -\sin\theta\ |\alpha\beta\rangle + \cos\theta|\beta\alpha\rangle$

где tan(2θ) = J / $\delta\nu$; эти состояния изменяются от αβ и βα в сильном поле к S и T_0 в слабом поле. Следовательно, параметр адиабатичности

$$\xi_{12}(t) = \frac{1}{2\pi\delta E(t)} \cdot \frac{\mathrm{d}\theta(t)}{\mathrm{d}t}$$

Таким образом, условие адиабатичности определяется тем, насколько быстро угол смешивания θ(t) меняется при изменении поля по сравнению с $\delta E = \sqrt{J^2 + (\delta\nu)^2}$. Для оценки эффективности перемешивания после прохождения через изолированное АПУ при постоянной скорости можно использовать теорию Ландау-Зинера, которая дает следующую вероятность перехода [27] для заселенностей двух связанных состояний

$$P_{12} = \exp\left(-\frac{(2\pi J)^2}{\mathrm{d}(\delta\nu)/\mathrm{d}t}\right)$$

Здесь $\mathrm{d}(\delta\nu)/\mathrm{d}t$ дает скорость, с которой изменяется $\delta\nu$ во время прохождения АПУ. Это выражение дает разумную оценку степени неадиабатичности; однако, в нашем случае это вряд ли может быть использовано на практике. Это вызвано тем, что интерес представляют не только вероятности перехода, но и формирование когерентностей при быстрых изменениях гамильтониана. Кроме того, в реально проводимых в этой работе экспериментах изменение поля никогда не было линейным, а имело более сложный временной профиль B(t) [28]. По этой причине, чтобы моделировать эксперименты на количественном уровне, необходимо численно решать уравнение Лиувилля-фон Неймана для матрицы плотности. Важно также подчеркнуть, что, хотя возбуждение спиновых когерентностей изменением поля является довольно сложной задачей, экспериментальная установка, собранная в МТЦ СО РАН, позволяет надежно зарегистрировать когерентности при переключении поля, в частности, когда система имеет антипересечение спиновых уровней.

Для того, чтобы проиллюстрировать механизм передачи, рассмотрим гиперполяризованную двухспиновую систему, показанную на рисунке 5. Предположим, что в сильном поле один из спинов имеет положительную ХПЯ равную M, а другой спин не поляризован. Такое начальное состояние спиновой системы приводит к различной заселенности собственных состояний с $I_z = 0$: αβ- и βα-состояний. Когда магнитное поле мгновенно изменяется на $B_{Int} = 0$, разница в поляризациях превращается в когерентности между новыми собственными состояниями (синглет-триплетных состояниями), так называемая нуль-квантовая когерентность (Zero-Quantum Coherence, ZQC). То есть, населенности S и T_0 состояний становятся равными в отличие от заселенностей αβ- и βα-состояний. Таким образом, после мгновенного переключения поля начальная разность населенностей полностью превращается в спиновую когерентность в новом собственном базисе. Эта когерентность начинает осциллировать с частотой J. Когда после периода свободной эволюции τ поле переключается обратно в $B = B_0$, ZQC преобразуется

обратно в разницу намагниченностей двух спинов. Когда задержка τ установлена соответствующим образом ($J\cdot\tau = 1/2$), когерентность имеет противоположную фазу и, следовательно, спины точно обмениваются поляризацией. Таким образом, ХПЯ может передаваться в диамагнитных продуктах между связанными спинами в экспериментах с быстрым переключением поля. Полученные намагниченности спинов осциллируют в зависимости от длительности задержки τ (рис. 5). На практике, из-за релаксации амплитуда колебаний экспоненциально убывает со временем, в то время как общий уровень поляризации ($I_{1z} + I_{2z}$) уменьшается монотонно.

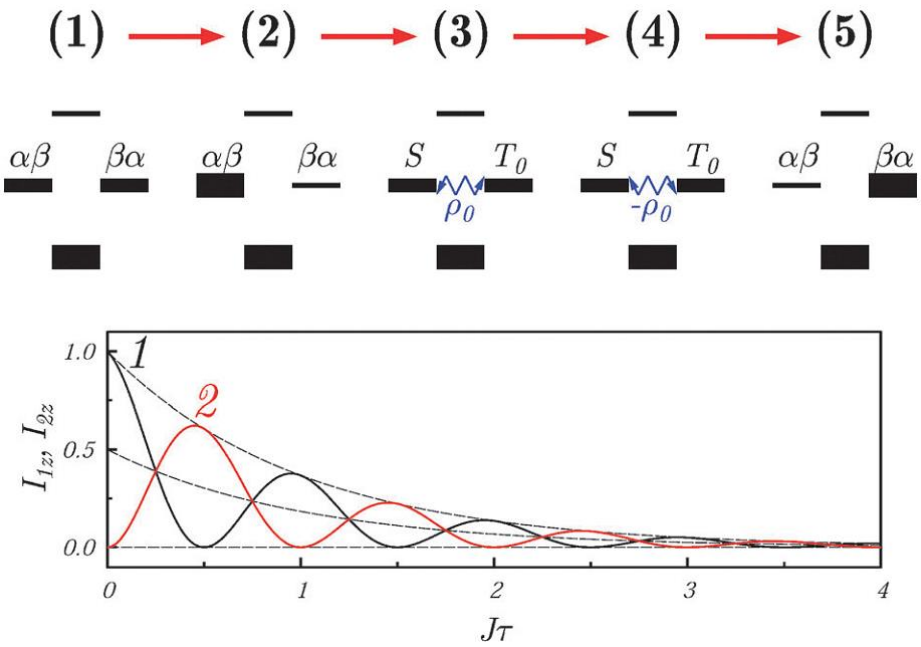


Рисунок 5. Схема переноса ХПЯ в эксперименте с переключением поля. Наверху: представление формирования ХПЯ и эволюции ядерной поляризации. Внизу: интегральная поляризация спинов 1 и 2, как осцилляторные функции временного интервала τ в слабом магнитном поле; спад поляризации и когерентности учитывается при построении графика. В схеме показаны следующие состояния заселенностей уровней (вверху). Сначала спины имеют одинаковые Z-намагниченности (1); после формирования ХПЯ интегральная поляризация спинов $M_1 = M$, $M_2 = 0$ (2). Быстрый переход к низкому полю преобразует разность населенностей между αβ- и βα-состояниями в ZQC $\rho_{ST_0} = \rho_0$ между состояниями S и T_0 (3). Последующая эволюция во времени при $\tau = 1/(2J)$ приводит к инверсии знака ZQC (4); наконец, после второго переключения к большому полю намагниченности спинов обмениваются (5): $M_1 = 0$, $M_2 = M$. Намагниченности как функции от произведения Jτ осциллируют с амплитудой, спадающей вследствие релаксации. Рисунок взят из статьи [26].

Спиновая динамика также может быть описана в рамках формализма спиновых операторов [29]. До первого изменения поля спиновая система имеет спиновый порядок, представляемый оператором $(\hat{I}_{1z} - \hat{I}_{2z})$, который не меняется с течением времени в сильном поле, так как он коммутирует с гамильтонианом в высоком поле. После переключения поля, тем не менее, это состояние превращается в ZQC между S и T_0 состояниями и больше не сохраняется: спин-спиновое взаимодействие J смешивает его с другим спиновым порядком, а именно с

$i\left(2\hat{I}_{1y}\hat{I}_{2x} - 2\hat{I}_{1x}\hat{I}_{2y}\right)$, потому что $\left[\hat{I}_{1z} - \hat{I}_{2z}, J(\hat{I}_1 \cdot \hat{I}_1)\right] = i\left(2\hat{I}_{1y}\hat{I}_{2x} - 2\hat{I}_{1x}\hat{I}_{2y}\right)$. Как следствие, ZQC зависит от времени следующим образом:

$$\mathrm{ZQC}(\tau) = \left(\hat{I}_{1z} - \hat{I}_{2z}\right)\cos(2\pi J\tau) + \left(2\hat{I}_{1y}\hat{I}_{2x} - 2\hat{I}_{1x}\hat{I}_{2y}\right)\sin(2\pi J\tau).$$

Второе переключение поля снова делает оператор $\left(\hat{I}_{1z} - \hat{I}_{2z}\right)\cos(2\pi J\tau)$ не зависящим от времени; соответствующий спиновый порядок затем измеряют с помощью ЯМР. Таким образом, разница в намагниченностях описывается колебательной функцией, зависящей от задержки τ; частота колебаний равна J.

Как уже отмечалось, важным вопросом является скорость изменения поля: для медленного (адиабатического) переключения поля спиновые уровни энергии сохраняют свои первоначальные заселенности, и никакие когерентности в системе не возникают. Следовательно, состояние системы после двух переключений поля остается точно таким же, как и перед переключением (при условии, что релаксационные эффекты пренебрежимо малы). В противоположность этому, неадиабатическое (внезапное) изменение поля вызывает возбуждение спиновых когерентностей, что может привести к обмену заселенностями между выбранной парой уровней. Возбуждение определенной когерентности (например, с помощью прохождения конкретного АПУ [30-34]) также позволяет осуществлять селективный перенос между отдельными спиновыми порядками. Эта методика применима для систем, содержащих более двух связанных спинов, хотя поведение спиновой системы становится более сложным. Например, в том случае, когда имеется более двух связанных уровней энергии (что имеет место в системах с числом спинов более двух) можно возбудить две или больше когерентности из начальных различий населенностей. Тем не менее, когда система проходит через изолированное АПУ, часто только одна когерентность возбуждается с высокой эффективностью. В этом случае ситуация аналогична двухуровневой системе.

1.3. Физико-химические свойства используемых реагентов.

1.3.1. Фотореакции с участием карбоксибензофенонов

Бензофенон (BP на рисунке 6) на протяжении многих лет применялся для изучения реакций фотоиндуцированного переноса электрона, так и для изучения процессов в спин-коррелированных радикальных парах. Это связано с высоким квантовым выходом (φ~1.0 [35]) триплетного состояния при его облучении в УФ диапазоне [35], а также высокой реакционной способностью образующихся при этом триплетных частиц [35-38].

Незамещенный бензофенон плохо растворим в воде, и для того, чтобы изучать фотохимические процессы в водных средах с его участием, либо в водные растворы добавляют ПАВ для образования мицелл [39], либо в молекулу вводят заместители, содержащие

гидрофильные группы, например, карбоксильные. Структурные формулы используемых в данной работе производных бензофеноe молекул приведены на рисунке 6.

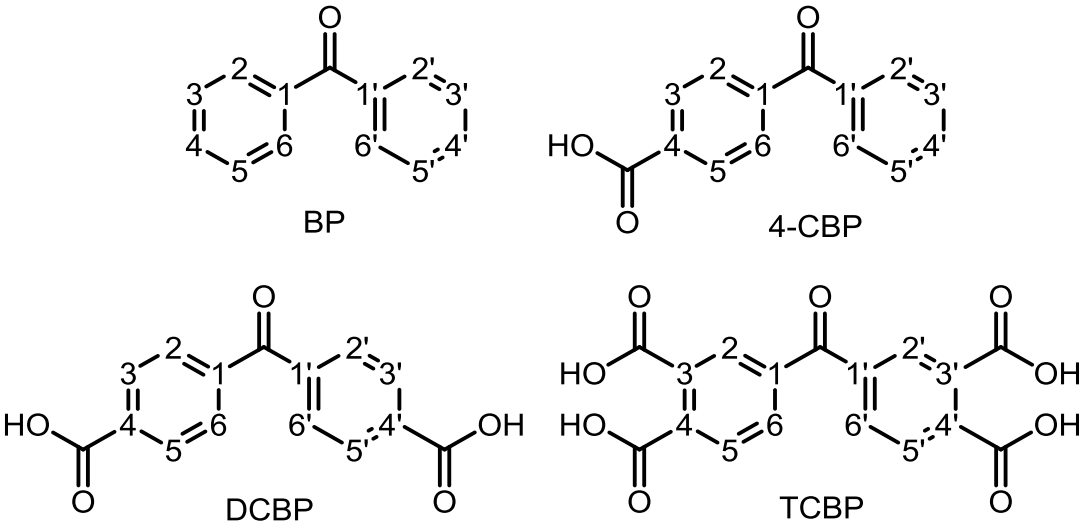


Рисунок 6. Структурные формулы бензофенона, а также его карбоксипроизводных, использованные в данной работе: 4-CBP – 4-карбоксибензофенон, DCBP – 4,4’-дикарбоксибензофенон, TCBP – 3,3’,4,4’-тетракарбоксибензофенон

4-CBP является одним из широко используемых фотосенсибилизаторов бензофенонового ряда. В водных растворах это соединение проявляет себя как одноосновная кислота с pK_a=3.79. В спектре промежуточного поглощения триплетного состояния этой молекулы в водном растворе наблюдается максимум на 535 нм [37]. Собственное время жизни триплетного состояния составляет 5 мкс [37]. Для реакций фотоокисления с участием этого соединения было установлено участие двух различных радикалов: анион-радикала $4\text{-CBP}^{\bullet-}$ и кетильного радикала $4\text{-CBPH}^{\bullet}$, между которыми в водных растворах устанавливается кислотно-основное равновесие с константой кислотности pK_a=8.2 [37]. Максимумы поглощение этих двух радикалов наблюдаются на длинах волн 660 нм и 570 нм соответственно [37].

TCBP в водных растворах является четырехосновной кислотой с константами кислотности $pK_{a1,2}$=3.2 и $pK_{a3,4}$=5.1 [40]. В отличие от монокарбоксибензофенонов, TCBP хорошо растворим в воде не только в виде соли, но и в виде кислоты, что расширяет диапазон значений pH, доступных для исследований.

Для TCBP были исследованы свойства его возбужденного триплетного состояния. Это состояние характеризуется полосой поглощения с максимумом на длине волны 590 нм в кислой среде и 550 нм в щелочной, константы кислотности триплетно-возбужденного состояния составляют $pK_{a1,2}$=2.1 и $pK_{a3,4}$=4.7 [40]; собственное время жизни возбужденного триплетного состояния составляет 1.4 мкс [40]. Оптическими методами также был зарегистрирован анион-радикал $\text{TCBP}^{\bullet-}$, максимум поглощения данной частицы составляет 630 нм [40].

При двухфотонном возбуждении, которое достигается при высоких интенсивностях лазерного излучения, происходит ионизация первично образовавшихся триплетов ^{3}ТСВР. При этом получаются катион-радикалы ТСВР$^{\bullet+}$ и сольватированные электроны e_{aq} [41]. В статье [41] этот процесс проводился в водном растворе при pH=11, и было показано, что ТСВР$^{\bullet+}$ в этих условиях подвергается быстрому декарбоксилированию на временах порядка десятков наносекунд с образованием радикалов $BP_1^{\bullet}$ или $BP_2^{\bullet}$ (см. рисунок 7).

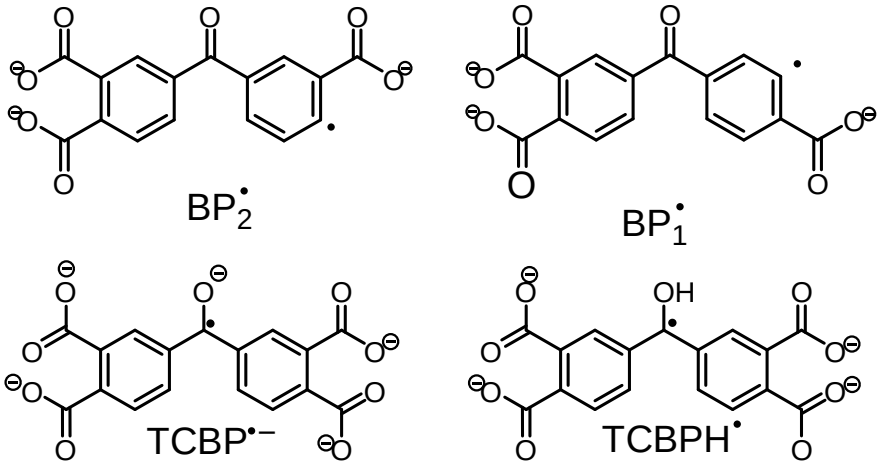


Рисунок 7. Структурные формулы радикалов, образующихся при фотоионизации ТСВР [41].

Сольватированный электрон в данной системе может как рекомбинировать с катион-радикалом ТСВР$^{\bullet+}$, так и присоединиться к диамагнитному тетра-аниону ТСВР. Во втором процессе образуются анион-радикалы ТСВР$^{\bullet-}$, с выходом 10% в расчете на каждый акт ионизации. Радикалы $BP_1^{\bullet}$, $BP_2^{\bullet}$ и ТСВР$^{\bullet-}$ устойчивы на временной шкале ~100 мкс, и благодаря этому их ЭПР параметры были определены с высокой точностью из экспериментов по импульсной регистрации спектров химической поляризации электронов (ХПЭ) [35, 41]. Эти параметры приведены в таблице 1.

Таблица 1. ЭПР параметры радикалов ТСВР, приведенные в литературных источниках.

Радикал	g-фактор	Константы СТВ, мТл
(a) $BP_1^{\bullet}$	2.0024(7)	a(lH,2) = 2.167(9) a(lH,6) = 0.733(6) a(lH,5) = 0.144(1)
(a) $BP_2^{\bullet}$	2.0025(0)	a(lH,5) = 1.479(1) a(lH,2) = 0.734(1) a(lH,6) = 0.246(1)
(a*) $TCBP^{-\bullet}$	2.0035(6)	a(2H,6,6') = -0.265(9) a(2H,2,2') = -0.253(0) a(2H,5,5') = 0.089(7)
(b) $TCBPH^{\bullet}$	Нет данных	a(2H,6,6') = -0.252 a(2H,2,2') = -0.209 a(2H,5,5') = 0.068
(c) $4\text{-}CBP^{\bullet-}$	2.0034(0)	a(4H,2,2',6,6') = -0.28(9) a(1H,4') = -0.2(3) a(2H,3',5') = 0.09(7) a(2H,3,5) = 0.08(5)

(a) – из [41]; (a*) – величины из статьи [41], учтены знаки и отнесение из [16]; (b) – из статьи [16], (c) – из [35].

Следует отметить, что хотя приведенные выше константы определены с очень высокой точностью, их отнесение методом ЭПР к конкретным протонам радикала $TCBP^{\bullet-}$ было сделано с ошибкой, на что было указано в статье [16], в которой было сделано верное отнесение констант СТВ на основе анализа относительных интенсивностей, мультиплетности и знаков сигналов ХПЯ. В обсуждаемой статье [16] короткоживущие анион-радикалы $TCBP^{-\bullet}$ тетракарбоксибензофенона формировались в ходе фотореакции переноса электрона между триплетом ^{3}ТСВР и дипептидом Met-Gly в слабощелочном водном растворе. В этой же статье в фотореакциях между ^{3}ТСВР и такими аминокислотами, как L-гистидин и L-тирозин, было сделано предположение, что сигналы относятся к кетильному радикалу $TCBPH^{\bullet}$, обладающим другим распределением спиновой плотности по радикалу и, как следствие, иным соотношением интенсивностей сигналов в спектре ХПЯ от протонов в диамагнитных продуктах. КСТВ, определенные на основе линейной корреляции сигналов ХПЯ и констант СТВ данного радикала из работы [16], также приведены в таблице 1.

Позднее, в работе [42] на основании сравнения геминальных спектров ХПЯ и констант СТВ, полученных результате квантово-механических расчетов, выполненных соискателем, было сделано существенное уточнение, что вклад в геминальную поляризацию ТСВР в условиях эксперимента, описанного в работе [16], дает не один, а три радикала с разным состоянием

протонирования карбоксильных групп: анион-радикал, анион-радикал с протонированной карбоксильной группой в положении 3 или 3’, анион-радикал с протонированной карбоксильной группой в положении 4 или 4’, и были определены парциальные вклады этих радикалов в ХПЯ. Результаты этого исследования изложены в разделе 3.3.

1.3.2. Фотореакции с участием L-гистидина.

Гистидин занимает особое место среди аминокислот в структуре протеинов благодаря его донорно-акцепторным свойствам вследствие того, что остаток имидазола в его составе часто участвует в катализе и в координировании важных катионов металлов. Способность имидазольного фрагмента гистидина выступать в роли лиганда и донора протона в химических реакциях делает его одним из важнейших компонентов активных центров для более 50 окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов [43]. Гистидин при этом может либо выступать в качестве посредника в передаче неспаренного электрона до конечного акцептора, или может непосредственно участвовать в процессе окисления. В то время как кислотно-основные свойства остатков гистидина в пептидах и белках в широко изучены в растворе [44] и в газовой фазе [45], такие данные отсутствуют для радикалов, возникающих при одноэлектронном окислении гистидина. Радикалы гистидина с неспаренным электроном, локализованным на имидазольном кольце, были предположены в качестве интермедиатов при одноэлектронном окислении некоторых белков [46-51] и пептидов в ходе процессов переноса электронов и биологических окислительно-восстановительных реакциях. Формирование радикальных интермедиатов гистидина может быть также инициировано взаимодействием мягкого УФ-излучения с эндогенными и экзогенными фотосенсибилизаторами, такими как производные флавина [52], порфирина, бензофенона [53]. К сожалению, промежуточное поглощение таких радикалов гистидина сравнительно слабое [54-57], и, как правило, слишком мало на фоне интенсивных сигналов от остальной части белка. В дополнение к этому, при изучении таких процессов методом ЭПР возникают специфические трудности, связанные с тем, что вблизи радикального центра фермента зачастую находятся парамагнитные ионы металлов, взаимодействующие с радикалами гистидина. В таком случае спиновый обмен приводит к сильному увеличению скоростей релаксации электрона в радикале [49, 58, 59]. Свободные радикалы гистидина в растворе обладают настолько высокой реакционной способностью и короткими временами жизни, что на момент написания работы в научной литературе отсутствовали данные ЭПР для свободных имидазолильных радикалов гистидина в растворе.

С другой стороны, реакции с участием радикала гистидина интенсивно исследовалось методами ХПЯ: были измерены спектры геминальной поляризации и изучена кинетика ХПЯ в реакциях с 2,2’-дипиридилом [60] и ТСВР [16] в различных фотореакциях; была измерена полевая зависимость ХПЯ в реакции гистидина с 2,2’-дипиридилом [61]. Из геминальных

спектров ХПЯ ^{1}H в работе [16] были определены константы СТВ радикала гистидина, также получены магниторезонансные параметры радикала имидазола, генерируемого в реакции с OH$^{\bullet}$-радикалом [62]. Также было показано, что ХПЯ протонов имидазольного цикла гистидина может быть использована в качестве зонда для исследования внутримолекулярной подвижности остатка аминокислоты в составе белков в различных структурных состояниях белковой молекулы [63].

При сравнении реакций гистидина с различными фотосенсибилизаторами [64, 65], было показано, что скорость реакции между гистидином и триплетно-возбужденным 3,3‘,4,4’-тетракарбоксибензофеноном (ТСВР) значительно выше, чем в реакции с триплетно-возбужденным 2,2′-дипиридилом и флавинмононуклеотидом. Ранее было обнаружено [64], что геминальная поляризация ядер для системы His/ТСВР имеет максимум в диапазоне pH от 6 до 9. Согласно данным, полученным с помощью лазерного флеш-фотолиза, константа скорости тушения триплета ТСВР гистидином в этом диапазоне pH составляет $k_q = (1{,}0 \div 1{,}6)\ 10^{9}$ М $^{-1}$ с $^{-1}$ [64]. На основе pH зависимости интенсивности сигналов ХПЯ геминальных продуктов (рис 8) и констант скорости реакции тушения (рис 9), при pH 6-9 было предложено, что механизм тушения полностью депротонированного ^{3}ТСВР гистидином представляет собой перенос электрона с последующим переносом протона (PCET). Однако ЭПР параметры свободных радикалов, образующихся в реакции тушения триплета ТСВР с гистидином, не были определены.

Таблица 2. Магниторезонансные параметры радикалов гистидина и имидазола..

	Константы СТВ, мТл			g-фактор
	H2	H4	β	
(a) ХПЯ	-1.31	-1.09	1.27	–
(b) ЭПР радикала имидазола	-1.362	-1.055	–	2.00226

(a) – данные из [3], (b) – из [16]

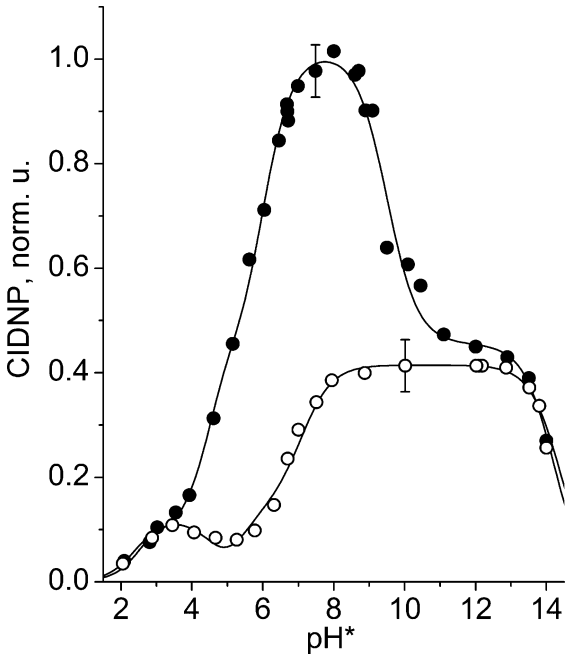


Рисунок 8. Зависимость интенсивности геминальной ХПЯ ^{1}H, для H4 протона гистидина (черные кружки) и N-ацетилгистидина (белые кружки) от pH водного раствора. Линии – результаты численного моделирования. Изображение из [64].

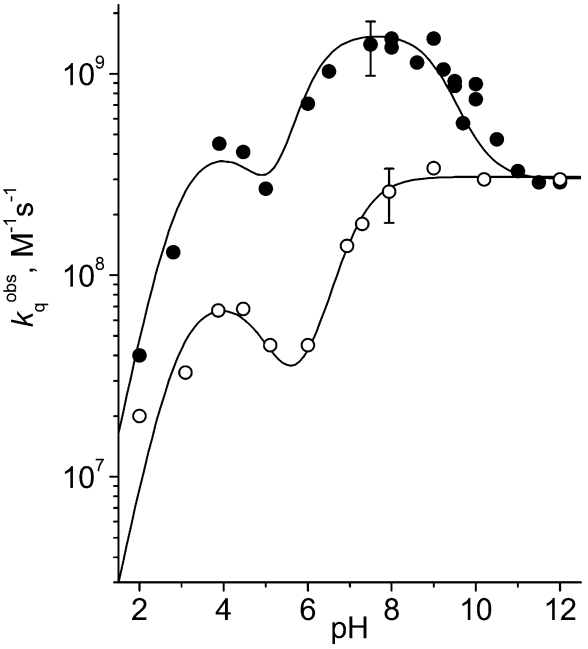


Рисунок 9. pH-зависимость констант скорости тушения фотовозбужденного состояния сенсибилизатора в системах TCBP+His и TCBP+N-ac-His. Данные получены методом флеш-фотолиза, эксперимент описан в [64], изображение взято там же. Черные кружки – результаты измерений для фотореакции TCBP и гистидина, белые – для TCBP и N-ацетилгистидина.

1.3.3. Фотореакции с участием цистеина и его S-алкилпроизводных.

Радикальные процессы с участием серосодержащих аминокислот, в том числе фотохимические, интенсивно изучаются с 1990х годов, после того, как было открыто, что нарушения в протекании этих процессов могут приводить к тяжелым заболеваниям у людей. В

число этих патологий входят катаракта [66], болезни Альцгеймера и Паркинсона [67]. Также было обнаружено, что цистеин в составе пептидов может участвовать в процессах химической репарации ДНК [68] и многих других окислительно-восстановительных процессах.

Известно, что тиоэфирная группа легко окисляется, например, при взаимодействии с триплетными акцепторами. В качестве модельных систем для изучения реакций фотоокисления цистеина в водной среде использовались системы, состоящие из 4-карбоксибензофенона (4-CBP) и различных S-алкилпроизводных цистеина [36]. 4-карбоксибензофенон был выбран как соединение, аналогичное тем карбонильным соединениям, которые встречаются в живых организмах и в триплетном состоянии являются одноэлектронными окислителями [69].

По результатам исследования спектров ХПЯ, полученных при непрерывном облучении [36] (так называемые стационарные спектры ХПЯ), а также по спектрам промежуточного поглощения [70], был предложен следующий механизм фотореакции. Первичное фотовозбуждение молекулы 4-CBP приводит к образованию долгоживущего триплетного состояния. Затем происходит реакция привстрече возбужденной молекулы 4-CBP и S-алкилцистеина, при этом сначала образуется комплекс с переносом заряда [67], после чего происходит перенос электрона от тиоэфирной группы на карбоксибензофенон. Те радикалы S-алкилцистеина, которые избежали рекомбинации в геминальной паре, подвергаются быстрому декарбоксилированию с дальнейшим распадом α-аминоалкильного радикала. Описанная схема изображена на рисунке 10. В спектрах ХПЯ авторы наблюдают сигналы поляризованных продуктов, которые относят к веществам I-IV [71] (см. рис. 10).

Из результатов, полученных оптическими методами, известна константа тушения триплета ^{3}4-CBP S-метилцистеином, равная 1.8×10^9 $M^{-1}c^{-1}$ [70] в нейтральной среде, что соответствует константе скорости переноса электрона в водном растворе.

Однако следует отметить, что по результатам упомянутых выше исследований оставалась неустановленной структура радикалов, образующихся после переноса электрона. Из стационарных спектров ХПЯ авторы [36] не делают заключений о том, каково распределение спиновой плотности в радикальных частицах, а в спектрах промежуточного поглощения авторы [70] наблюдают лишь поглощение α-аминоалкильного радикала, образующегося после реакции декарбоксилирования.

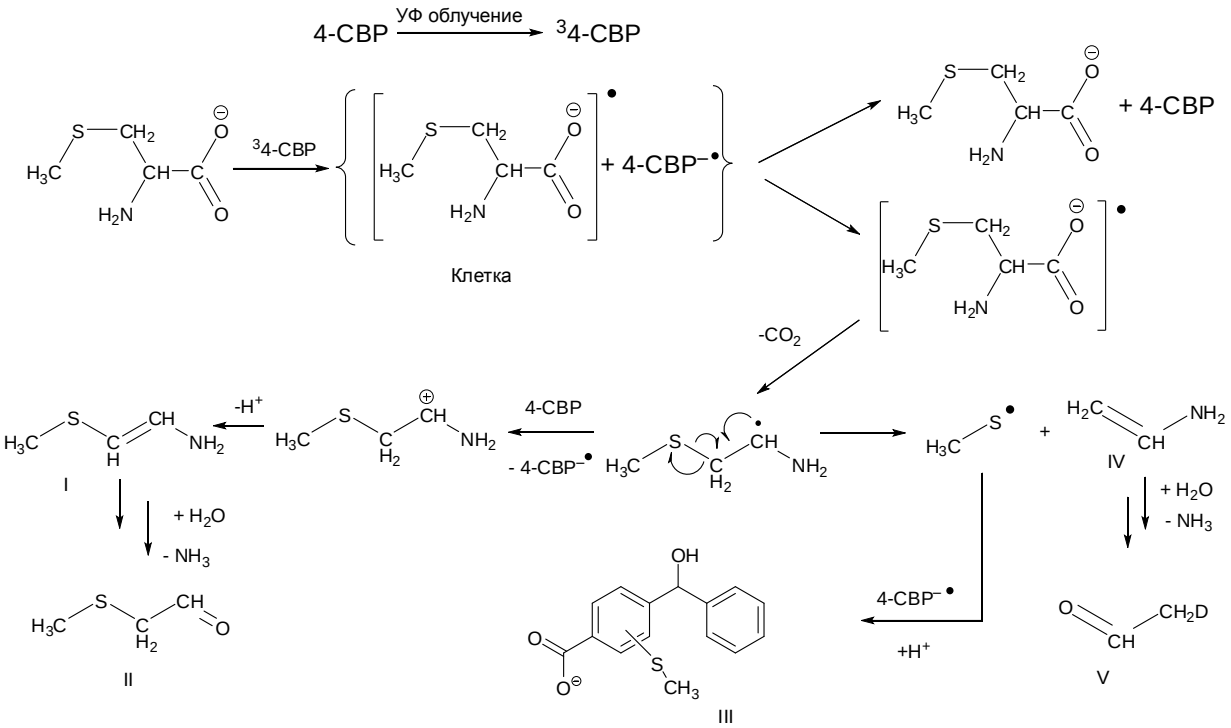


Рисунок 10. Схема фотореакции 4-CBP и Cys(Me) по данным [8].

Для метионина, N-ацетилметионина, также дипептидов Met-Gly и Gly-Met были проведены измерения полевых зависимостей ХПЯ при различных значениях pH, и в результате были определены следующие характерные магниторезонансные параметры радикалов, приведенные в таблице 3.

Таблица 3. Характерные g-факторы радикалов метионина и метионин-содержащих олигопептидов с различной структурой радикального центра. Данные из статьи [72]

Структура радикального центра	g-фактор
[S∴S]	2.0100±10
[S∴O]	2.0080±5
[S∴N]	2.0070±5
$NH_2^{\bullet+}$	2.0040±5
$NH^{\bullet}$	2.0030±5

Описать обозначения радикалов в левом столбце

1.3.4. Фотореакции с участием S-метилглутатиона.

S-алкилглутатионы являются трипептидами, встречающимися в организмах растений, животных и человека. Например, S-метилглутатион (GSMe) был найден в дрожжах, *E.coli* а также в тканях мозга [73]. Хотя происхождение GSMe до сих пор неясно, известно, что дрожжи способны заменять цистеин на S-метилцистеин при синтезе глутатиона (GSH). GSMe также был найден как продукт метаболизма в присутствии различных метилированных лекарств и пестицидов в растениях и животных. Кроме того, большая часть метилгалогенидов, поступающих в печень, мозг и почки крыс и эритроциты человека реагируют с GSH с образованием GSMe [74]. Известно также, что S-алкилглутатионы эффективно ускоряют окислительные повреждения ДНК [75], а деградация этих трипептидов способствует различным нарушениям во время окислительного стресса [76].

В работе [77] окисление S-метилглутатиона триплетно-возбужденным 4-карбоксифеноном изучалось методом лазерного импульсного фотолиза. Была определена константа скорости тушения триплетов ^{3}4-CBP равная $k_q=(1\pm0.2)\times10^9$ $M^{-1}c^{-1}$, которая практически не зависит от pH. В работе был сделан вывод о том, что в случае заряженной концевой аминогруппы трипептида, основными продуктами фотоокисления являются S-центрированные катион-радикалы трипептида, которые образуют димеры с исходными молекулами, и циклические пятичленные [S ∴ O] катион-радикалы (**1** на рис. 11). В щелочных растворах авторы наблюдали декарбоксилирование радикала GSMe$^{\bullet}$, причем для квантового выхода CO_2 наблюдалась pH-зависимость с перегибом при pH = 8.7, что близко к величине $pK_a = 9.7$ для аминогруппы S-метилглутатиона. Из этого факта, а также наблюдаемого роста концентрации радикала 4-CBP$^{\bullet-}$ был сделан вывод о том, что при pH выше pK_a аминогруппы в результате фотоокисления образуются пятичленные [S ∴ O] катион-радикалы (1) и девятичленные циклические [S ∴ N] (**2**) катион-радикалы, подвергающиеся декарбоксилированию.

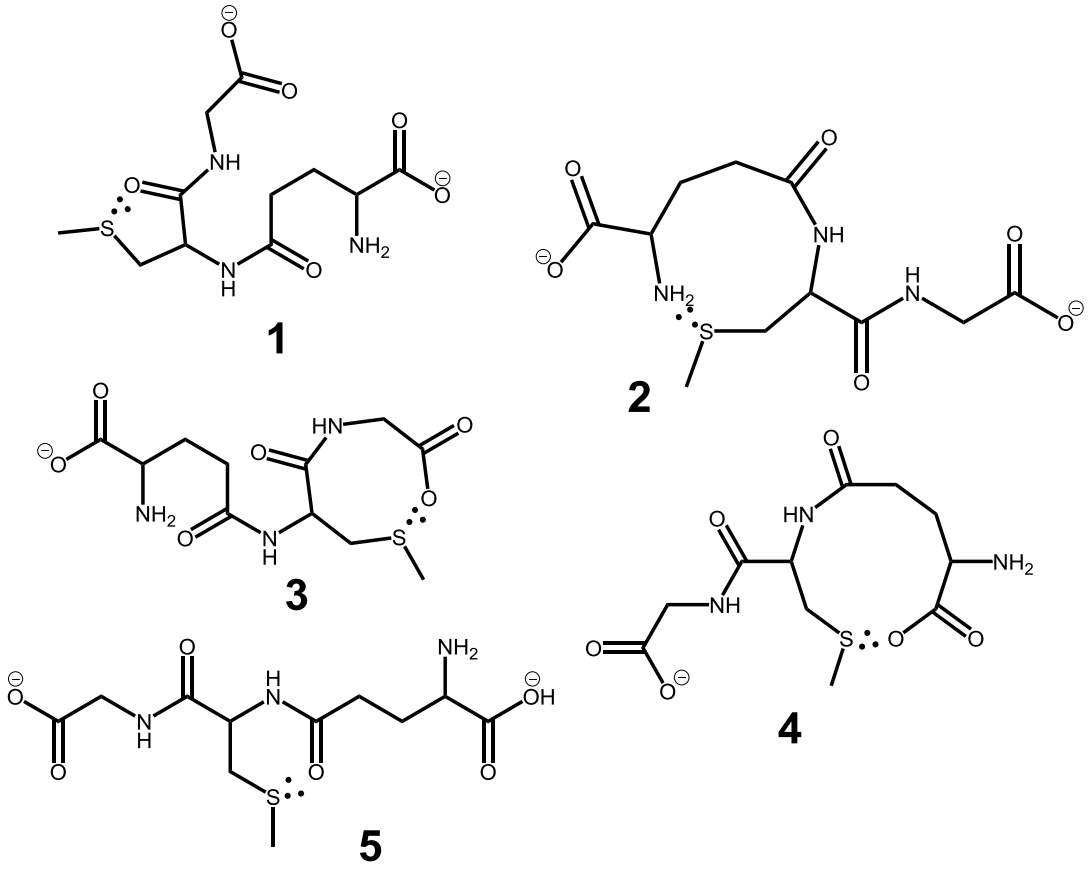


Рисунок 11. Структурные формулы предполагаемых [**S ∴ N**] и [**S ∴ O**] радикалов GSMe.

На основе анализа спектров оптического поглощения промежуточных частиц путем разложения спектра на составляющие, авторы утверждают, что можно выделить линии, относящиеся и к [S ∴ O], и к [S ∴ N] радикалам. Однако, поскольку спектры не были хорошо разрешены и не содержали узких характеристичных полос, подобная интерпретация, на наш взгляд, может привести к ошибочным результатам. Для примера можно привести спектры, опубликованные в работах того же коллектива авторов [77-79], в которых видно, что предполагаемые оптические спектры поглощения радикалов с двухцентровыми трехэлектронными связями [S ∴ O] и [S ∴ N] практически полностью перекрываются (см.

рисунок 12), и поэтому делать на их основе вывод об образовании радикала с определенной структурой является, на наш взгляд, недостаточно обоснованным.

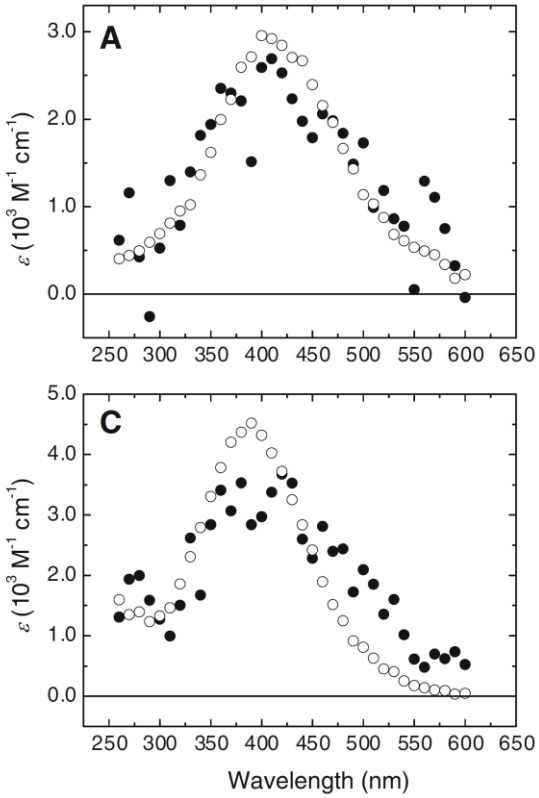


Рисунок 12. Предполагаемые спектры промежуточного поглощения для [**S ∴ O**] (вверху) и [**S ∴ N**] (внизу) радикалов, полученных при импульсном радиолизе водных растворов циклических метионин-содержащих дипептидов. Закрашенные символы – экспериментальные данные, незакрашенные – результаты расчета. Изображение из [78].

Для определения структуры радикалов S-метилцистина и S-метилглутатиона необходима дополнительная информация, например, исследование влияние pH на кинетику ХПЯ, а также зависимость ХПЯ от напряженности магнитного поля, которые были проведены в данной работе

1.4. Эксцизионная репарация оснований ДНК под действием алкиладенин ДНК гликозилазы.

Клеточная ДНК находится под постоянным физико-химическим воздействием многих агентов, возникающих в нормальных метаболических и экологических процессах [80]. Полученные в результате таких процессов повреждения ДНК, такие как отсутствие основания, алкилированные и окисленные азотистые основания, несовпадения в комплементарных участках, одиночные и двойные разрывы нитей ДНК, должны быть отремонтированы, чтобы сохранить целостность генома [81]. Многие типы повреждений ДНК требуют различных систем репарации ДНК. Это могут быть эксцизионная репарация нуклеотидов (Nucleotide Excision Repair (NER)), эксцизионная репарация оснований (Base Excision Repair (BER)), и репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (Mismatch Repair).

Продукты алкилирования различных функциональных групп в структуре ДНК возникают в результате взаимодействия как с эндогенными источниками (например, *S*-аденозилметионин), так и с токсинами окружающей среды, а также противораковыми химиотерапевтическими препаратами [82-85]. Алкилирующие агенты, используемые в противоопухолевой химиотерапии, производят в ДНК, в основном, алкилированные основания. Большая часть алкилирующих препаратов – это метилирующие агенты (например, темозоломид, дакарбазин, хлорамбуцил и циклофосфамид). Метилирующие агенты образуют аддукты с *N*- и *O*- атомами в основаниях ДНК. Продукты N-метилирования составляют более 80% метилированных оснований [86]. Эти повреждения являются токсичными для клеток вследствие блокирования репликации ДНК [87].

Метилированные основания исправляются по механизму эксцизионной репарации оснований (BER). Первый шаг в BER инициируется ДНК-гликозилазами, которые обнаруживают поврежденные основания ДНК на фоне огромного избытка неповрежденных оснований ДНК. ДНК гликозилаза катализирует вырезание модифицированных оснований и создает AP-сайты (участки ДНК без азотистого основания, апурино-апиримидиновые участки). Бифункциональные ДНК гликозилазы катализируют также разрез фосфодиэфирных связей из-за ассоциированной AP-лиазной активности [88]. В случае монофункциональных ДНК-гликозилаз ДНК AP-сайт обрабатывается другим ферментом, AP эндонуклеазой. Последующие этапы BER, приводящие к восстановлению структуры, включают в себя введение правильного основания при помощи репарационной ДНК-полимеразы, и, наконец, сшивание разрыва ДНК лигазой [89, 90].

Человеческая алкиладенин ДНК гликозилаза (AAG) является ферментом системы репарации, который распознает широкий спектр алкилированных и деаминированых пуринов, таких как N3-метиладенин (3MeA), 7-метилгуанин (7MeG), 1-N6-этеноаденин (εA), 1-N2-этеногуанин (εG), гипоксантин и оксанин [91-96].

Как и другие ДНК гликозилазы, AAG должна быстро и эффективно обнаруживать повреждения среди огромного избытка неповрежденных оснований ДНК. Кристаллографические исследования позволили предложить механизм того, как AAG узнает поражения в пределах двойной спирали ДНК [97-99]. Эти исследования показывают, что поврежденное основание выворачивается из двойной спирали в активный центр, в то время как остаток Tyr162 белка интеркалирует в ДНК, что мешает возвращению основания и стабилизирует, таким образом, каталитический комплекс [100].

Кинетические исследования AAG, основанные на анализе флуоресценции 1,N6-этоноаденозина (εA), привели к установлению механизма узнавания и удаления поврежденных оснований, которые включают в себя первоначальное связывание AAG с неповрежденным участком на ДНК, нахождение сайта повреждения, выворачивание поврежденного нуклеотида и

вырезание основания [101]. Результаты показали, что поворот εA весьма благоприятен, но активность AAG ограничена очень медленной скоростью разрыва N-гликозидной связи. Другие повреждения, такие как 7-метилгуанозин и гипоксантин, имеющие неблагоприятные константы равновесия для поворота основания с помощью AAG, вырезаются быстрее, чем εA [93, 102, 103]. Было также показано [93, 96, 102, 104], что эффективность рассечения N-гликозидной связи зависит как от типа основания, расположенного напротив повреждения в противоположной цепи, так и от ближайших соседних оснований с 3'- и 5'-сторон. Тем не менее, эти влияния различны для разных повреждений, что указывает на сложный механизм специфических взаимодействий, необходимых для образования каталитического комплекса.

При участии автора настоящей диссертации было проведено пионерское сайт-специфическое косвенное детектирование корокоживущих интермедиатов ДНК в отрытой форме, формирующихся в обратимой реакции открытия-закрытия пар тридекамерных дуплексов методом ЯМР высокого разрешения, используя реакцию вырожденного обмена оснований в открытой форме с протонами воды. Была изучена кинетика процесса раскрытия и закрытия дуплекса, проведено измерение констант скорости для прямой и обратной реакции и определены константы равновесия между закрытой и открытой формами для индивидуальных нуклеотидов ряда ДНК дуплексов, что позволило определить степень влияния этого процесса на общую скорость реакции эксцизионной репарации под действием AAG.

1.5. Изучение динамики раскрытия ДНК дуплексов методом ЯМР

Тепловое движение двойной спирали играет критическую роль в структуре и функциях ДНК [105]. Раскрытие пар оснований представляет собой наиболее значительное отклонение от структуры двойной спирали. Установлено, что времена жизни открытых пар составляют в среднем порядка 10^{-7} секунды, а закрытых пар – порядка 10^{-2} секуннды, что позволяет оценить вероятность для нахождения конкретной пары оснований в открытом состоянии как 10^{-5} [106]. Несмотря на сравнительно низкую вероятность подобных событий, раскрытие Уотсон-Криковских пар создает активные группы оснований ДНК (которые в противном случае изолированы от окружения в глубине двойной спирали), доступные для взаимодействия с белками и химическими агентами [105]. Флуктуационное открытие пар оснований предполагает разрушение водородных связей между комплементарными основаниями и их выворачивание из спирали (рисунок 13). Будучи спонтанным, это событие является необходимой стадией в таких катализируемых ферментами процессах модификации ДНК, как селективное метилирование ДНК ферментами семейства метилтрансферазы [107] и гликозилирование T4 ДНК под действием β-глюкозилтрансферазы [108]. Ферменты систем репарации ДНК, например, ДНК урацилгликозилаза [107], 8-оксогуанин ДНК гликозилаза I [100] и алкиладенин ДНК гликозилаза [97], также используют механизм открытия оснований. Когда эти ферменты взаимодействуют с

ДНК, то модифицированное основание субстрата полностью выворачивается из спирали и помещается в полость фермента, специфично удерживающую поврежденное основание, и именно после достижения такого состояния запускается каталитическая стадия модификации [103].

Кинетические и термодинамические параметры раскрытия индивидуальных пар оснований в нуклеиновых кислотах могут быть получены на основе данных ЯМР-исследований зависимости скоростей обмена иминопротонов от концентрации катализатора [109, 110]. Предполагается, что в случае двойной спирали ДНК обмен иминопротонов остатков гуанина и тимина протекает только в открытом состоянии пар оснований. Более подробно данная методика описана в разделе 2.1.4 данной работы. Были опубликованы данные о скорости такого обмена в различных структурах ДНК: B-ДНК [111], B'-ДНК [112], Z-ДНК [113], ДНК с некомплементарными парами оснований [114] и ДНК с модифицированными основаниями [110, 115], в том числе и с основаниями, модифицированными для хранения эпигенетической информации[116], а также в комплексах ДНК с молекулами лекарств [117, 118] и ферментов[100].

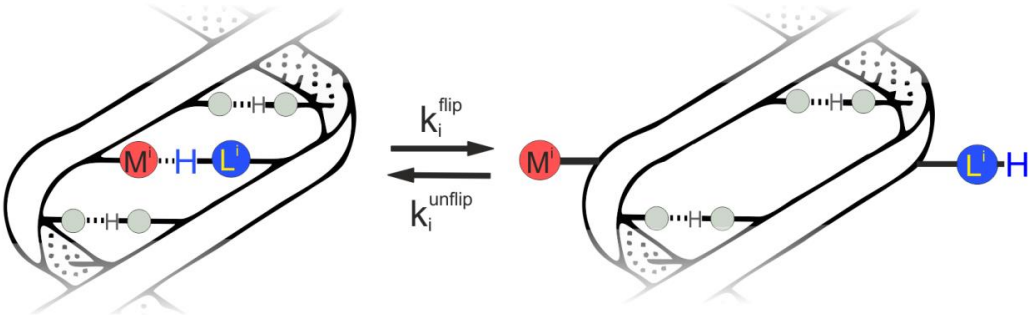


Рисунок 13. Схема выворачивания азотистых оснований из двойной спирали ДНК. M^i – азотистое основание-акцептор протона, L^i – азотистое основание-донор протона при образовании водородной связи в двойной спирали.

Получаемые таким образом данные позволяют установить детали динамики различных структур и комплексов и изучить механизмы процессов, затрагивающих функции ДНК живых организмов, таких как считывание генетической информации и репарация структуры этого биополимера.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Методы исследования

2.1.1. ХПЯ с временным разрешением (ВР-ХПЯ).

Принципиальная схема установки для проведения экспериментов методом ХПЯ с временным разрешением представлена на рисунке 14.

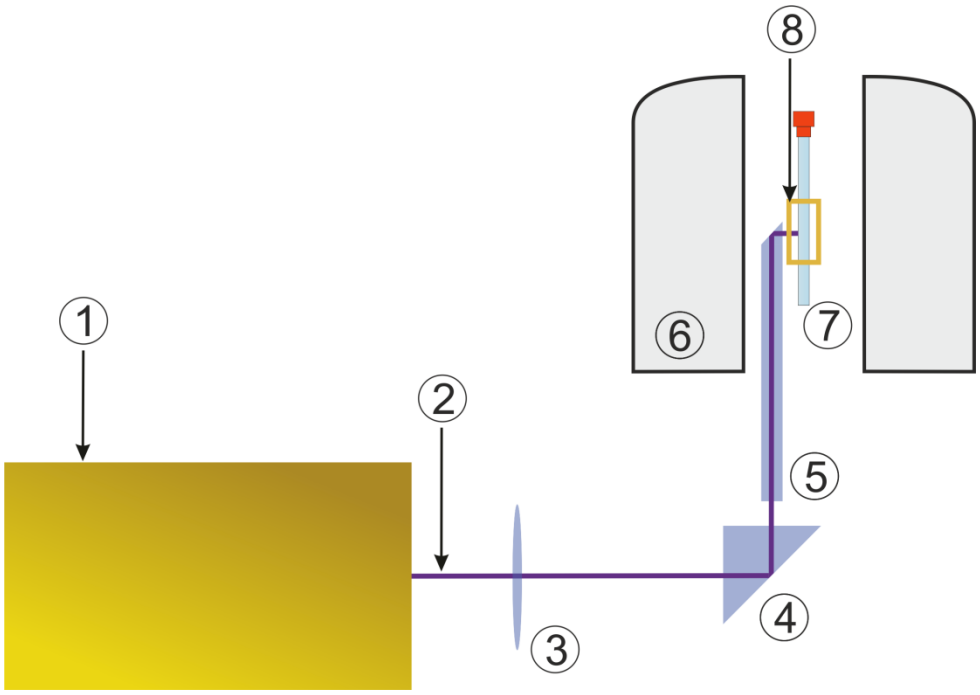


Рисунок 14. Принципиальная схема экспериментальной установки для кинетических исследований ХПЯ. 1 – импульсный УФ-лазер, 2 – оптическая ось луча лазера, 3 – собирающая линза, 4 – кварцевая призма для поворота луча, 5 – кварцевый световод в датчике ЯМР, 6 – криомагнит, 7 – образец в пирексовой ампуле, 8 – приемо-передающая катушка датчика ЯМР.

Спектры ХПЯ ^{13}C были записаны на приборе Bruker с полем в центре криомагнита 7.0 Тл, с использованием широкополосного датчика со встроенным цилиндрическим кварцевым световодом. Облучение лазером проводили при помощи импульсного эксимерного XeCl-лазера COMPEX Lambda Physik (λ=308 нм), мощность одного импульса на выходе 80-140 мДж, длина импульса 10 нс.

Для регистрации спектров ХПЯ ^{1}H использовалась аналогичная установка на базе прибора Bruker с криомагнитом, создающим напряженность поля 9.4 Тл, и лазера COMPEX Lambda Physik (λ=308 нм).

Регистрация геминальных спектров ХПЯ ^{1}H проводилась следующим образом. Сначала по каналу ^{1}H подаются импульсы преднасыщения в течение 2 с, после чего образец в ампуле облучается лазерным импульсом. Сразу после импульса подается РЧ-импульс с

максимально допустимой мощностью и минимальной длительностью, в описанных ниже экспериментах 20 Вт и 1 мкс соответственно. После импульса начинается регистрация спада свободной индукции. Для изучения кинетики формирования поляризации варьируется задержка τ_w в пределах от 0 до 100 мкс.

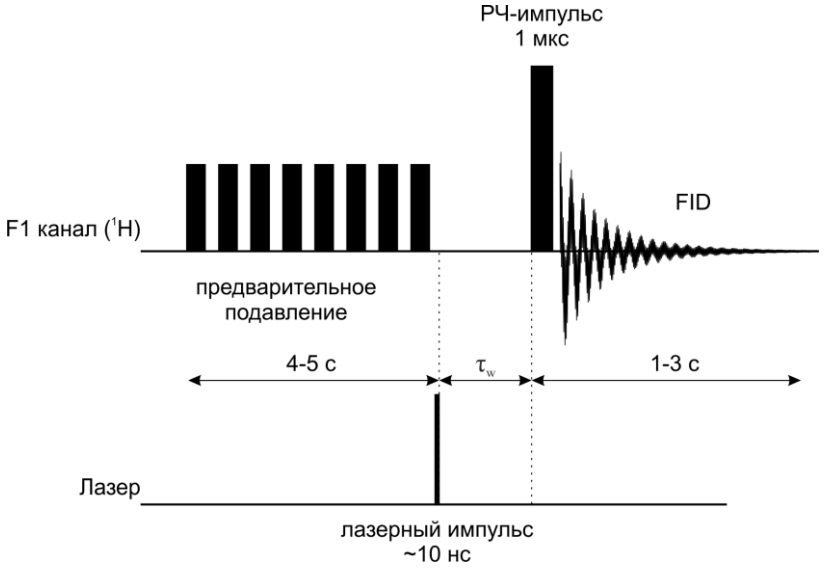


Рисунок 15. Временная диаграмма эксперимента для регистрации спектров ХПЯ ^{1}H с временным разрешением.

Для регистрации спектров ХПЯ ^{13}C использовалась модифицированная импульсная последовательность (см. рисунок 16). Вначале к образцу подают последовательность импульсов, которая подавляет все сигналы в спектре ЯМР ^{13}C. Это делается для того, чтобы, во-первых, удалить больцмановскую намагниченность ядер ^{13}C, во-вторых, подавление позволяет проводить накопление сигнала ХПЯ, повторяя облучение без ожидания возвращения системы в термическое равновесие, которое протекает за сравнительно длительные времена продольной релаксации T_1, характерные для ядер углерода. Затем на образец подается лазерный импульс, вслед за которым синхронизовано подается РЧ-импульс по каналу, работающему на резонансной частоте ядер углерода ^{13}C, и производится регистрация спада свободной индукции. Одновременно с импульсом лазера также запускается гетероядерный декаплер на резонансной частоте ядер ^{1}H, в результате чего в спектре ЯМР ^{13}C не проявляются скалярные спин-спиновые взаимодействия с ядрами ^{1}H. Это, в свою очередь, повышает отношение сигнал/шум в регистрируемых спектрах. Декаплер запускается именно в момент начала регистрации спада свободной индукции, а не до этого, чтобы исключить вклад в интенсивность сигналов ХПЯ за счет ядерного эффекта Оверхаузера.

Исследуемый раствор помещался в пирексовую ампулу диаметром 10 мм.

Концентрация фотосенсибилизатора подбиралась таким образом, чтобы оптическая плотность на длине волны лазерного излучения (308 нм) была порядка единицы (для ампулы диаметром 10 мм это значит, что 90% фотонов поглотится раствором). Концентрация тушителя рассчитывалась так, чтобы тушение всех возбужденных молекул сенсибилизатора происходило за времена много меньшие, чем характерные времена образования поляризации в результате гомогенных процессов, то есть $\frac{1}{k_q C_q} \ll \frac{1}{k_{rec} R_0} \sim 1$мкс, где k_q – константа тушения, C_q – концентрация тушителя, k_{rec} – константа скорости рекомбинации радикалов в растворе, R_0 – начальная концентрация РП, образовавшихся после лазерного импульса.

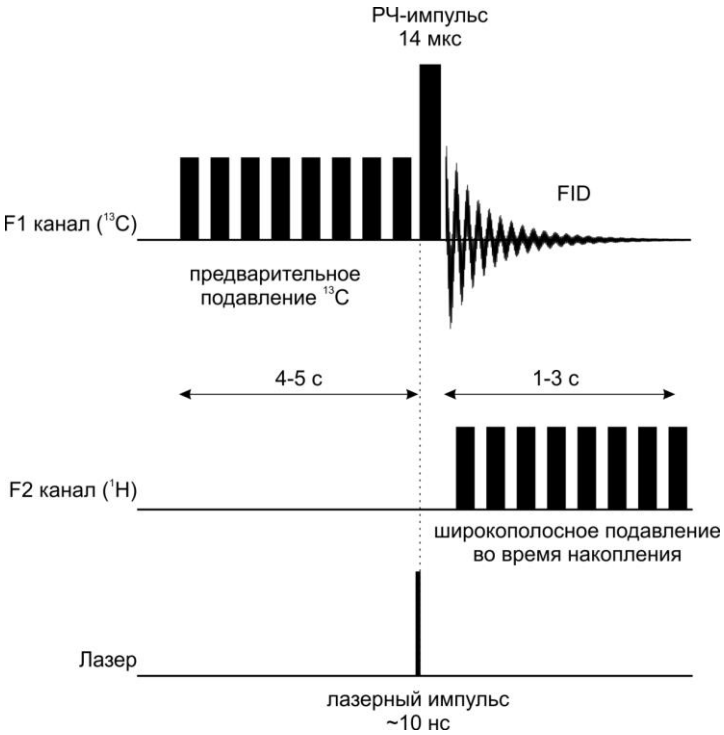


Рисунок 16. Временная диаграмма эксперимента для регистрации спектров ХПЯ ^{13}C с временным разрешением.

2.1.2. ХПЯ в переменных магнитных полях.

Для изучения полевых зависимостей эффектов гиперполяризации в МТЦ СО РАН была собрана установка для быстрого переключения магнитного поля. Она была создана на базе спектрометра Bruker с полем криомагнита 7.0 Тл и состоит из следующих узлов (см. рисунок 17):

1. Криомагнит
2. Электромагнит, компенсирующий остаточное поле криомагнита
3. Шаговый двигатель, контролирующий положение датчика с точностью 0.1 мм
4. Зубчатый ремень, передающий усилие двигателя
5. Датчик ЯМР, прикрепленный к ремню 4

6. Гибкий световод, передающий лазерное излучение в датчик ЯМР
7. Направляющая труба
8. Катушка, компенсирующая поле электромагнита
9. Эксимерный лазер XeCl (не показан на схеме).

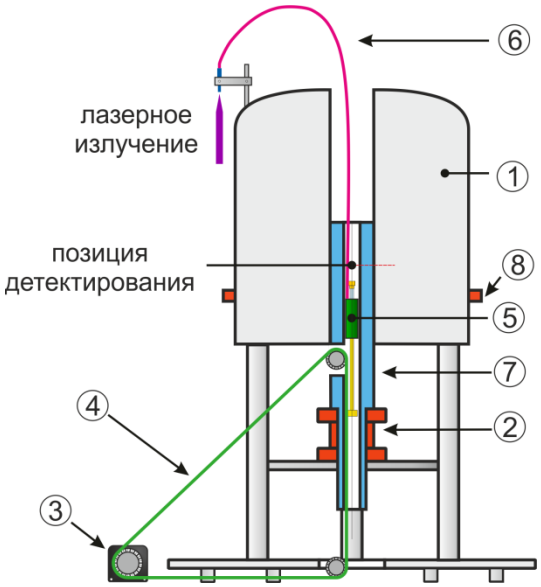


Рисунок 17. Схема установки для переключения магнитного поля.

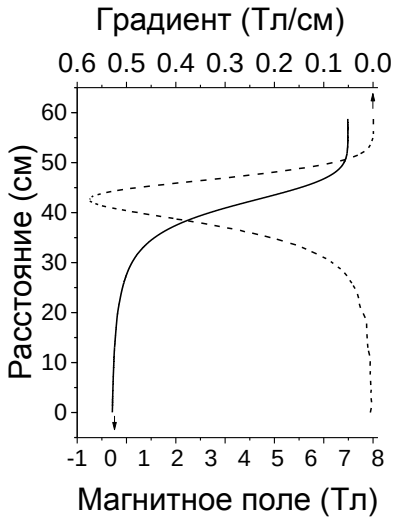


Рисунок 18. Профиль остаточного поля криомагнита и градиент поля.

Эта установка позволяет перенести датчик вместе с образцом из области с магнитным полем ~0.1 мТл в область с однородным магнитным полем криомагнита за 0.3-0.5 с, что существенно короче, чем время ядерной релаксации T_1 в большинстве случаев.

Для облучения лазером, подачи и регистрации РЧ-излучения был использован специальный датчик ЯМР, изготовленный из немагнитных материалов (см. рисунок 19).

В датчике можно выделить следующие элементы:

1. Приемо-передающая катушка (остальные радиоэлементы не показаны)
2. Кварцевый световод со скошенным под 40° полированным концом
3. Пирексовая ЯМР ампула (диаметр 5 мм) с изучаемым раствором
4. Турбинка для вращения ампулы
5. Коаксиальный кабель для связи радиочастотных элементов со спектрометром
6. Жидкостный гибкий световод, передающий излучение лазера в датчик в любой его позиции внутри теплого отверстия вдоль вертикальной оси криомагнита спектрометра; один его конец жестко закреплен, вторым он крепится к датчику
7. Крепление световода 6 к датчику.

В данном датчике есть только один резонансный контур, состоящий из приемо-передающей катушки и набора конденсаторов, позволяющий регистрировать спектры ЯМР

по протонам в поле 7.0 Тл (частота радиоизлучения 300 МГц). Длительность 90° импульса составляет 8.4 мкс.

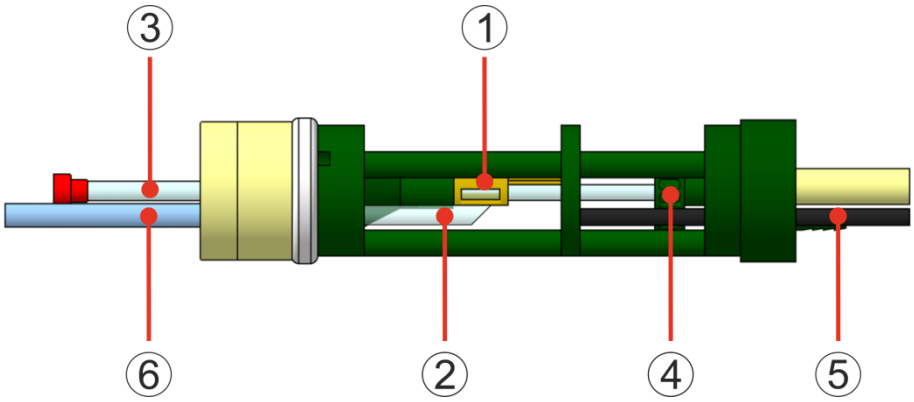


Рисунок 19. Устройство датчика, разработанного для изучения зависимости ХПЯ от напряженности магнитного поля. Описание – см. текст.

Для записи спектров ХПЯ в различных магнитных полях применялась следующая последовательность операций (см. рисунок 20).

1. Система релаксирует в магнитном поле B_{rel}~50 мТл в течение времени τ_{rel}~15 с.

2. Потом датчик быстро перемещается в поле B_{pol}, в котором происходит облучение лазерными импульсами и возникает ХПЯ. Время перемещения ($\tau_{tr1,2}$~0.1÷0.6 с зависит от величины требуемого магнитного поля) является коротким по сравнению со временем продольной релаксации ядер в диамагнитных продуктах.

3. Сразу после облучения датчик с образцом переносится в центр криомагнита (B_{reg}=7.0 Тл), где после некоторой задержки τ_w=0.2 с прилагается РЧ-импульс с последующей регистрацией спада свободной индукции.

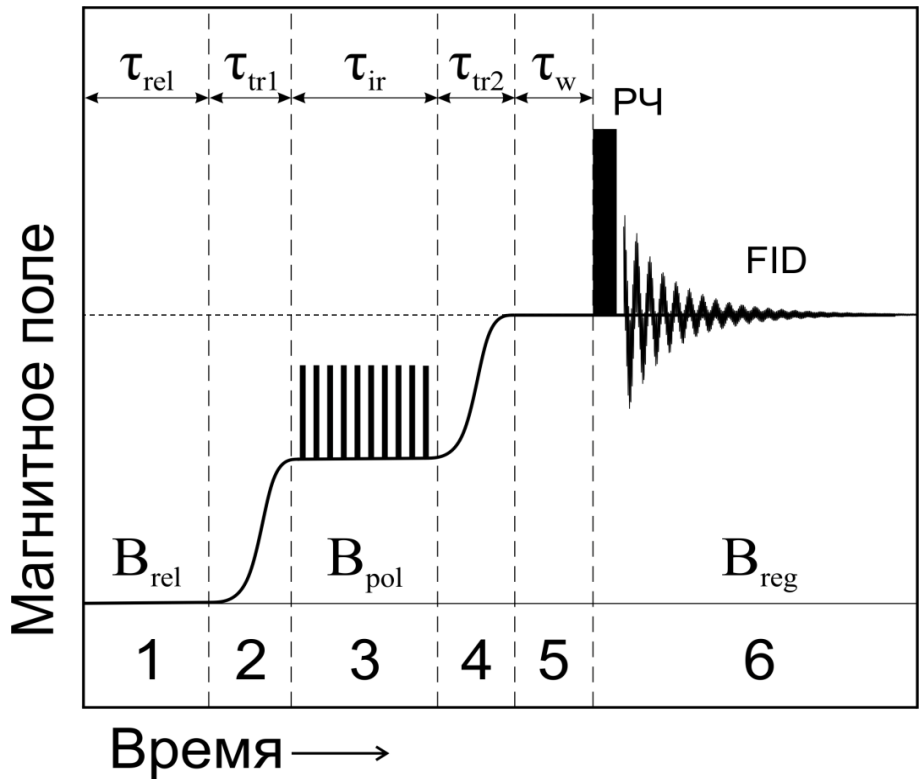


Рисунок 20. Протокол эксперимента по измерению зависимости ХПЯ от магнитного поля. τ_{rel} – время релаксации, $\tau_{tr1,2}$ – времена переноса датчика в другое магнитное поле, τ_{ir}— время облучения лазером, τ_w – задержка между моментами остановки датчика и подачей РЧ-импульса, τ_{reg} – время регистрации спада свободной индукции. B_{rel} – магнитное поле для релаксации ядерных спинов, B_{pol} – варьируемое поле, в котором создается ХПЯ, B_{reg} – магнитное поле высокой однородности для записи спектра ЯМР.

Следует также отметить преимущества и ограничения реализации данного метода с использованием этой установки.

Хотя точность величины магнитного поля B_0 обеспечена высокой точностью позиционирования датчика при помощи шагового двигателя, всегда присутствует градиент магнитного поля по образцу, который необходимо учитывать. Величина этого градиента зависит от позиции облучения, а характерные величины не превышают 10% изменения по облучаемой области (См. рисунок 18).

Благодаря релаксации в слабом поле, равновесная намагниченность образца пренебрежимо мала, что позволяет не проводить вычитание равновесного сигнала (темнового спектра) из спектра, полученного после облучения.

Типичное время переноса датчика $\tau_{tr} \leq 0.3$ с, обычно короче, чем времена продольной релаксации протонов в диамагнитных продуктах, что способствует сохранению созданной поляризации до момента регистрации сигнала.

С другой стороны, время переноса датчика гораздо длиннее, чем характерные времена кинетики изменения поляризации, вызванной диффузионными процессами и процессами

парамагнитной релаксации. Это значит, что изучение геминальной поляризации и, как следствие, извлечение данных о константах СТВ невозможно.

Следовательно, объектом исследований на данной установке является конечная поляризация продуктов на шкале времен, сравнимых со временами T_1. Это значит, что можно прилагать к системе несколько последовательных лазерных импульсов и повышать количество поляризованных диамагнитных молекул. В данной работе образец в каждом эксперименте облучался в течение 0.1 секунды при приложении 5 коротких лазерных импульсов с частотой 50 Гц.

Применение 45° импульса для регистрации ХПЯ позволяет наблюдать в спектре не только интегральную, но и мультиплетную поляризацию [21].

Описанная выше установка была использована и для исследований кинетики ХПЯ в поле 7.0 Тл, но без переключения магнитного поля.

2.1.3. Запись двумерных спектров ЯМР.

Все спектры 700 МГц ^{1}H ЯМР растворов ДНК дуплексов регистрировали с использованием спектрометра Bruker AVANCE III HD, оснащенного криомагнитом 16.4 Т и криодатчиком PRODIGY. Для обработки спектров ЯМР использовался программный пакет Bruker TopSpin. 1D спектры при температурах в диапазоне 2-60°C были записаны с помощью стандартной последовательности импульсов Excitation Sculpting для подавления сигнала воды (zgesgp) [119]. Данная последовательность имеет профиль возбуждения, показанный на рисунке 21: по широкому спектральному диапазону возбуждение идет практически одинаково эффективно, не возбуждается только узкая полоса в районе частоты нежелательного интенсивного сигнала, в нашем случае – сигнала протонов воды. Небольшое количество 3-(триметилсилил)-2,2,3,3-тетрадейтеропропионовой кислоты (TSP) использовали для калибровки химического сдвига. Для отнесения протонов оснований были получены NOESY спектры со временем смешивания 200 мс при температуре 15°C для A/T, 10°C для Hx/T, 15°C для εA/T и 2°C для F/T с использованием последовательности Excitation-Sculpting для подавления сигналов воды. Температура для 2D NOESY спектров была выбрана для лучшего разделения спектральных линий. Анализ двумерных спектров и отнесение проводилось в программе SPARKY [120].

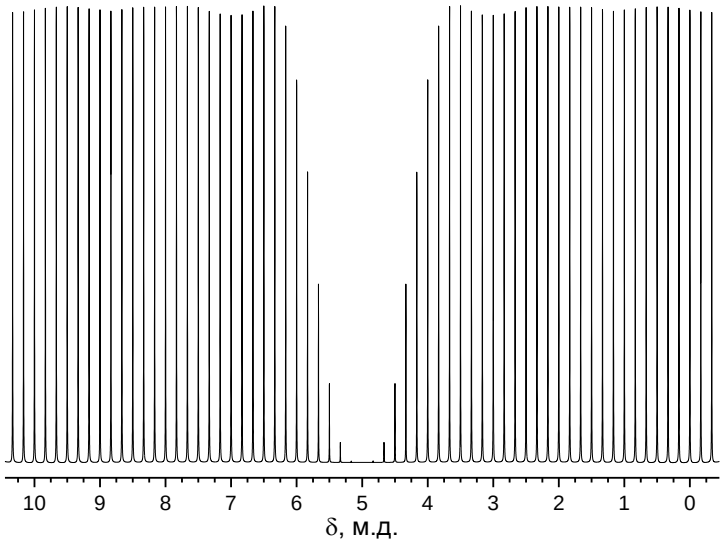


Рисунок 21. Зависимость интенсивности сигналов от их положения при применении импульсной последовательности zgesgp. Зависимость рассчитана в пакете программ NMR-SIM.

2.1.4. Измерение кинетики обмена протонов с растворителем.

^{1}H ЯМР эксперименты проводились на спектрометре Bruker Avance III HD 700, оснащенном криодатчиком TXI (^{13}C, ^{15}N, ^{1}H) PRODIGY и криомагнитом с напряженностью поля 16.4 Тл; эксперименты ^{14}N ЯМР проводились на спектрометре Bruker Avance III HD 400 с криомагнитом 9.4 Тл. Для измерений протонного обмена, повышение концентрации аммиака было получено путем последовательного добавления к образцу ДНК небольших аликвот растворов аммиака (0.3 и 3 М), pH определяли непосредственно в ампуле ЯМР с использованием предварительно калиброванной разницы между химическими сдвигами двух метиленовых групп триэтаноламина. Концентрацию аммиака в образце измеряли с помощью ^{14}N ЯМР. Интенсивность ^{14}N ЯМР сигналов аммиака была откалибрована отдельно для диапазона концентраций аммиака и аммония от 0.10 до 3.0 М. Концентрация акцептора иминопротонов (т.е. аммиака) рассчитывали из концентрации общего аммиака (C_0), и pH, как

$$[NH_3] = C_0 \times \frac{10^{-pKa}}{10^{-pH} + 10^{-pKa}} \quad (5.1)$$

pKa (NH_4^+) = 9.25 [76]

Скорости обмена протонов были измерены путем переноса намагниченности воды. Используемая для этого импульсная последовательность схематично показана на рисунке 22. Резонанс протонов воды селективно переворачивается 180°-импульсом в форме гауссовой функции (продолжительность 5.0 мс). За этим следует переменная задержка, во время которой иминопротоны участвуют в обмене с водой, катализируемом аммиаком, и

намагниченность протонов воды передается иминопротонам дуплексов. Для предотвращения воздействия радиационного затухания на восстановление намагниченности воды к равновесному состоянию, во время этой задержки обмена прикладывается слабый градиент (0.054 Гс/см). В конце задержки для обмена, применяется второй импульс гауссовой формы (продолжительность 2.0 мс) для возвращения намагниченности воды обратно вдоль оси Z. Для предотвращения подавления сигналов обмениваемых протонов, спектры ^{1}H ЯМР были получены с использованием последовательности Jump-and-Return для подавления воды (рисунок 22) [121]. Суть последовательности Jump-and-Return состоит в следующем: первый жесткий 90°-импульс, настроенный точно на частоту сигнала воды, поворачивает намагниченность всех протонов в плоскость XY, где эволюция под действием химических сдвигов заставляет намагниченность разных протонов вращаться с различной угловой скоростью вокруг внешнего магнитного поля. В тот момент, когда разность фаз между интересующим сигналом и сигналом воды составит 90°, подается второй 90° импульс, возвращающий сигнал протонов воды вдоль оси Z, и начинается запись спада свободной индукции. В каждом эксперименте использовалось по тридцать два значения обменных задержек в диапазоне от 1.3 до 1000 мс. Интенсивности сигналов иминопротонов зависят от длительности задержки τ следующим образом [122]:

$$\mathrm{I}(\tau) = \mathrm{I}_0 - \mathrm{I}_0\left(\frac{\mathrm{I_w}(0)}{\mathrm{I_w^o}} - 1\right)\left(\frac{\mathrm{k_{ex}}}{\mathrm{R_1} + \mathrm{k_{ex}} - \mathrm{R_{1w}}}\right)\left(\mathrm{e}^{-(\mathrm{R_1}+\mathrm{k_{ex}})\tau} - \mathrm{e}^{-\mathrm{R_{1w}}\tau}\right) \qquad (5.2)$$

Здесь I_0 − термическая поляризация иминопротона, $I_w(0)$ − поляризация воды после первого селективного импульса, I_w^o − термическая поляризация протонов воды, R_1 − скорость релаксации для иминопротона, R_{1w} − скорость релаксации для протонов воды, k_{ex} − эффективная константа скорости реакции протонного обмена, и это значение зависит от концентрации аммиака. Интенсивности сигналов были получены в ходе разложения спектра на отдельные компоненты, аналогично тому, что показано на рисунке 23. k_{ex} извлекаются из экспериментальных кинетик методом наименьших квадратов.

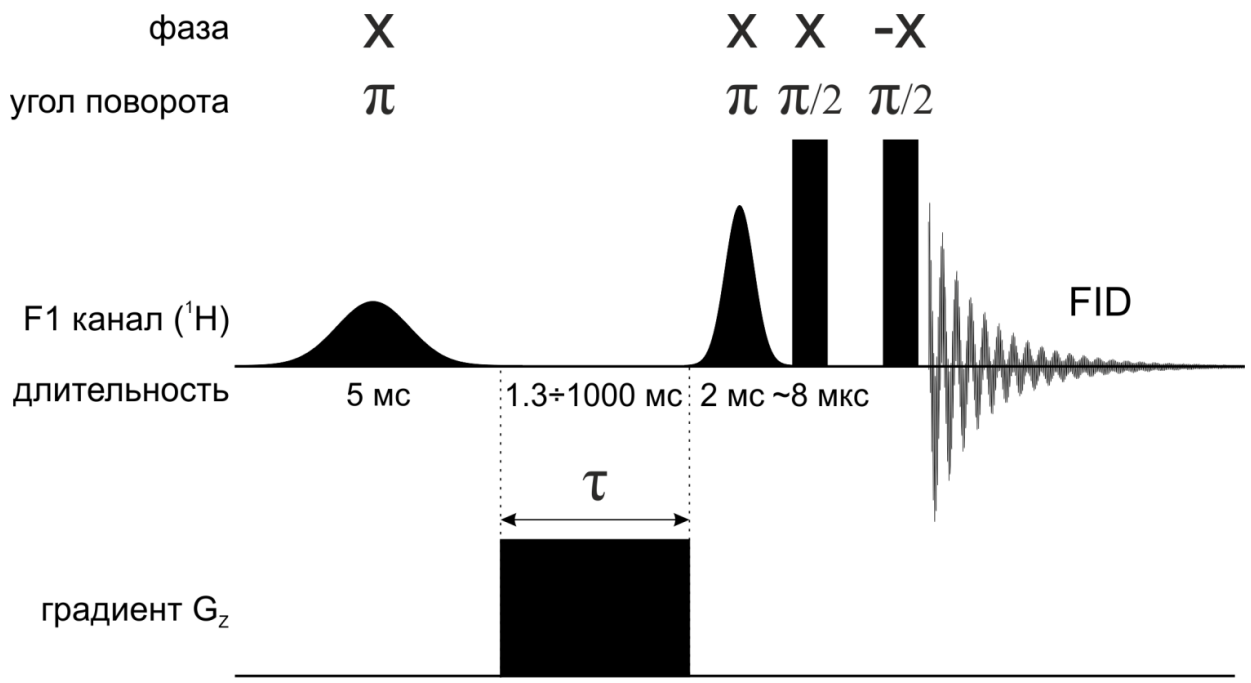


Рисунок 22. Последовательность импульсов, используемая в кинетических экспериментах по обмену протонов. ^{1}H обозначает канал, настроенный на частоту ларморовской прецессии протонов; прямоугольники – неселективные π/2-импульсы, фигуры в форме гауссовой функции – селективные π-импульсы. G_z обозначает градиенты поля вдоль оси Z.

k_{ex} в общем виде может быть выражена следующим образом через константы скорости отдельных стадий:

$$k_{ex} = \frac{\alpha k_{op}\left(k_{NH_3}[NH_3] + k_o\right)}{k_{op} + k_{cl} + \left(k_{NH_3}[NH_3] + k_o\right)} \quad (5.3)$$

В условиях наших экспериментов выполняется условие низкой концентрации акцептора протонов и поэтому в пределе $k_{cl} \gg \left(k_{op} + \left(k_{NH_3}[NH_3] + k_o\right)\right)$ линейная зависимость хорошо описывает полученные результаты (см. рисунок 61).

$$k_{ex} = \alpha K_{op}\left(k_{NH_3}[NH_3] + k_o\right) \quad (5.4)$$

Известно, что α приблизительно равна единице для аммиака [123], $k_{NH_3} = 4.0 \cdot 10^8 \frac{моль}{л \cdot с}$ и $k_{NH_3} = 1.1 \cdot 10^9 \frac{моль}{л \cdot с}$ при T и G, соответственно [124], при этом значения $K_{op} = k_{op}/k_{cl}$ могут быть легко получены из зависимостей k_{ex} от концентрации аммиака.

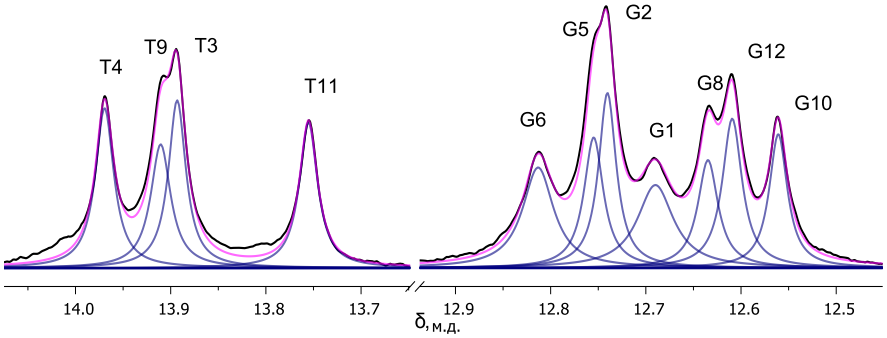


Рисунок 23. Разложение спектра ЯМР на компоненты на примере спектра тридекамерного F/T дуплекса. Спектр записан в ходе вышеописанного эксперимента по переносу поляризации с протонов воды на иминопротоны дуплекса, $[NH_3] = 0$, $\tau = 1.3$ мс. Черная линия – экспериментальный спектр; розовая линия – суперпозиция индивидуально просимулированных сигналов (отдельно линии показаны синим цветом).

2.1.5. Измерение pH.

pH водных растворов регулировали добавлением аликвот растворов DCl или NaOD. Измерения pH исследуемых растворов проводились pH-метром Мультитест ИПЛ 311, калибровка проводилась в протонных буферных растворах, вследствие чего экспериментальные значения pH, измеренные в растворах D_2O, соответствуют так называемым pH^*. Таким образом, по данным ЯМР были получены значения pK_a^*, а не обычные pK_a. Эти величины связаны друг с другом соотношением $pK_a = 0.929\ pK_a^* + 0.42$ [125].

2.1.6. Квантово-химические расчеты.

Геометрическое строение радикалов было оптимизировано с помощью метода UB3LYP/6-31G [126, 127] с учетом растворителя (воды) при помощи модели поляризованного континуума (PCM) [128]. Константы СТВ были рассчитаны методами UB3LYP/6-31G и UB3LYP/EPR II с учетом растворителя (воды) при помощи модели поляризованного континуума (PCM) [128]. Все расчеты были проведены с использованием пакета программ Gaussian-09 [129]. Данные методы показали хорошее совпадение расчетных данных с экспериментальными данными для модельных систем

2.2. Материалы и реактивы.

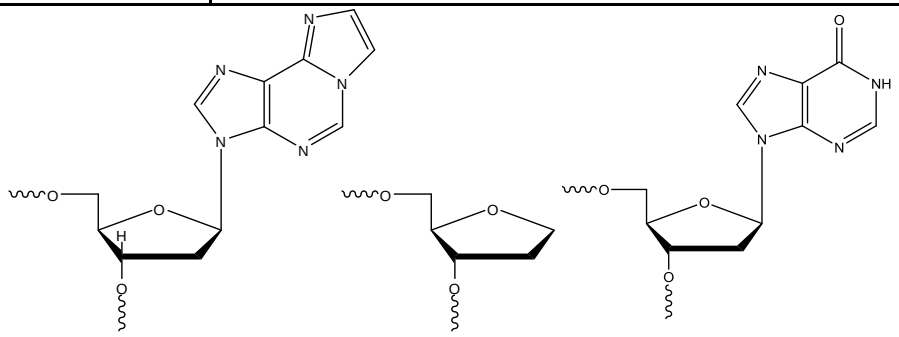
S-метилцистеин, S-метилглутатион, н-бутиламин, 4-карбоксибензофенон, бензофенон, 4,4-дикарбоксибензофенон, L-гистидин, 4-карбоксибензофенон (4-CBP), 3,3‘,4,4’-тетракарбоксибензофенон (TCBP), триэтаноламин, 3-(триметилсилил)-2,2,3,3-тетрадейтеропропионовой кислоты (TSP), NH_3 (~30%-ный раствор в H_2O), DCl (~30%-ный раствор в D_2O), NaOD (~30%-ный раствор в D_2O), и D_2O были приобретены в Sigma-Aldrich и были использованы без дополнительной очистки.

2.2.1. ДНК дуплексы.

Все ДНК дуплексы, использованные в данной работе, были получены от с.н.с., д.х.н. Н. А. Кузнецова, ИХБФМ СО РАН, методика синтеза описана в [130]. Были изучены четыре тридекамерных ДНК дуплекса, нуклеотидная последовательность и структурные формулы неканонических фрагментов которых представлены в таблице 4.

Таблица 4. Олигодезоксирибонуклеотидные дуплексы, изученные в данной работе.

Обозначение	Нуклеотидная последовательность ДНК-субстратов
X/T	$T^{1}\,C^{2}\,T^{3}\,C^{4}\,T^{5}\,C^{6}\,\mathbf{X}^{7}\,C^{8}\,C^{9}\,T^{10}\,T^{11}\,C^{12}\,C^{13}$
X = εA, Hx, A, F	$A^{1}\,G^{2}\,A^{3}\,G^{4}\,A^{5}\,G^{6}\,\mathbf{T}^{7}\,G^{8}\,G^{9}A^{10}\,A^{11}\,G^{12}\,G^{13}$



2.2.2. Приготовление образцов растворов ДНК дуплексов.

Для проведения ЯМР экспериментов ДНК-дуплексы были растворены до общей концентрации 0.25 мМ в смеси 95% H_2O/5% D_2O, содержащей 25 мМ фосфатного буфера, 0.1 M NaCl при pH 6.8. Каждый дуплекс готовили путем растворения двух одноцепочечных олигонуклеотидов 5'-d($T^1C^2T^3C^4T^5C^6X^7C^8C^9T^{10}T^{11}C^{12}C^{13}$)-3' и 3'-d($A^1G^2A^3G^4A^5G^6T^7G^8G^9A^{10}A^{11}G^{12}G^{13}$)-5' с той же концентрацией, где X = A, Hx, εA и F. Концентрация олигонуклеотидов была проверена с помощью ЯМР. Каждый раствор нагревали до 70° C и затем охлаждали для образования стабильного дуплекса.

2.3. Математическая обработка результатов.

Математическая обработка всех полученных экспериментальных данных включала в себя следующее.

Преобразование одно- и двумерных спадов свободной индукции в частотные спектры при помощи преобразований Фурье в программном пакете TopSpin с последующим интегрированием сигналов.

Полученные зависимости интегралов от временных интервалов и/или напряженности магнитного поля затем сравнивали с результатами моделирования соответствующими функциями при помощи программ, написанных в среде MATLAB [131].

В спектрах, полученных при изучении динамики раскрытия ДНК дуплексов, сигналы обменивающихся протонов сильно перекрывали друг друга, что сделало интегрирование неэффективным методом анализа. Для работы с такими спектрами потребовалось разложение спектров на отдельные линии. Необходимые для этого программы были написаны соискателем в среде MATLAB [131].

Глобальная подгонка параметров, наилучшим образом описывающая набор данных, а также графическое представление проводились при помощи программного пакета ORIGIN 9.5 [132].

Расчеты полевых зависимостей ХПЯ проводились по модели Адриана (описана в разделе 1.1.4) в среде MATLAB. Программа для подбора оптимальной разности g-факторов по экспериментальным зависимостям приведена в Приложении. В данной программе идет перебор всех возможных конфигураций спинов ядер, для каждого из них считаются вероятности синглет-триплетного перехода, после чего берется разность этих вероятностей с положительной и отрицательной поляризацией одного из спинов. Параметрами расчета являются константы СТВ в РП, они должны быть предварительно определены по спектрам ЭПР или геминальным спектрам ХПЯ.

Глава 3. Результаты и обсуждение.

3.1. Когерентные эффекты переноса поляризации имеют решающее значение для интерпретации данных низкополевой ХПЯ.

В данной части работы показано, что при исследовании полевой зависимости химической поляризации ядер (ХПЯ), которая формируется в процессе спиновой эволюции в промежуточных радикальных парах, следует учитывать процессы перераспределения поляризации в диамагнитных продуктах реакции. Такие процессы имеют важное значение в таких магнитных полях, когда ядерные спины продуктов реакции сильно связаны, что означает, что спин-спиновые взаимодействия сопоставимы с различиями частот прецессии, обусловленной их зеемановским взаимодействием с внешним магнитным полем. В этом случае перенос поляризации является когерентным процессом; как следствие, спины могут получить значительную поляризацию, даже если они не имеют СТВ с электронным спином в радикальной паре, то есть не могут быть поляризованы непосредственно по механизмам ХПЯ. Это будет показано в этой работе на ХПЯ н-бутиламина в качестве примера: в этом случае только α-CH_2 протоны поляризованы напрямую, что подтверждается ХПЯ в сильном поле, в то время как β-CH_2, γ-CH_2 и δ-CH_3 протоны поляризуются только косвенно в связи с передачей поляризации от α-CH_2 протонов в диамагнтьной молекуле. Эти результаты показывают, что при интерпретации данных ХПЯ в низком магнитном поле следует учитывать как эффекты спиновой эволюции в промежуточных радикальных парах, так и перенос поляризации в диамагнитных продуктах реакции.

3.1.1. Проявление переноса поляризации в экспериментах по измерению низкополевой ХПЯ.

Как обсуждалось в разделе 1.1, измерение зависимости ХПЯ от напряженности внешнего магнитного поля является ключевым в определении ЭПР параметров; теоретическое моделирование таких полевых зависимостей потенциально позволяет определить магниторезонансные параметры радикалов, в частности, константы сверхтонких взаимодействий (КСТВ) в РП, Δg – разницу электронных g-факторов партнеров в РП, и электронное обменное взаимодействие.

В этой работе далее будет показано, что не все данные для полевой зависимости ХПЯ могут быть использованы для определения параметров РП, как это считалось ранее. Это объясняется тем, что при слабых напряженностях магнитного поля спиновая динамика в РП не является единственным фактором, влияющим на наблюдаемую ХПЯ. Низкополевая ХПЯ является более сложной для анализа, что будет продемонстрировано на примере н-бутиламина. Традиционно считается, что спектр детектируемых интенсивностей ХПЯ

напрямую отражает КСТВ в РП, при этом применялась стратегия для определения констант СТВ и разницы g-факторов партнеров РП. Из особенностей в полевой зависимости ХПЯ при малых (порядка величин КСТВ) магнитных полях, можно определить константы СТВ, в то время как из анализа сильнополевой части зависимости ХПЯ (заранее определив КСТВ), можно также определить значение Δg. Такой подход по умолчанию предполагает, что интенсивность ХПЯ конкретного ядра непосредственно связана с его константой СТВ, другими словами, только спиновая динамика в РП имеет влияние на интенсивность наблюдаемых сигналов ХПЯ. Такое предположение, в большинстве случаев, действительно оправдано в сильных полях; кроме того, во многих ситуациях сигналы ХПЯ прямо пропорциональны соответствующим константам СТВ [16]. Тем не менее это предположение не является верным при низких полях. Причиной этого является перераспределение гиперполяризации, происходящее в продуктах реакции. Это эффективный процесс, который полностью меняет картину ХПЯ, диктуемую КСТВ, и должен быть принят во внимание. На практике, это делает количественную интерпретацию низкополевой ХПЯ очень сложной; поэтому должны быть использованы альтернативные подходы к извлечению констант СТВ.

Эксперименты проводились следующим образом. На первой стадии образцы облучали лазерным светом в магнитном поле B_{pol}; типичное время облучения, τ_p, составляло 4 с. Затем образец механически перемещался из положения с магнитным полем B_{pol} в область с полем для детектирования ЯМР B_0; времена переключения, τ_{fv}, были короче, чем 0.3 с, чтобы избежать релаксации поляризации. Наконец, при $B = B_0$ регистрировались спектры ХПЯ. Переключение поля происходило за счет механического переноса всего датчика ЯМР в неоднородном поле, являющемся суперпозицией остаточного поля криомагнита ЯМР и поля вспомогательных электромагнитов [133]. Облучение светом проводилось непосредственно внутри датчика ЯМР через гибкий световод. Для экспериментов был приготовлен раствор 3.0 мМ н-бутиламина ($BuNH_2$) и 1.5 мМ 4-карбоксибензофенона (4CBP), использованного в качестве фотосенсибилизатора, растворы были приготовлены в D_2O при pH*=12.0; ХПЯ была сформирована в ходе следующей реакции:

$$4CBP \xrightarrow{h\nu} {}^{S}4CBP^{*} \xrightarrow{ISC} {}^{T}4CBP$$

$${}^{T}4CBP + BuND_2 \rightarrow {}^{T}\overline{\left(4CBP^{-\cdot} + BuND_2{}^{+\cdot}\right)}$$

$${}^{T}\overline{\left(4CBP^{-\cdot} + BuND_2{}^{+\cdot}\right)} \rightarrow {}^{S}\overline{\left(4CBP^{-\cdot} + BuND_2{}^{+\cdot}\right)} \rightarrow 4CBP + BuND_2$$

Известно, что катион-радикал бутил амина подвергается быстрому дедейтерированию в щелочных растворах

$$\mathrm{BuND_2}^{+\cdot} + \mathrm{OD}^- \rightarrow \mathrm{BuND}^{\cdot} + \mathrm{D_2O}$$

Следовательно, ХПЯ также образуется при рекомбинации радикальной пары $4\mathrm{CBP}^{-\cdot} + \mathrm{BuND}^{\cdot}$; т.е. радикалы $\mathrm{BuND}^{\cdot}$ и $\mathrm{BuND_2}^{+\cdot}$ были ответственны за возникновение эффекта ХПЯ.

Типичные спектры ^{1}H ХПЯ представлены на рисунке 24. Видно, что при высоких магнитных полях ХПЯ формируется только на α-CH_2 протонах, что согласуется со структурой радикала, который является N-центрированным. По этой причине спиновая плотность на других протонах мала, и они не поляризуются. В слабых полях ситуация качественно иная: все протоны поляризуются, в том числе даже самые удаленные δ-CH_3 протоны. Это наблюдение ясно показывает, что полевая зависимость ХПЯ в слабых полях совершенно не отражает распределение спиновой плотности и СТВ в радикалах. Конечно, в слабых полях не существует простой связи между ХПЯ и СТВ (может возникнуть ситуация, когда при определенной напряженности поля, ядро с большой КСТВ может приобрести только очень малую ХПЯ); однако, нулевая константа СТВ для определенного ядра означает, что он не участвует в спиновой динамике РП. По этой причине такие ядра, как β-CH_2, γ-CH_2 и δ-CH_3 протоны в нашем случае, не могут напрямую получить гиперполяризацию в процессе спиновой эволюции РП. Таким образом, необходимо рассмотреть другие пути для объяснения наблюдаемых закономерностей спиновой поляризации, но уже на стадии диамагнитных продуктов.

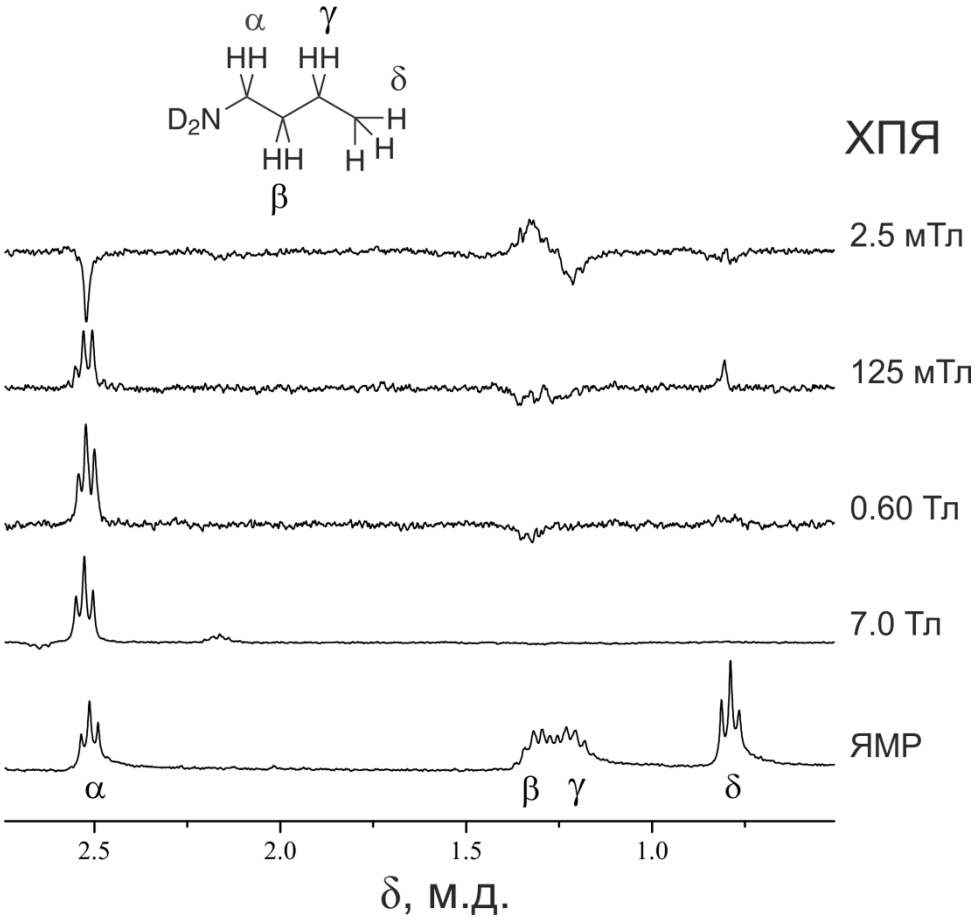


Рисунок 24. ^{1}H ХПЯ спектры н-бутиламина, записанные при облучении в разных полях B_{pol}. Протонный ЯМР-спектр в поле 7.0 Тл с отнесением сигналов показан ниже; также приведена структура н-бутиламина. Для регистрации спектров использовались 90° РЧ-импульсы.

Измерение зависимости ХПЯ от магнитного поля (см. рисунок 25а) делает ситуацию более озадачивающей: полевая зависимость ХПЯ протонов α-CH_2 и β-CH_2 не является гладкой, но имеет дополнительные экстремумы в диапазоне полей от 60 мТл до 1 Тл (этих особенностей нет на зависимостях для γ-CH_2 и δ-CH_3 на рисунке 25б). В этих полях не ожидается никаких особенностей в результате спиновой динамики в РП. Действительно, особенности в низкополевой области формируются на полях порядка эффективной КСТВ в РП (около 6 мТл в нашем случае); высокопольные особенности формируются в областях, заданных отношением КСТВ, деленной на значение Δg (около 30 Тл и 7 Тл в нашем случае для первичной и вторичной РП, соответственно). Таким образом, эти особенности возникают не из-за спиновой эволюции в РП, но имеют другое происхождение.

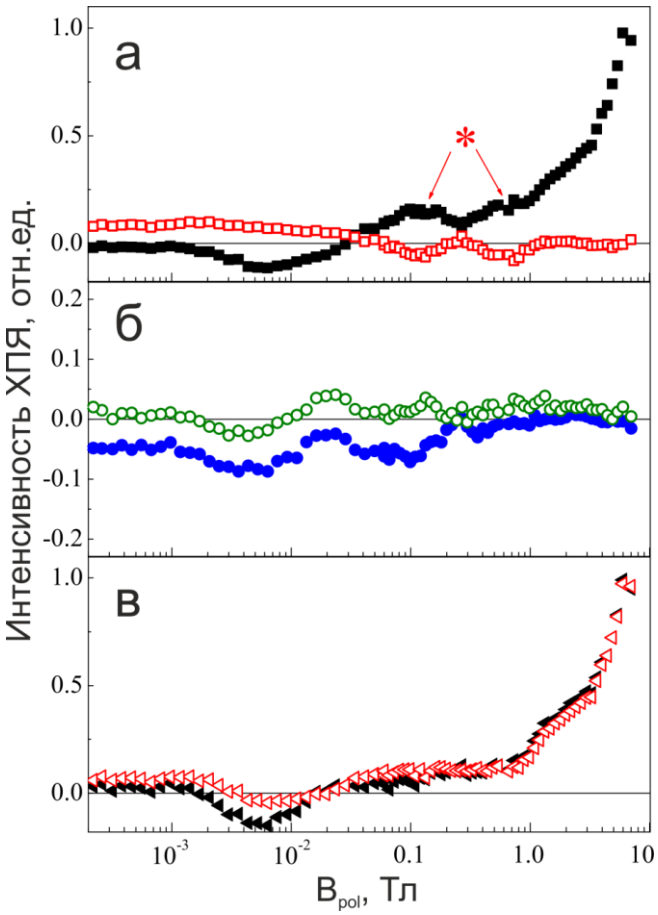


Рисунок 25. Зависимости ХПЯ от магнитного поля, полученные для различных протонов н-бутиламина (а, б) и общая ХПЯ (в) α-CH_2 и β-CH_2 протонов (белые треугольники) и из всех семи протонов (черные треугольники). В ХПЯ различных протонов использованы следующие символьные обозначения: черные квадраты – α-CH_2; белые квадраты – β-CH_2; синие кружки – γ-CH_2; белые кружки – δ-CH_3; звездочка обозначает позиции дополнительных особенностей при 0.15 и 0.7 Тл. Один и тот же коэффициент нормализации был использован для построения всех полевых зависимостей.

3.1.2. Когерентный перенос поляризации.

В целом, наблюдаемые эффекты приводят к выводу, что спиновая динамика в РП не является единственным фактором, который определяет спектральную картину: должен быть еще один фактор, который сильно влияет на ХПЯ и действует только в низких полях. Этот эффект, скорее всего, – перераспределение ХПЯ в диамагнитных продуктах реакции. Как уже было отмечено в работах де Кантера и Каптейна [24], есть два возможных способа такой передачи поляризации: стохастический (кросс-релаксации) и динамический. В данном случае механизм кросс-релаксации должен быть исключен по двум причинам. Во-первых, этот механизм действует не только при слабом поле, но и в высоких полях, что приводит к ядерному эффекту Оверхаузера (ЯЭО), широко используемому в ЯМР-спектроскопии [134, 135]. Во-вторых, характерные времена кросс-релаксации значительно больше, чем времена T_1-релаксации, тогда как в наших опытах общее время, необходимое для записи одного спектра ХПЯ, короче, чем T_1. По этим причинам, данные объясняются

когерентным механизмом. Такой механизм был подробно объяснен в работах [25, 136], за счет скалярного спин-спинового взаимодействия в условиях сильной связи спинов. Здесь и далее, под сильной связью имеется в виду ситуация, когда скалярное взаимодействие |J| между спинами больше или сравнимо с разницей δν их зеемановских взаимодействиях с внешним полем. Поскольку эта разница растет пропорционально полю, условие сильной связи выполняется только в слабых полях. Важной особенностью сильно связанных спинов является то, что их собственные состояния больше не характеризуются проекциями отдельных спинов; вместо этого, собственные состояния являются суперпозицией спиновых состояний с различными проекциями ядерных спинов. Перенос поляризации при малых полях затем происходит следующим образом [25]. Приготовление ХПЯ создает неравновесные населенности смешанных собственных состояний; кроме того, образуются когерентности между состояниями [137]. После того, как они образуются, такие когерентности немедленно начинают эволюционировать и опосредовать перенос поляризации. В н-бутиламине спины сильно связаны в полях ниже 1 Тл, что согласуется с диапазоном поля, где ХПЯ перераспределяется в молекуле. Характерное время передачи поляризации определяется обратной константой спин-спиновых взаимодействий. Как правило, передача происходит на шкале времени в мс, то есть быстрее, чем $\tau_p+\tau_{fv}$. Действительно, в нашем случае константы спин-спинового взаимодействия между соседними группами спинов порядка 7-8 Гц, что дает оценку для времени передачи примерно 0.02 с. Важно отметить, что этот механизм обеспечивает передачу поляризации по цепочке спинов, в которой каждый спин сильно связан со своими соседями. Как следствие, поляризация может передаваться от одного конца цепи к другому, даже при отсутствии прямой связи между терминальными спинами (или группами спинов). Этот механизм объясняет наблюдаемое поведение ХПЯ при низких полях. То есть, только α-CH_2 протоны поляризованы непосредственно (так как они являются единственными ядрами, имеющими КСТВ в РП), тогда как другие спины приобретают поляризацию лишь в диамагнитном состоянии в результате переноса поляризации. Механизм учитывает все наблюдаемые явления: (I) разное поведение в высоких и низких полях; (II) время передачи; (III) перенос поляризации на большие расстояния по всей молекуле.

Важно также отметить особенности, наблюдаемые при промежуточных полях, которые не могут быть объяснены с помощью спиновой динамики в РП. Здесь эти особенности относятся к спиновой эволюции в продуктах реакции. Действительно, если сложить ХПЯ всех протонов, как показано на рисунке 25в, эти особенности полностью исчезают. Поэтому они не связаны с особенностями спиновой динамики в РП, но, вместо этого, с особенностями перераспределения ХПЯ в продуктах реакции. Таким образом,

эффективность переноса поляризации при некоторых напряженностях поля имеет свои максимумы и минимумы, что приводит к “провалам” в полевой зависимости ХПЯ альфа-CH_2 протонов, поляризованных непосредственно, и к пикам на зависимостях ХПЯ других протонов. Поясним существование этих особенностей с помощью антипересечений уровней (АПУ) ядерных спинов, про которые известно [22, 25, 30, 31], что они существенно влияют на явления переноса поляризации при малых полях. Как обычно, под АПУ мы имеем в виду следующее: при определенной напряженности поля два уровня подходят близко друг к другу и стремятся пересечься; тем не менее, в присутствии связующего матричного элемента V уровни расталкиваются и минимальное расщепление равно 2V. В районе АПУ собственные состояния системы изменяются значительно: они отличаются от тех, которые соответствуют пересекающимся уровням, но представляют их суперпозицию, то есть, перемешиваются. По этой причине вблизи АПУ перемешивание состояний ядерных спинов всегда вступает в силу; в частности, передача ХПЯ происходит наиболее эффективно. Так как регионы АПУ, как правило, узкие, каждое АПУ приводит к резкой особенности на полевой зависимости. Для определения позиции АПУ в нашем случае можно моделировать поведение спинов в молекуле с помощью четырехспиновой системы типа AA’MM’ (где AA’ символизирует два химически эквивалентные протона α-CH_2 и MM’ – β-CH_2) и использовать аналитические результаты, полученные в работе [30]. Конечно, такое упрощение исходной девятиспиновой системы является относительно грубым приближением; тем не менее, эта модель позволяет получить аналитические выражения, которые являются достаточно точными. В AA’MM’ системе имеются пересечения, существующие между следующими парами уровней:

$$|T_{\pm}T_{\mp}\rangle \text{ и } |T_0T_0\rangle \text{ при } \delta\nu_{AM} = \pm J_{AM}$$

$$|T_{\pm}T_{\mp}\rangle \text{ и } |SS\rangle \text{ при } \delta\nu_{AM} = \pm(J_{AA'} + J_{MM'} - J_{AM})$$

Здесь в обозначениях состояний первый и второй символы описывают состояния спинов протонов AA’ и MM’, соответственно; $\delta\nu_{AM}$ – разница в зеемановских взаимодействиях с полем спинов A и M; $J_{AA'}$ и $J_{MM'}$ – константы скалярного спин-спинового взаимодействия в группах спинов AA’ и MM’; J_{AM} – взаимодействие между спинами из разных групп. Подставив разность химического сдвига для протонов α-CH_2 и β-CH_2 (~ 1.19 миллионных долей) и констант ($J_{AA'} \approx J_{MM'} \approx$ -15 Гц и $J_{AM} \approx 7$ Гц), получаем, что пересечение первого рода происходит в поле около 0.14 Тл, в то время как пересечение второго рода происходит в поле приблизительно 0.7 Тл. Оба значения находятся в хорошем согласии с полями, в которых наблюдаются особенности в полевой зависимости ХПЯ, см. рисунок 25а.

3.1.3. Эксперименты по непосредственному наблюдению когерентных биений в релаксации поляризации н-бутиламина

Для подтверждения вышеизложенного вывода о том, что наблюдаемый в экспериментах ХПЯ перенос поляризации имеет когерентную природу, был проведен эксперимент по непосредственному наблюдению когерентных биений в релаксации поляризации между протонами н-бутиламина

Для моделирования спиновой динамики протонов н-бутиламина был проведен расчет в программе iRelax[138], рассчитывающая спиновую динамику методом матрицы плотности, рис 26. Расчет был проведен для следующего эксперимента: инверсия сигнала протона в альфа положении селективным импульсом, переключение до величины B_{pol} – варьируемое поле (учитывался реальный профиль поля в установке[139]), переменная задержка в этом поле, обратное переключение напряженности магнитного поля от B_{pol} до B_0, в котором происходит регистрация спектра после приложения жесткого 90°-импульса. Релаксация протонов не принималась во внимание вследствие большого размера системы, содержащей 9 спинов протонов.

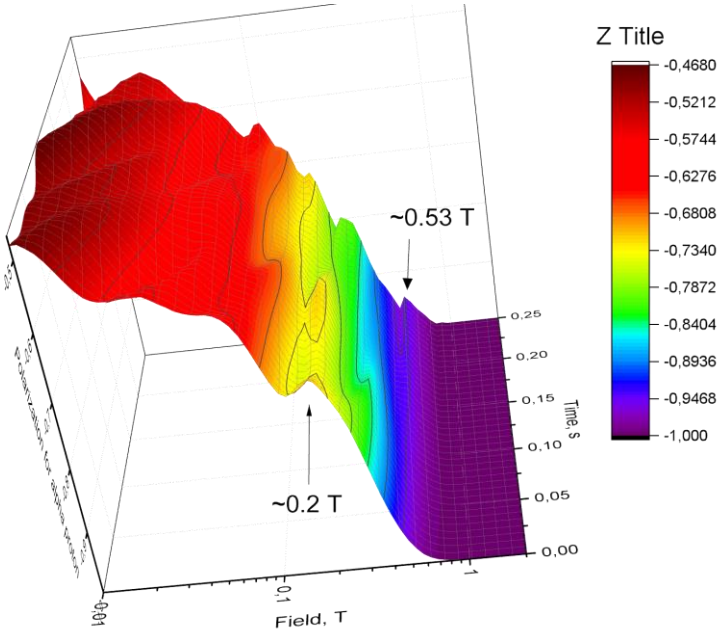


Рисунок 26. Рассчитанное поведение намагниченности протона в альфа положении н-бутиламина от варьирования поля и задержек, подробности моделированного эксперимента см. в тексте.

Расчет позволил выделить области напряженности магнитного поля, при которых должны наблюдаться биения с максимальной амплитудой, это 0.53 Тл, 0.20 Тл (можно отметить, что эти позиции совпадают с положениями максимумов переноса ХПЯ, показанных на рисунке 25).

Экспериментальные данные (протокол эксперимента полностью аналогичен тому, что использовался в расчетах) на рисунке 27 показывают спад, который хорошо описывается суперпозицией трех экспоненциальных функций.

$$Int(t) = A_\infty + A\, exp\left(\frac{-t}{T_1}\right) + a_1\, exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + a_2\, exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right) \qquad (3.1.1)$$

Это можно интерпретировать следующим образом: первый экспоненциальный вклад – это продольная релаксация термической поляризации в данном поле, а еще два вклада – учет когерентностей, на соответствующие антипересечения мы в эксперименте настроились так точно, что они не проявляются как биения, а только ускоряют релаксацию.

T_1 в разных полях определялись из дополнительных экспериментов.

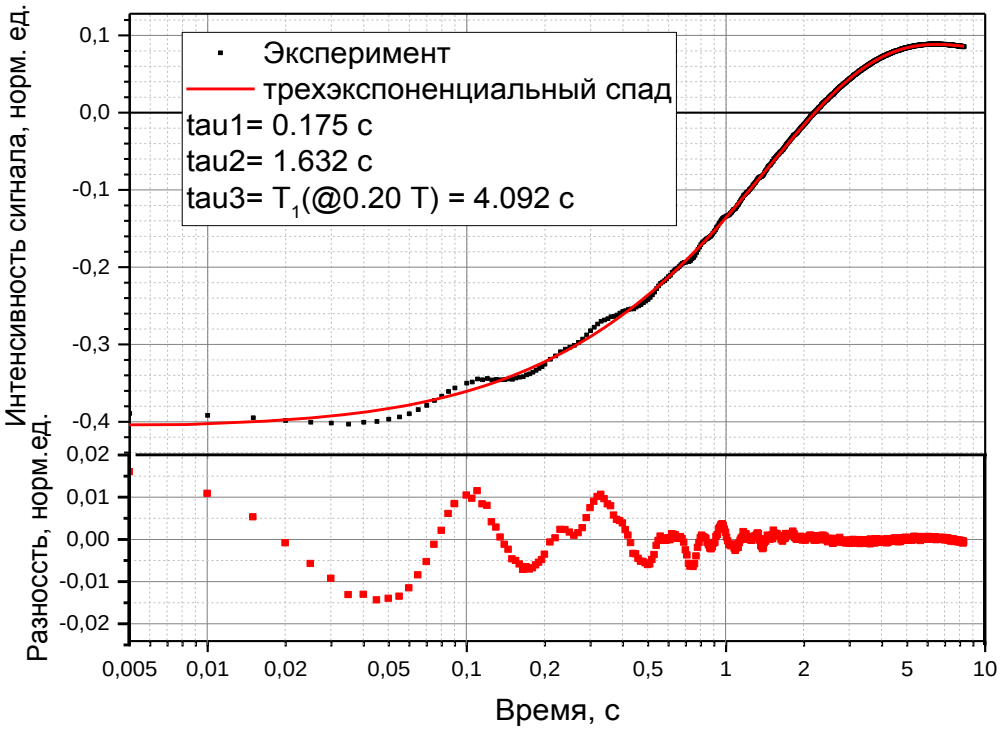


Рисунок 27. Экспериментальная зависимость интенсивностей сигналов (черные символы) и результат наилучшей подгонки параметров по уравнению (3.1.1)

Таблица 5. Рассчитанные параметры для уравнения 3.1.1. для протонов в различных положениях н-бутиламина для полей 0,53 Тл и 0,20 Тл

Поле, Тл	Положение в бутиламине	A_∞, норм. ед.	T_1, с	A, норм. ед..	τ_1, с	a_1, норм. ед.	τ_2, с	a_2 , норм. ед.
0.53	α	0.093	4.23	-0.33	2.28	-0.395	0.08	-0.041
	β	0.098	4.32	0.55	1.76	0.232		
	γ	0.081	4.52	0.79	1.61	0.085		
	δ	0.089	4.43	0.91	0.92	-0.019		
0.20	α	0.072	4.09	0.13	1.63	-0.573	0.18	-0.038
	β	0.061	4.20	0.45	1.01	0.186		
	γ	0.063	4.28	0.534	1.95	0.228	0.09	0.046
	δ	0.069	4.23	0.403	3.11	0.512		

После вычета трехэкспоненциального спада получились биения сигналов ЯМР, показанные на рисунке 28. Фурье-образ биений протонов в альфа-положении н-бутилмина в поле $B_{эвол}$=0,20 Тл, подогнанный 12-ю Лоренцевыми контурами с различными фазами, частотами и интенсивностями, показан на рисунке 29.

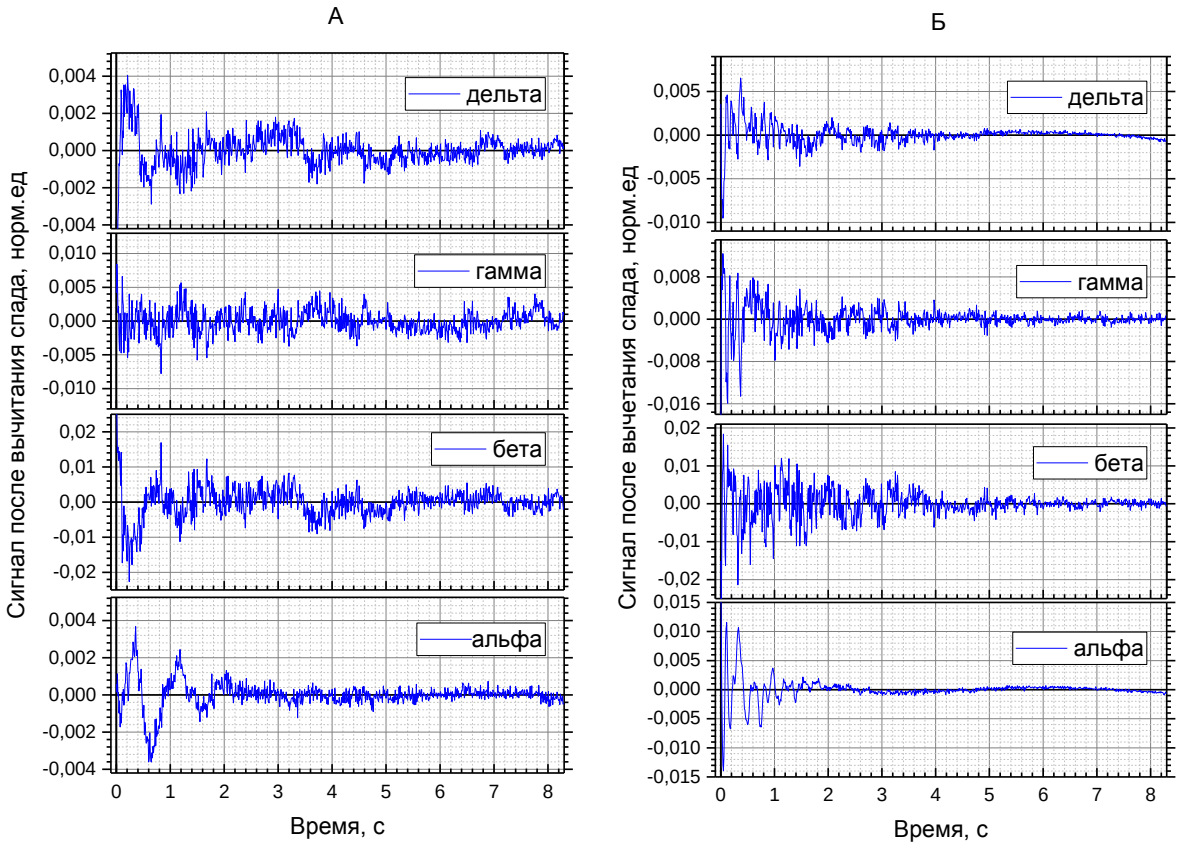


Рисунок 28. Сигналы биений намагниченности протонов различных положений в н-бутиламине. А: $B_{эвол}$= 0.53 Тл, Б: $B_{эвол}$ = 0.20 Тл. 1 норм. ед. = интеграл от сигнала одного протона бутиламина в сильном поле после 90°-импульса. Все сигналы нормированы на один протон

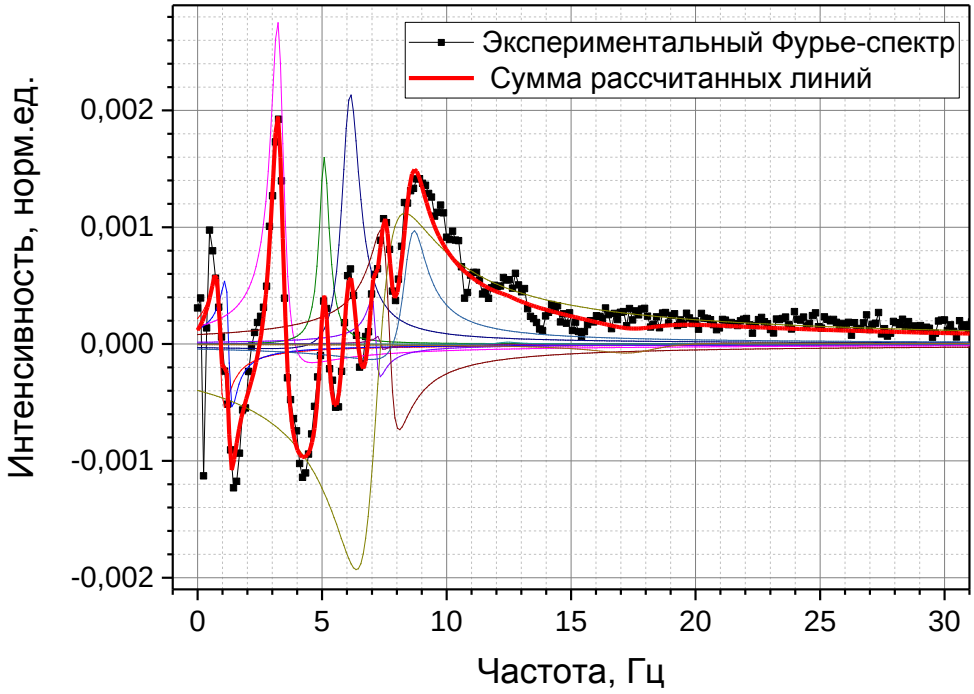


Рисунок 29. Экспериментальный и рассчитанный реальные Фурье-спектры биений протона н-бутиламина в альфа-положении, поле эволюции $B_{эвол}$=0.20 Тл. Черные символы – экспериментальные точки, цветные линии – отдельные рассчитанные Лоренцевы контуры, жирная красная линия – сумма рассчитанных линий.

Полученные биения формируются в результате спин-спиновых взаимодействий между спинами, наиболее сильно они проявляются в тех же магнитных полях, в которых наблюдался максимально эффективно перенос ХПЯ.

Помимо переноса поляризации на протоны в других положениях в молекуле, в слабых полях (например, спектр ХПЯ при B_{pol} = 2.5 мТл на рисунке 24) наблюдается искажение мультиплетов в спектре н-бутиламина. Если промоделировать этот эксперимент ХПЯ аналогичным экспериментом по переносу поляризации, можно увидеть следующее (рисунок 30): даже при нулевой задержке в слабом поле мультиплет протонов в альфа-положении имеет вид триплета с интенсивностями примерно 1:1:1, а не 1:2:1. При варьировании времени эволюции в слабом поле получается зависимость интенсивностей пиков мультиплета, показанная на рисунке 31А. Применив к данным зависимостям уравнение (3.1.1) можно получить когерентные биения поляризации. Для пиков мультиплета 1 и 3 эти биения выглядят (рис 31Б) как антифазные осцилляции с основной частотой 1.89 Гц и временем затухания порядка 5.9 с – это долгоживущая когерентность[140] (время затухания намного больше времени продольной релаксации термической поляризации в этом поле T_1= ~3 с)

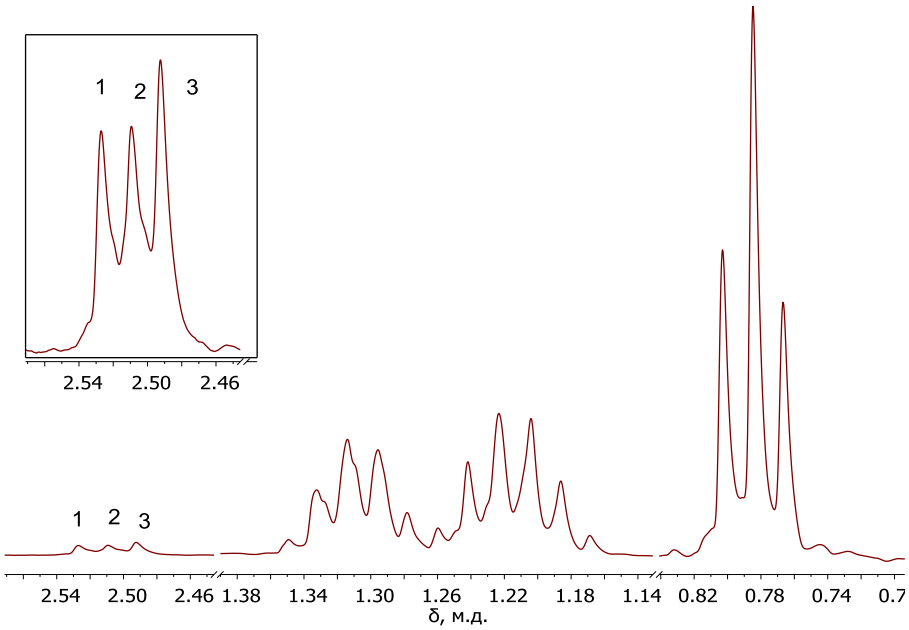


Рисунок 30. Спектр н-бутиламина после селективного переворота намагниченности протонов в альфа-положении с последующим двукратным переключением поля (9,4 Тл – 5 мкТл – 9,4 Тл), задержка в слабом поле была равна нулю.

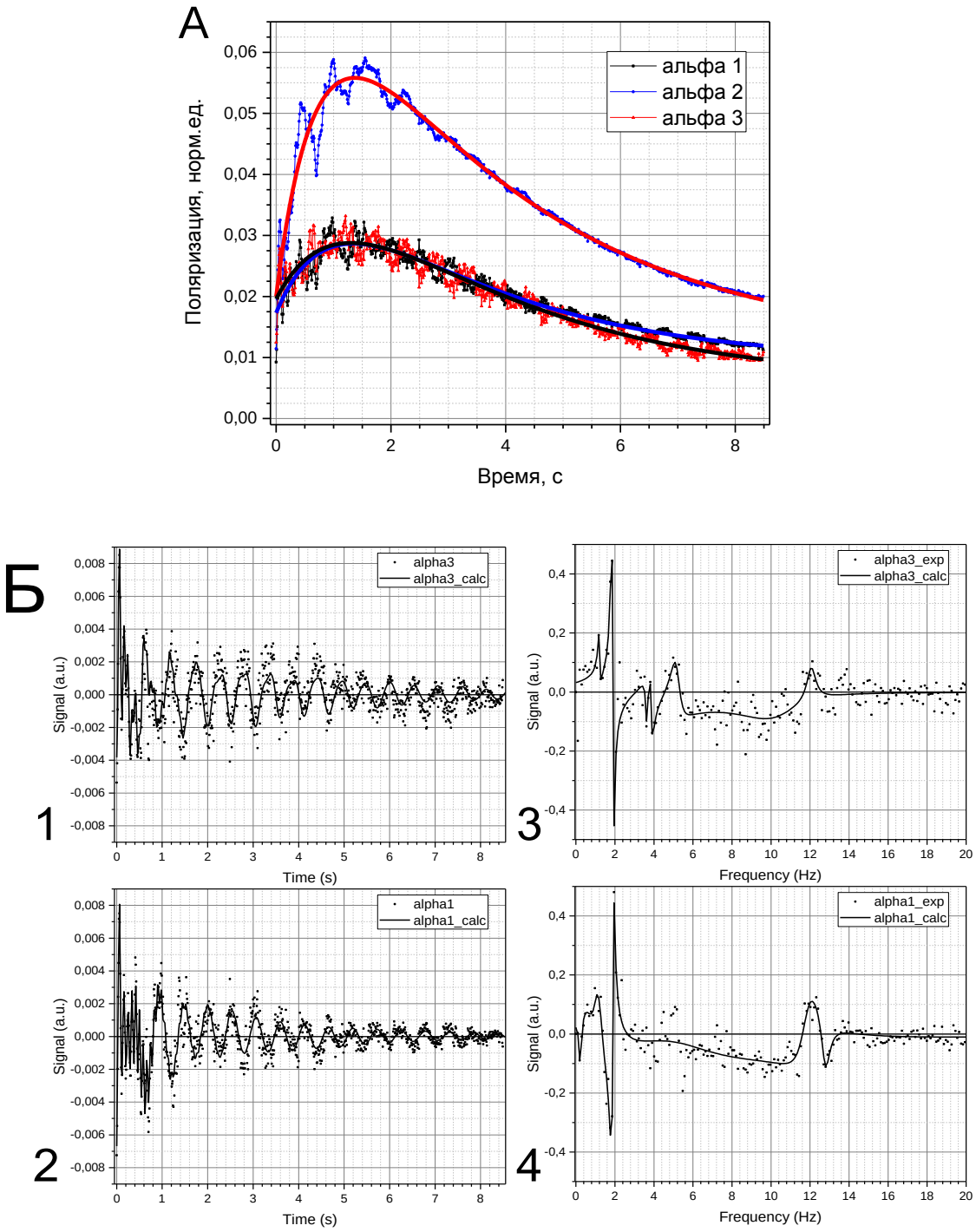


Рисунок 31. А: Точками показана зависимость интенсивностей пиков мультиплета протонов в альфа положении от времени эволюции в слабом поле B_{pol}=5мкТл, сплошными линиями – результат наилучшей подгонки параметров по уравнению (3.1.1.) Б: вставках 1 и 2 показаны результаты вычитания экспоненциального затухания для пиков 1 и 3 в мультиплете, 3 и 4 – реальная часть Фурье спектра, полученного быстрым преобразованием Фурье. Точками на всех четырех вставках показаны экспериментальные данные, сплошной кривой – результаты расчета. Нумерация пиков мультиплета как на рисунке 30.

Эти наблюдения доказывают, что процессы переноса ХПЯ и переноса поляризации при варьировании магнитного поля протекают по общему механизму, а именно как когерентный перенос в скалярно связанных спиновых системах в диамагнитных молекулах.

3.1.4. Заключение.

Таким образом, полученные результаты [141] свидетельствуют о важности явления переноса поляризации в экспериментах ХПЯ в низком поле, которое является фактором, изменяющим полевую зависимость ХПЯ [24]. Проведенные эксперименты показывают, что игнорирование таких эффектов может привести к совершенно неправильной интерпретации экспериментов: неоправданно большие СТВ могут быть отнесены к ядрам, имеющим интенсивные сигналы низкополевой ХПЯ; резкие особенности в полевой зависимости ХПЯ могут быть ошибочно связаны с особенностями спиновой динамики переходных РП. Стоит ожидать, что такие эффекты проявляются не только для конкретной исследуемой здесь системы, но носят более общий характер. Это происходит потому, что перенос поляризации является быстрым когерентным процессом, который также может происходить между относительно удаленными спинами в молекуле. Это означает, что ХПЯ может быстро “передаваться” по связанной сети спинов; в этом случае, результирующая поляризация не имеет простого отношения к магнитным параметрам РП. Таким образом, для того, чтобы извлечь константы СТВ, необходимо принимать во внимание эффекты переноса поляризации в дополнение к спиновой эволюции в РП, что может быть довольно сложным. Это, действительно, трудноразрешимая задача, что делает идею определения констант СТВ из низкополевой ХПЯ, по крайней мере, весьма проблематичной, если вообще возможной. Таким образом, вывод данного фрагмента работы является негативным: низкополевая ХПЯ не является правильным способом определения КСТВ без учета переноса поляризации. Тем не менее, мы предлагаем альтернативный метод ХПЯ для получения констант СТВ. Недавно было показано [16], что в тех случаях, когда число спинов в РП большое ХПЯ, возникающая после геминальной рекомбинации РП, прямо пропорциональна константам СТВ. Это позволяет определить относительные константы СТВ в РП. Более того, если один из партнеров РП представляет собой радикал с точно известными константами СТВ, этот метод позволяет получить абсолютные значения констант СТВ другого радикала. С помощью этого метода можно получить полную информацию о СТВ в РП; с известными константами СТВ можно определить значение Δg из высокополевой части полевой зависимости ХПЯ. Таким образом, несмотря на проблемы с интерпретацией низкополевых данных, ХПЯ по-прежнему является чувствительным методом для изучения магнитных свойств короткоживущих радикалов в растворе. В следующих разделах работы именно такой подход будет использован для определения КСТВ и Δg партнеров в РП.

Кроме того, когерентное перераспределение, которое создает проблемы при интерпретации ХПЯ в слабых полях, может быть полезным в других приложениях, а

именно, для переноса спиновой гиперполяризации на ядра-мишени для усиления конкретных линий ЯМР, которые в противном случае имеют слабую интенсивность.

3.2. Фотоокисление гистидина 3,3',4,4' бензофенонтетракарбоновой кислотой в водном растворе.

Данный раздел посвящен изучению фотоокислительной реакции между 3,3’,4,4’-тетракарбоксибензофеноном (ТСВР) и L-гистидином (His). Эта реакция была исследована в нейтральном водном растворе с использованием метода химически индуцированной динамической ядерной поляризации (ХПЯ). Относительные величины изотропных сверхтонких взаимодействий с ядрами ^{13}C в радикалах ТСВР и гистидина были получены из времяразрешенных спектров ^{13}C-ХПЯ, записанных во время фотореакции ТСВР с гистидином при естественном содержании магнитного изотопа ^{13}C. Было найдено, что константы СТВ для кетильного радикала ТСВР, рассчитанные соискателем с использованием теории функционала плотности, и полученные из времяразрешенных спектров ^{13} C-ХПЯ хорошо согласуются друг с другом. Был установлен механизм реакции тушения триплетного возбужденного ТСВР гистидином в нейтральном водном растворе. Из анализа полевой зависимости ^{1}H-ХПЯ, возникающей при этой же фотореакции, был получен g-фактор для радикала гистидина.

3.2.1. Спектры ^{13}C ХПЯ.

Зависимости ^{13}C химических сдвигов от pH для ТСВР и His были изучены, чтобы избежать перекрывания сигналов в спектрах ХПЯ ^{13}C. Полученные pH-зависимости для ароматической области сигналов протонов ТСВР и His представлены на рисунке 32. Из полученных данных был сделан вывод, что оптимальным является диапазон pH = 6.4-6.6, в котором нет перекрывания линий в спектре. Поэтому спектры ХПЯ были записаны для растворов, содержащих ТСВР и His при pH = 6.5.

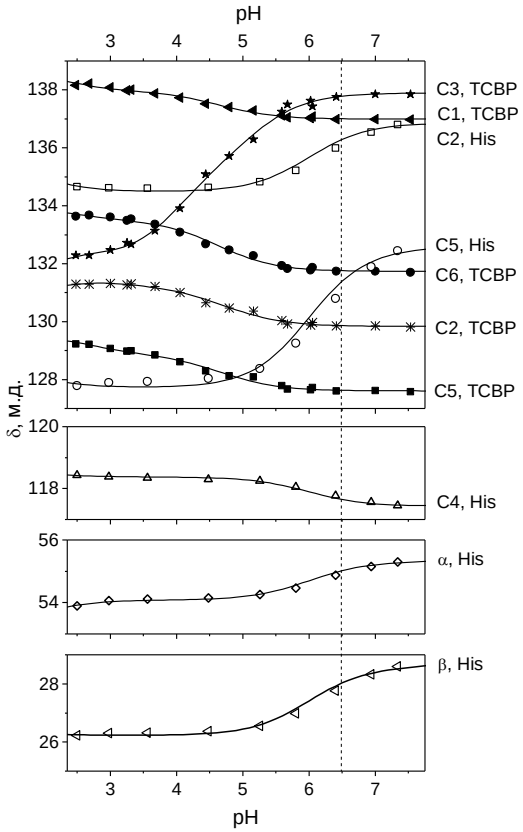


Рисунок 32. pH зависимости химического сдвига для C1, C2, C3, C5, C6 ядра углерода TCBP и для α, β, C2, C4, C5 ядер углерода гистидина. Вертикальная пунктирная линия соотвествует значению pH 6.5. При этом значении pH все ^{13}C сигналы расположены достаточно далеко друг от друга.

Рисунок 33 показывает ^{13}C ХПЯ спектры, полученные в ходе фотореакции между TCBP и His, и ^{13}C ЯМР спектры исходных реагентов. Так как начальная больцмановская поляризация была подавлена (протокол эксперимента см. на рисунке 16), наблюдались сигналы в спектре ХПЯ только для тех ядер углерода, которые имеют ненулевые КСТВ в промежуточных радикалах. Относительные интенсивности и фазы (усиленное поглощение или эмиссия) различных сигналов в спектре ХПЯ отражают величины и знаки сверхтонких взаимодействий соответствующих атомов углерода в радикалах гистидина и TCBP. Отнесение сигналов было сделано путем сравнения с результатами, полученными с помощью pH-зависимости химических сдвигов в спектре ЯМР ^{13}C. В таблице 6 приведены относительные интенсивности ХПЯ, полученные путем интегрирования сигналов TCBP и His в спектрах ^{13}C ХПЯ, на рисунке 34 величины интегралов в спектре ХПЯ наложены на соответствующие положения в структуре реагентов.

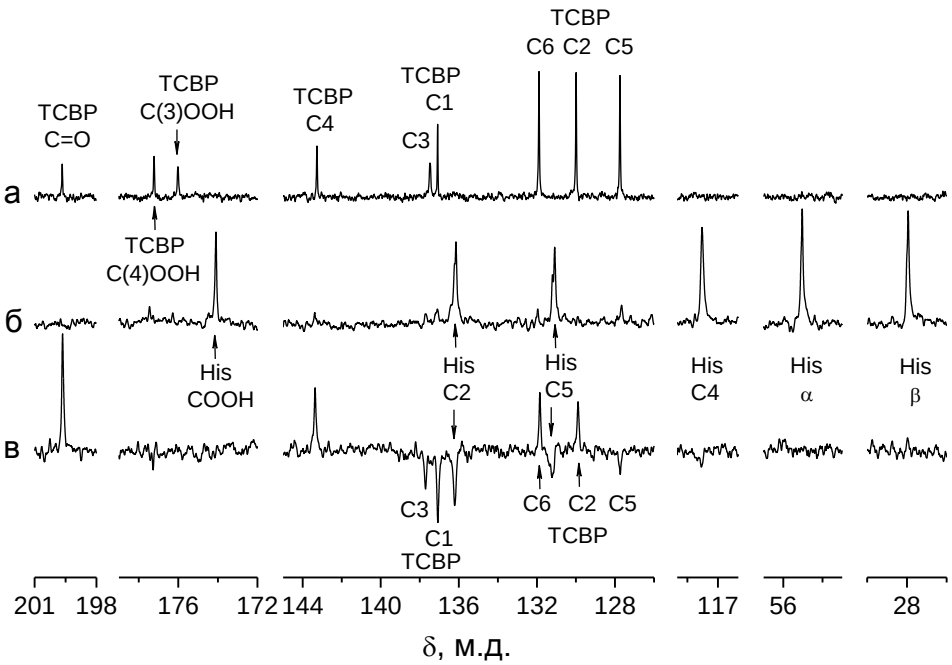


Рисунок 33**.** (а) 125.7 МГц ^{13}C ЯМР – спектр, полученный для раствора 10 мМ TCBP при pH 6.5, записанный с ^{1}H-развязкой во время получения сигнала; усреднено 128 накоплений. (б) 62.9 МГц ^{13} C ЯМР – спектр, полученный для раствора 2 мМ TCBP с 20 мМ His в D_2O при pH 6.5, зафиксированный с ^{1}H развязкой во время накопления сигнала; 6800 накоплений. (с) 62.9 МГц ^{13}C ХПЯ – спектр записан с ^{1}H развязкой во время накоплений сигнала; радиочастотный импульс 14 мкс, 90° угол поворота; 8800 накоплений. Интенсивности спектров (а), (б) и (в) были масштабированы независимо друг от друга.

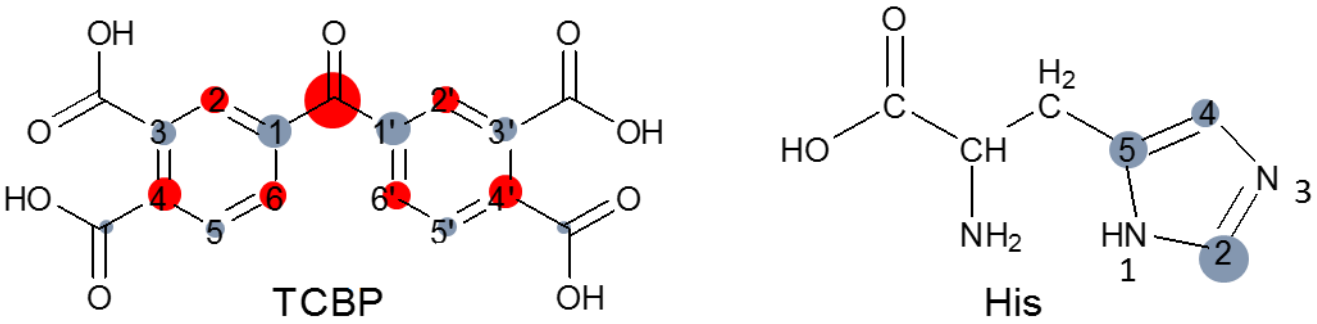


Рисунок 34. Схематичное изображение распределения интегральной поляризации, наблюдаемой в спектре ХПЯ ^{13}C, по молекулам реагентов. Площадь кругов пропорциональна значению соответствующего интеграла. Красные круги – интегралы с положительным значением, серые – с отрицательным.

Таблица 6. ^{13}C КСТВ для анионного и кетильного радикалов ТСВР, а также радикала гистидина.

		Интеграл в спектре ХПЯ	Относительная КСТВ [(a)] (ХПЯ)	КСТВ (DFT 6-31 G, mT)	КСТВ (DFT EPR II, mT)
ТСВР$^{\bullet-}$	CO	10.0	1.59	1.55	0.65
	C1	-3.65	-0.58	-0.58	-0.64
	C2	2.35	0.37	0.73	0.38
	C3	-1.9	-0.3	-0.49	-0.42
	C4	3.45	0.55	0.94	0.54
	C5	-1.2	-0.19	-0.47	-0.39
	C6	2.35	0.37	0.66	0.34
	C(3)OOH	0	0	0.05	0.06
	C(4)OOH	-0.7	-0.11	-0.20	-0.21
ТСВРН$^{\bullet}$	CO	10.0	3.86	3.81	2.01
	C1	-3.65	-1.41	-1.41	-1.14
	C2	2.35	0.91	1.12	0.63
	C3	-1.9	-0.73	-0.72	-0.47
	C4	3.45	1.33	1.15	0.61
	C5	-1.2	-0.46	-0.69	-0.49
	C6	2.35	0.91	1.13	0.61
	C(3)OOH	0	0	0.1	0.08
	C(4)OOH	-0.7	-0.27	-0.25	-0.22
His$^{\bullet}$	C2	-7.2	1.86[(b)]	3.44[(c)]	1.84[(c)]
	C4	-2.4	0.62[(b)]	1.82[(c)]	0.81[(c)]
	C5	-4.5	1.16[(b)]	2.34[(c)]	0.98[(c)]
	β	0	0[(b)]	-0.49[(c)]	-0.55[(c)]

(a) Скалировано до 10.0 для углерода в карбонильной группе CO.

(b) Относительные КСТВ для нейтрального радикала гистидина были рассчитаны с использованием относительных КСТВ, полученных для ТСВРН$^{\bullet}$ радикала.

(c) Рассчитано для нейтрального радикала 5-этилимидазола.

3.2.2. Корреляция между интенсивностями в спектре ^{13}C ХПЯ и рассчитанными КСТВ.

Для ТСВР в водных растворах можно предположить образование двух различных радикалов: анион-радикала ТСВР$^{\bullet-}$ (радикал 1 на рисунке 35), образующегося в результате

реакции фотоиндуцированного переноса электрона, и кетильного радикала ТСВРН$^{\bullet}$ (со структурой типа 2 на том же рисунке), образующегося в результате переноса атома водорода, либо в результате связного с протоном переноса электрона (Proton Coupled Electron Transfer, PCET). Для того, чтобы установить структуру промежуточного продукта, генерируемого из ТСВР в реакции фотоокисления гистидина в нейтральном растворе, изотропные константы СТВ для обоих возможных радикалов ТСВР были вычислены соискателем с помощью DFT (таблица 6).

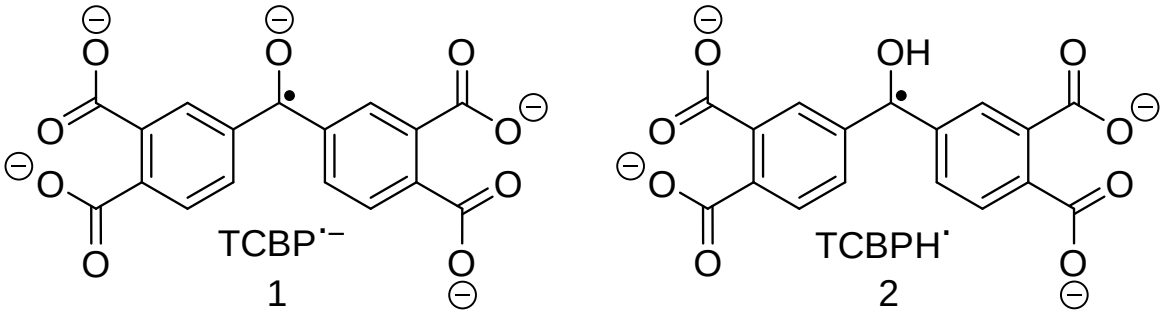


Рисунок 35. Структурные формулы двух различных радикалов ТСВР, которые могут существовать в водных растворах в нейтральной среде, ТСВР$^{\bullet-}$ – анион-радикал, ТСВРН$^{\bullet}$ – кетильный радикал.

На рисунке 36 проведено сравнение интенсивности ^{13}С ХПЯ ядер углерода ТСВР, полученные из спектра ^{13}С ХПЯ, с изотропными константами СТВ, рассчитанными методами DFT для анион- и кетильного радикалов ТСВР. Хорошая корреляция между двумя наборами значений наблюдается в обоих случаях (коэффициент корреляции R^2>0.9), однако коэффициент корреляции R^2 для анион-радикала ТСВР$^{\bullet-}$ составил 0.91, в то время как для кетильного радикала ТСВРН$^{\bullet}$ R^2 = 0.98. Следовательно, именно перенос электрона с последующим быстрым протонированием анион-радикала ТСВР (PCET) следует считать механизмом тушения ^{3}ТСВР гистидином в нейтральном растворе. Перенос атома водорода исключается из-за достаточно высокой константы скорости тушения [142] k_q=1.6×10^9 М$^{-1}$с$^{-1}$, нетипичной для этого типа реакций. Поэтому для ХПЯ в изучаемой системе формируется после реакции тушения ^{3}ТСВР, которая представляет собой двухступенчатый процесс: сначала переносится электрон от His к ^{3}ТСВР, а затем анион-радикал ТСВР$^{\bullet-}$ претерпевает быстрое протонирование с образованием кетильного радикала ТСВРН$^{\bullet}$.

Используя относительные константы СТВ, полученные из спектра ХПЯ ^{13}С для кетильного радикала ТСВРН$^{\bullet}$, были рассчитаны относительные константы СТВ для нейтрального радикала гистидина, а затем сравнили эти значения с КСТВ, вычисленными с использованием методов DFT (см. рисунок 37). Удовлетворительная корреляция была обнаружена для обоих используемых методов расчета.

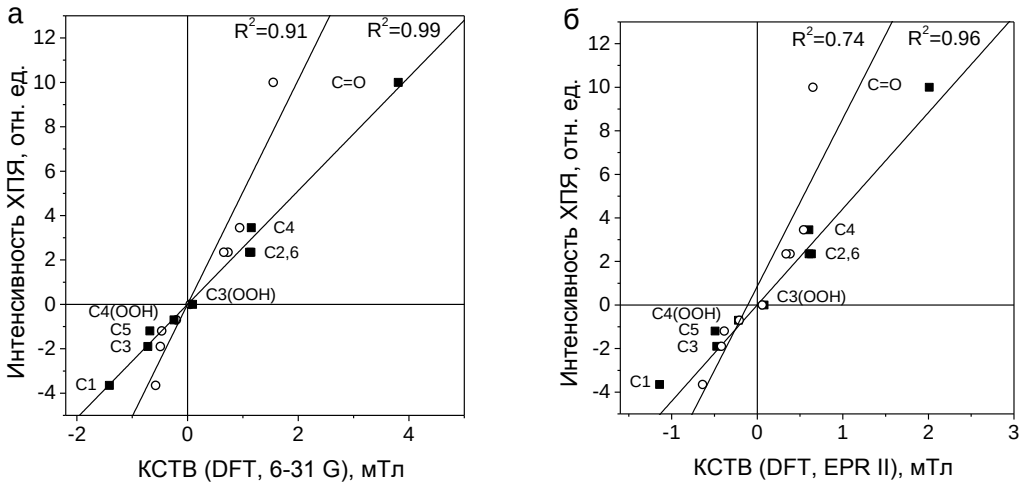


Рисунок 36**.** Сравнение интенсивностей ХПЯ ядер углерода ТСВР с КСТВ, вычисленных методами DFT (а) – метод UB3LYP/6-31G и (б) – метод UB3LYP/EPR II для анион-радикала ТСВР$^{\bullet-}$ (открытые кружки) и нейтрального кетильного радикала ТСВРН$^{\bullet}$ (сплошные квадраты). Наклонные линии – результаты линейной регрессии полученных данных с дополнительным условием прохода через начало координат.

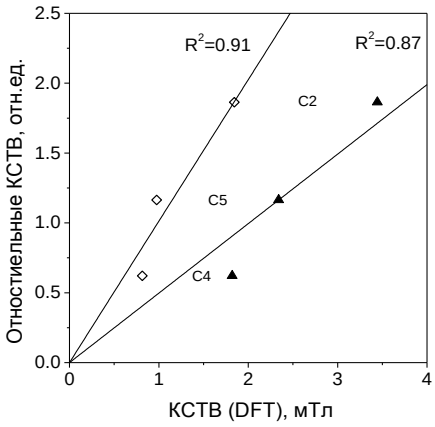


Рисунок 37**.** Сравнение относительных сверхтонких взаимодействий нейтрального радикала гистидина His$^{\bullet}$, полученных из данных ХПЯ со значениями, вычисленными методами UB3LYP/6-31G (сплошные треугольники) и UB3LYP/EPR II (открытые ромбы). Наклонные линии – результаты линейной регрессии для полученных данных с дополнительным условием прохода через начало координат.

3.2.3. Полевая зависимость сигналов ^{1}H ХПЯ.

Хотя спектроскопия ЭПР является прямым путем определения магниторезонансных параметров (g-факторов и КСТВ) радикалов, невозможно с помощью ЭПР обнаружить радикалы гистидина в физиологических условиях из-за его высокой реакционной способности и короткого времени жизни. В настоящей работе был использован альтернативный способ определения g-фактора радикала, а именно, мы использовали зависимость ХПЯ от внешнего магнитного поля, как описано в разделах 1.1.4 и 3.1. Полевые зависимости ^{1}H ХПЯ, полученные фотореакции ТСВР с His, показаны на рисунке 38, а соответствующие спектры ХПЯ представлены на рисунке 39.

На данной зависимости отчетливо виден максимум для интегральной поляризации всех протонов в районе 3.0 Тл. Также было проведено сравнение численных расчетов ХПЯ по модели Адриана при различных наборах параметров, и сравнение расчетных кривых (в соответствии с уравнением 4.2) с экспериментальными данными. Наилучшее согласие было получено для приведенных в таблицах 1 и 2 известных величин констант СТВ для кетильного радикала ТСВР и нейтрального радикала гистидина, расчетная кривая с этими параметрами показана на рисунке 38. Из аппроксимации следует, что разность g-факторов участвующих в реакции радикалов составляет $\Delta g=(1.51\pm0.07)\times10^{-3}$, а из правил Каптейна и знаков сигналов интегральной поляризации протонов ТСВР следует, что ($g(ТСВРН^{\bullet})$ – $g(His^{\bullet})$) > 0. Если предположить, что g-фактор кетильного радикала ТСВР в малой степени отличается от соответствующей величины для анион-радикала, то g-фактор гистидина оказывается равен $g(His^{\bullet})=2.0022\pm0.0001$, и данная величина хорошо согласуется с известным g-фактором радикала имидазола (см. таблицу 2).

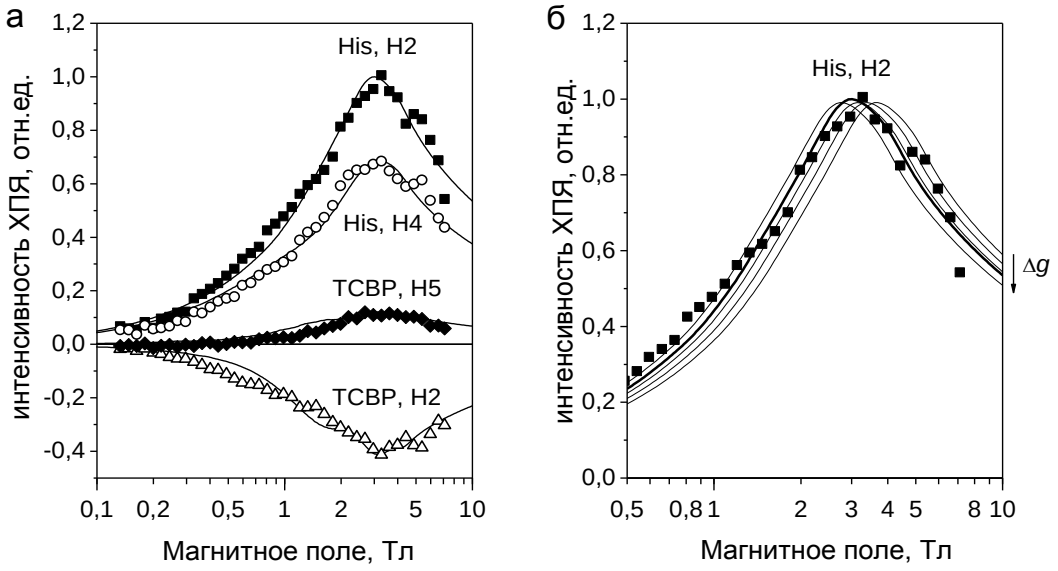


Рисунок 38. (а) зависимости ^{1}H ХПЯ от напряженности магнитного поля H2 (черные квадраты) и H4 (белые круги) гистидина, и H2 (белые треугольники) и H5 (черные) ТСВР в фотореакции ТСВР с His при pH 6.5. ХПЯ была рассчитана для радикальных пар, состоящих из кетильного радикала $ТСВРН^{\bullet}$ и радикала $His^{\bullet}$. (б) полевая зависимость ^{1}H ХПЯ протона H2 (черные квадраты) His и кривые, рассчитанные для радикальных пар, состоящих из кетильного радикала $ТСВРН^{\bullet}$ с g = 2.00350 [143] и радикала $His^{\bullet}$ с пятью значениями g-фактора: 2.00194, 2.00204, 2.00214, 2.00224, 2.00234. Лучшее соответствие было получено при $g(His^{\bullet}) = 2.00224\pm0.0001$.

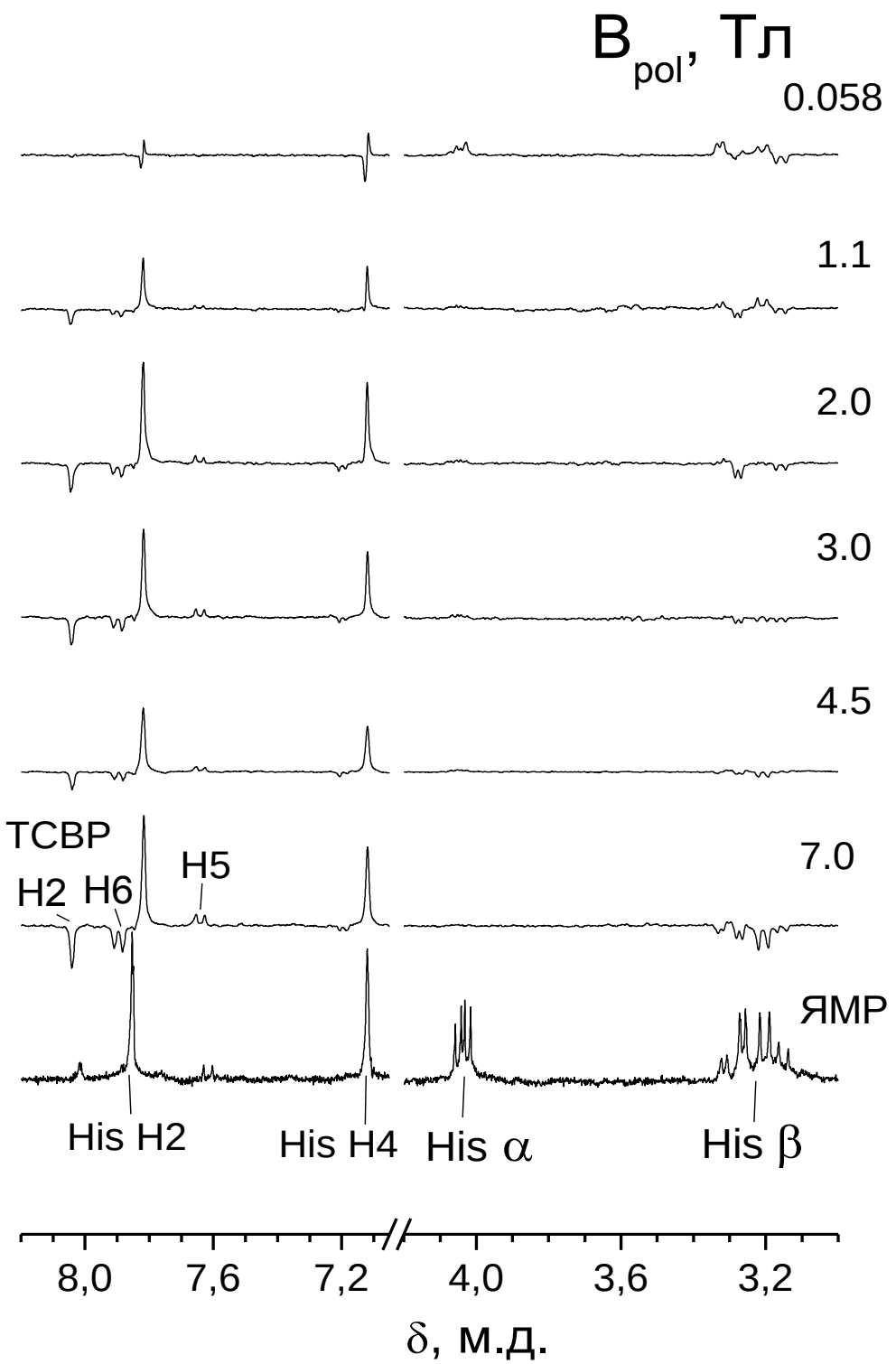


Рисунок 39. Спектры ХПЯ в фотореакции His и ТСВР при различных значениях магнитного поля, в котором создавалась поляризация. C(ТСВР)=2 мМ, C(His)=20 мМ, pH=7.4.

3.2.4. Заключение.

Из анализа интенсивностей сигналов в геминальном спектре ^{13}C ХПЯ были получены относительные КСТВ с ядрами ^{13}C, по которым после сравнения с результатами квантово-химических расчетов была установлена структура промежуточного радикала ТСВР. Комплементарное исследование полевой зависимости ХПЯ ^{1}H с последующей подгонкой

параметров описания привело к определению величины g-фактора радикала гистидина, неизвестного ранее.

Однако, использование регистрирующего импульса длительностью 14 мкс, не позволило детектировать только геминальную поляризацию ядер ^{13}C, поэтому полученные величины интегралов включают поляризацию не только от геминальных продуктов, но и поляризацию, сформированную в ходе эволюции F-пар (радикалов, вышедших в объем из клетки растворителя). Более точный анализ геминальной поляризации может быть сделан с использованием поляризации ядер ^{1}H, зарегистрированной с достаточно коротким РЧ импульсом, который приведен в разделе 3.3.

3.3. Механизм реакции между ароматическими аминокислотами и триплетно-возбужденными карбоксибензофенонами, выявленный методом ХПЯ

Константы сверхтонкого взаимодействия (КСТВ) короткоживущих радикалов 4-карбокси, 4,4-дикарбокси и 3,3′, 4,4′-тетракарбоксибензофенонов (4-CBP, DCBP и TCBP, соответственно), образованные в их фотореакциях с тирозином, были получены при анализе спектров геминальной ХПЯ. Эти КСТВ сравнивали с КСТВ, рассчитанными с использованием теории функционала плотности. Из этого сравнения было установлено, что соотношение интенсивностей линий ХПЯ в спектре TCBP происходит от вкладов трех типов радикальных структур TCBP: непротонированного анионного радикала и двух анион-радикальных структур с протонированной карбоксильной группой в положении 3 или 4 (или 3′ или 4′). Это позволило сделать вывод о том, что механизмом реакции тушения является передача электронов с последующим переносом электрона (PCET): за переносом электрона происходит перенос протона в одно из четырех возможных положений с примерно равными вероятностями. То же соотношение интенсивностей ХПЯ и, следовательно, тот же механизм реакции был установлен для гистидина. Для 4-CBP и DCBP триплетное тушение протекает также через PCET, снова с образованием анионного радикала с протонированной карбоксильной группой.

3.3.1. Введение

Перенос электрона, связанный с переносом протона (PCET от английского Proton-Coupled Electron Transfer), играет ключевую роль в механизмах передачи энергии в биологических системах, а также является фундаментальным для систем, связанных с разработкой альтернативных источников энергии, таких как топливные элементы, химические датчики и другие электрохимические устройства. В биологических примерах электроны туннелируют между окислительно-восстановительными кофакторами фермента, тогда как участвующие в процессе протоны переносятся либо через цепочку

водородных связей, либо по специальным протонопроводящим каналам [47, 144, 145]. Ароматические аминокислоты (АА), такие как триптофан и тирозин, являются наиболее хорошо изученными предшественниками радикальных частиц в ферментативных реакциях [47, 146]. Другие легко окисляемые аминокислоты, такие как цистеин, метионин и глицин, также участвуют в PCET [147, 148]. Гистидин часто встречается вблизи активного центра ферментов в качестве лиганда из-за его свойств протонирования [44], однако на данный момент получено мало данных о его реакционной способности и участии гистидиновых радикалов в переносе электрона на длинные дистанции через ферменты [149]. Основная причина этого заключается в том, что промежуточный гистидильный радикал не имеет подходящей хромофорной группы для оптического обнаружения. Его близкое расположение по отношению к парамагнитным центрам и высокая реакционная способность исключают обнаружение гистидильного радикала методом ЭПР при обычных условиях [58]. Для модельных пептидов, содержащих гистидин, было экспериментально показано, что короткоживущие радикалы, образовавшиеся в фотоиндуцированной реакции, могут быть восстановлены тирозином. Таким образом, он является подходящей аминокислотой для внутримолекулярного переноса электрона в ферментативных реакциях [150]. Для такого чувствительного детектирования гистидильных радикалов [142, 150-152], как и в процессах фотоиндуцированного переноса электрона (ET) и PCET в модельных пептидах [65, 153-157], мы используем времяразрешенную ХПЯ [158]. В предыдущем исследовании [16] были определены КСТВ для протонов в короткоживущих радикалах триптофана и дипептида метионина глицина с использованием известных КСТВ анионного радикала фотосенсибилизатора 3,3′,4,4′-тетракарбоксибензофенона (TCBP). Структура соединений, изученных в этой работе, показана на рисунке 40. Эксперименты проводили в нейтральном водном растворе, поэтому все карбоксильные группы бензофенонов полностью депротонированы. Соответствующие значения pKa для TCBP и 4-CBP могут быть найдены по ссылке [64, 159].

Таким образом, поскольку ХПЯ является мощным инструментом для характеризации радикалов, эту поляризацию можно использовать также для определения механизмов фотореакций путем идентификации структур радикалов, сформированных на геминальной стадии [160]. В частности, реакция тушения триплета может протекать через перенос электрона или водорода, или путём PCET, при этом перенос электрона и перенос протона может идти на одинаковые или разные позиции в молекуле акцептора. Ранее было обнаружено для фотореакции TCBP с L-тирозина (Tyr) или L-гистидина (His), систематическое отклонение интенсивностей ХПЯ протонов TCBP от КСТВ анион-радикала TCBP, **T-I** (рисунок 41**)** [16], известных из ЭПР [35]. В качестве предварительного

объяснения такого отклонения мы предположили участие кетильного радикала TCBP **T-II** с его образованием во время триплетного тушения через перенос водорода и определили КСТВ этого радикала с использованием известных КСТВ тирозильного радикала [161]. В целях обоснования нашего предположения об участии **T-II** в геминальной реакции с тирозином и гистидином мы недавно предприняли попытку обнаружить кетильный радикал TCBP в фотоиндуцированной реакции TCBP с тирозином с помощью ЭПР с временным разрешением с использованием химически индуцированной поляризации электронов (CIDEP), однако мы не получили какого-либо значимого сигнала, который можно было бы отнести к кетильному радикалу, хотя сигнал сторонних радикалов Tyr, усиленный CIDEP, был обнаружен с хорошим отношением сигнал/шум. Эти два экспериментальных результата привели нас к еще одному предположению, а именно, что любая из четырех карбоксильных групп TCPB может рассматриваться как акцептор протона для PCET в реакции с тирозином и гистидином. Таким образом, в интерпретацию данных ХПЯ необходимо включить участие радикалов **T-III** и **T-IV**.

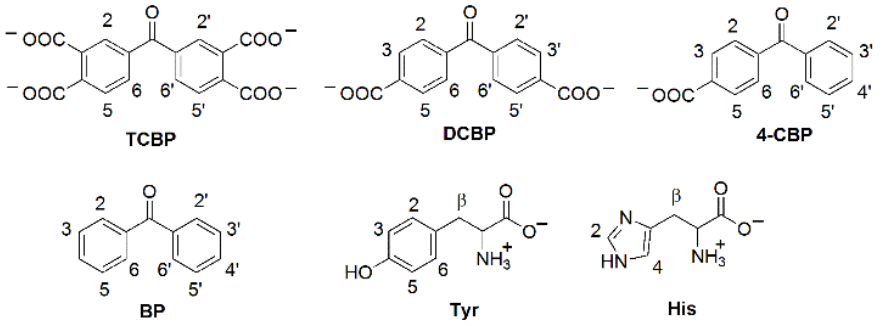


Рисунок 40. Структуры изученных соединений. Противоионы опущены.

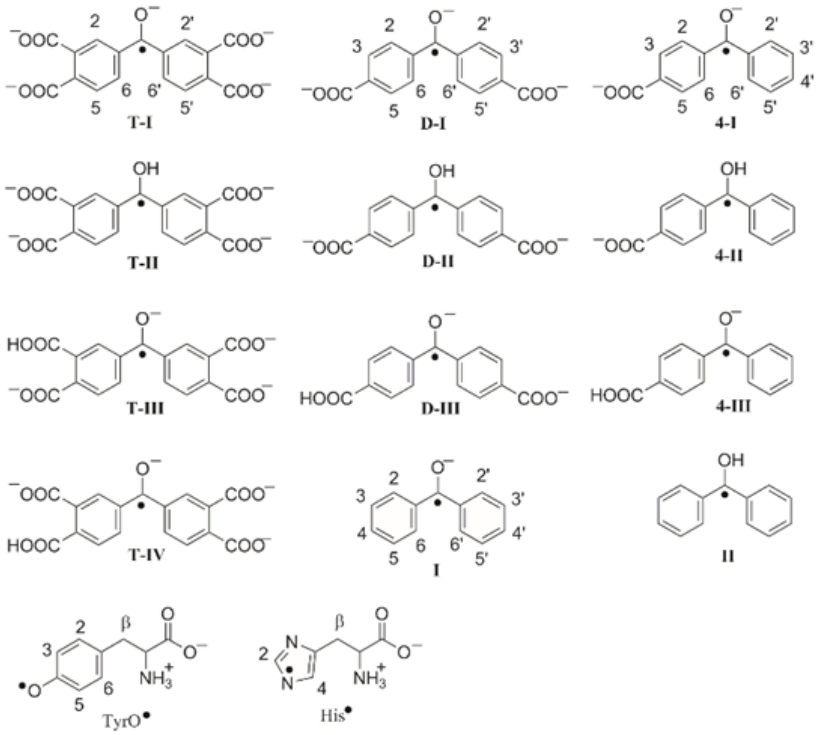


Рисунок 41 Структуры радикалов 3,3', 4,4'-тетракарбоксибензофенона (T-I, T-II, T-III, T-IV), 4,4'-дикарбоксибензофенона (D-I, D-II, D-III), 4-карбоксибензофенон (4-I, 4-II, 4-III) бензофенона (I, II), а также нейтрального радикала тирозила (TyrO$^{\bullet}$) и гистидильный радикал (His$^{\bullet}$).

С целью уточнения данных о структуре радикалов ТСВР, образующихся при фотореакции с Tyr и His, мы рассчитали методом теории функционала плотности (как описано в разделе 2.1.6) КСТВ для разных радикалов ТСВР, **T-II, T-III** и **T-IV,** и проверили пропорциональность между интенсивностями сигнала ХПЯ и рассчитанными КСТВ. Для обобщения аналогичный анализ был сделан для фотосенсибилизаторов 4-карбокси- и 4,4-дикарбоксибензофенона (4-CBP и DCBP соответственно) и незамещенного бензофенона, BP. В качестве реакционного партнера использовали Tyr, так как для тирозильного радикала известны данные о КСТВ с высокой точностью, которые можно использовать для калибровки интенсивностей ХПЯ, как раннее в работе [17].

3.3.2. Спектры геминальной ХПЯ

На рис. 42 показаны спектры ХПЯ, зарегистрированные после рекомбинации геминальных РП для His и ТСВР (a), для Tyr и ТСВР (b), 4-CBP (c), DCBP (d) и BP (e). Для Tyr ХПЯ сигналы наблюдаются для β-протонов, а также для двух магнитно-эквивалентных групп протонов, H2,6 и H3,5. Три, две и четыре группы протонов появляются в спектрах ХПЯ ТСВР (и BP), DCBP и 4-CBP, соответственно. Знаки сигналов ХПЯ согласуются с правилами Каптейна для интегральной ХПЯ [10]. Знаки сигналов ТСВР в реакции с гистидином противоположны тем, которые наблюдаются в случае реакции с тирозином, так

как g-фактор радикалов возрастает в последовательности g(His) <g(TCBP) <g(Tyr) [35, 151, 161]; таким образом, Δg имеет противоположный знак для радикала TCBP в парах с тирозильным и гистидильным радикалами. Как видно на рисунке 42, отношение сигнал / шум очень хорошее; поэтому амплитуды сигнала ХПЯ были определены с высокой точностью, что позволило нам провести надежный количественный анализ сигналов.

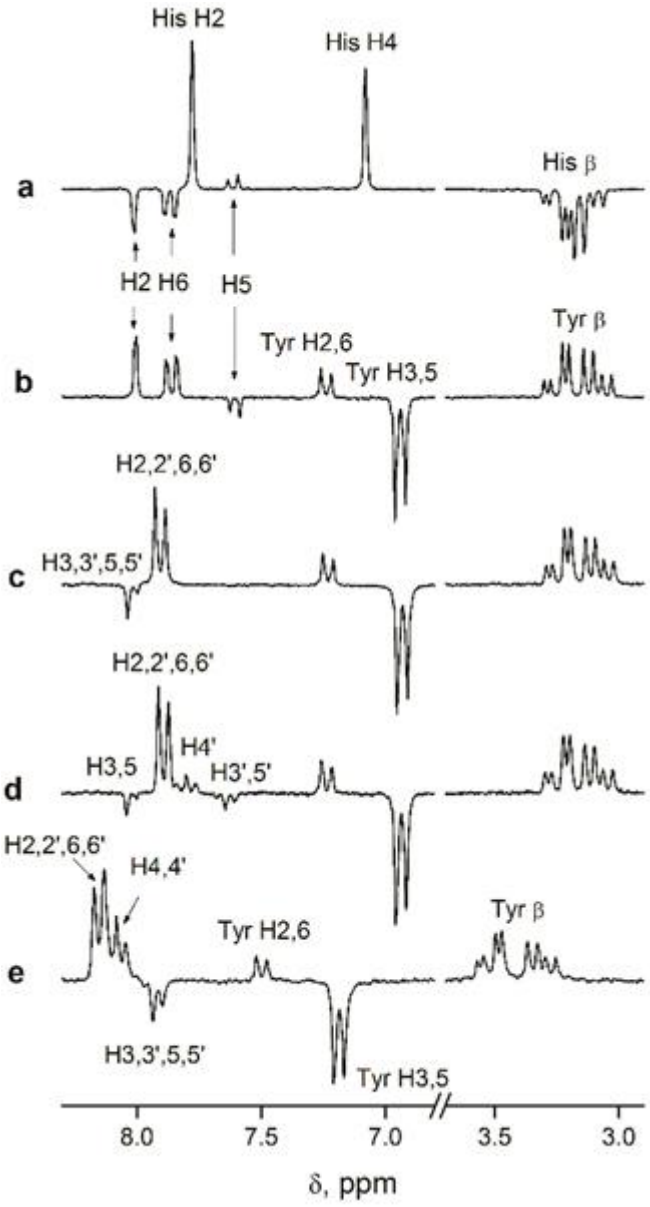


Рисунок 42 Спектры 200 МГц ^{1}H ХПЯ, полученные при фотореакции (a) 0,5 мМ 3,3'-4,4'-тетракарбоксибензофенона (TCBP) и 15 мМ L-гистидина в D_2O при pH 7,2, (b) 0,5 мМ TCBP и 2 мМ Tyr в D_2O при pH 7,4, (c) 1 мМ 4,4'-дикарбоксибензофенон и 2 мМ Tyr в D_2O при pH 7,2, (d) 0,5 мМ 4-карбоксибензофенон и 2 мМ Tyr в D_2O при pH 7,4 и (e) 1 мМ бензофенона и 2 мМ Tyr в D_2O (pH 7,4): CD_3CN = 2: 1.

3.3.3. Пропорциональность между КСТВ и интенсивностью ХПЯ

Соотношение пропорциональности между амплитудой сигналов в спектрах геминальной ХПЯ и константами СТВ радикалов может быть использовано для определения сверхтонкой структуры радикальных промежуточных соединений. Как было

показано ранее, в растворе с низкой вязкостью интенсивность сигнала ХПЯ продуктов геминальной рекомбинации короткоживущих радикальных пар пропорциональна КСТВ соответствующих ядер в промежуточных радикалах [16]. Для ядра *i* первого радикального партнера в паре соответствующая интенсивность сигнала ХПЯ в продукте равна $P_{1i} = C_1A_{1i}$, для ядра *j* у второго партнера $P_{2j} = C_2A_{2j}$. Константы пропорциональности C_1 и C_2 связаны как $C_1 = -C_2$, согласно правилам Каптейна.

При установлении диапазона применимости пропорциональности между ХПЯ и КСТВ[16], было обнаружено, что распределение интенсивности сигналов ХПЯ для ТСВР отличается для случаев различных тушителей. В случае триптофана или метионин-глицина (Met-Gly) интенсивность сигнала ХПЯ для ТСВР полностью коррелировала с КСТВ, сообщенными Säuberlich и соавторами [35] для аниона ТСВР-радикала **Т-I** (рисунок 41); коэффициент определения R^2 составлял 0.9999 (1% отклонения от пропорциональности). Однако в случае тирозина или гистидина в качестве тушителей корреляция между интенсивностями ХПЯ протонов ТСВР и ^{1}H КСТВ аниона радикалов ТСВР была систематически хуже, как показано на рисунке 43а, с R^2 = 0,99, что означает 10 % отклонения от пропорциональности. Это отклонение объяснялось другим механизмом тушения, приводящим к другой структуре радикалов ТСВР, образующихся в реакции тушения. Триптофан или Met-Gly реагируют с триплетным ТСВР посредством переноса электрона; таким образом, образующийся радикал ТСВР на геминальной стадии представляет собой анионный радикал (**Т-I**, рисунок 41). Напротив, перенос водорода предполагался в качестве механизма тушения в случае тирозина и гистидина [16]. В этом исследовании с использованием КСТВ тирозильного радикала в качестве эталона, мы определили КСТВ радикала ТСВР, участвующего в этих реакциях: $A_{H2,2'}$= –0,209 мТл, $A_{H6,6'}$= –0,252 мТл, $A_{H5,5'}$ = 0,068 мТл. Эта линейная корреляция с интенсивностью ХПЯ показана на рисунке 43b (кружки). Эти значения, изначально приписываемые кетильному радикалу ТСВР (**Т-II** , рисунок 41), привели к достаточно неплохой линейной зависимости от интенсивностей сигнала ТСВР в спектрах геминальной ХПЯ, обнаруженных при фотореакции ТСВР с His (рис. 43b, открытые круги), однако коэффициенты R^2 были ниже.

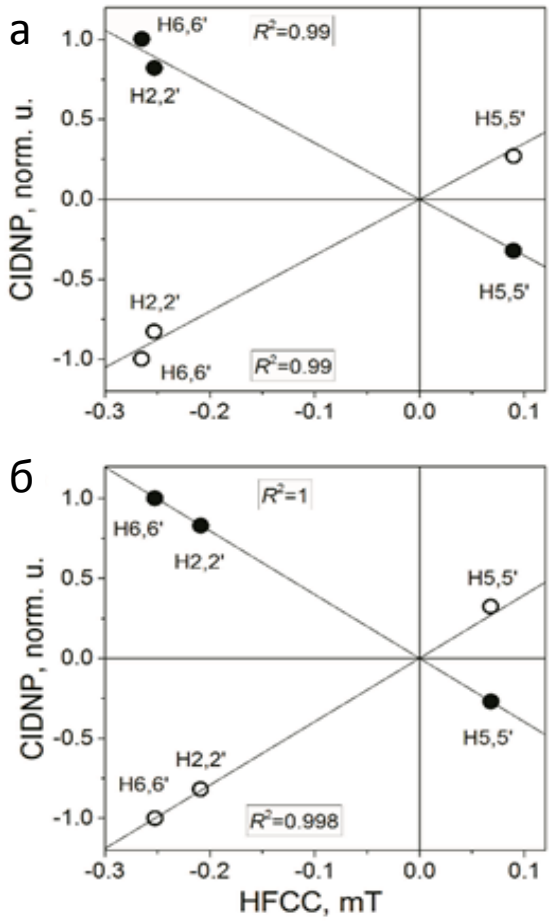


Рисунок 43. (а) Корреляция между интенсивностью сигналов ^{1}H ХПЯ 3,3'-4,4'-тетракарбоксибензофенона (TCBP), обнаруженных при фотореакции TCBP и L-тирозина (сплошные круги) или L-гистидина (открытые круги), и КСТВ протонов анион-радикала **T-I** [35] (б) Соотношение интенсивностей сигналов ^{1}H ХПЯ для TCBP обнаруженных в фотореакции TCBP и Tyr (сплошные кружки) или His (открытые кружки) и КСТВ рассчитанных для радикала TCBP в паре с использованием интенсивности ХПЯ из Tyr и известных ^{1}H КСТВ радикала Tyr в качестве эталона. Сплошные линии – результат лучшего соответствия с функцией $P_{1i} = C_1A_i$

Чтобы дополнительно проверить вклад участвующих радикалов TCBP с использованием КСТВ, полученных из этой корреляции, был выполнен расчет DFT для КСТВ четырех типов радикалов TCBP, показанных на рисунке 41. КСТВ, усредненные для протонов, магнитно эквивалентных в диамагнитном состоянии, приведены в таблице **7**. Видно, что КСТВ радикального аниона **T-I,** приведенные в [35] воспроизводятся с хорошей точностью. Напротив, КСТВ кетильного радикала **T-II** в 1,5 ÷ 2 раза выше, чем те, которые были определены нами с использованием КСТВ радикала Tyr в качестве эталона. Таким образом, на основе сравнения данных геминальной ХПЯ с КСТВ, полученных DFT, можно заключить, что кетильный радикал **T-II** не является, по меньшей мере, преобладающим радикалом TCBP, образующимся в реакции тушения.

Таблица 7. Расчетные и экспериментально полученные ^{1}H КСТВ для радикалов ТСВР, ВР, 4-СВР и DCBP различной структуры. Рассчитанные КСТВ принимались как средние значения для протонов, которые эквивалентны в спектрах ЯМР диамагнитного ТСВР. Экспериментально получены ^{1}H КСТВ для нейтрального тирозильного радикала.

Протон (ы)	КСТВ, мТл						
ТСВР	**TI**		**T-II** ,	**T-III**,	**T-IV**,	**TI** [b] **: T-III: T-IV =** 0,56: 0,18: 0,25	
	а	б	а	а	а	в	а
H2,2′	–0,296	–0,253	–0.419	–0,156	–0,156	–0,209	–0,211
H6,6′	–0,286	–0,265	–0.435	–0,319	–0.150	–0,252	–0,256
H5,5′	1,36	0,0897	0.222	0,093	–0,056	0,068	0,063
BP	**I**		**II**				
	а	б	а				
H2,2′ , 6,6′	-0,324	–0,350	– 0,483				
H3,3′ , 5,5′	0,127	0,104	0,210				
H4,4′	-0,419	–0,285	– 0,508				
4-CBP	**4-I**		**4-II** ,	**4-III**,	**4-I** [d] **: 4-III =** 0,69: 0,31		
	а	г	а	а	а		
H2,2′ , 6,6′	–0,345	–0,289	–0,454	–0,194	– 0,260		
H3,5	0,153	0,085	0,239	0,041	0,072		
H3′ , 5′	0,160	0,097	0,169	–0,071	0,046		
H4′	–0,39 0	– 0,230	–0,410	–0,233	– 0,231		
DCBP	**D-I**		**D-II** ,	**Д-III**,	**DI** [e] **: D-III =** 0,6: 0,4		
	а	д	а	а	а		
H2,2′ , 6,6′	–0,235	-0,250	–0,525	–0,213	-0,235		
H3,3′ , 5,5′	0,063	0,075	0,293	0,038	0,060		
Tyr	TyrO $^{\bullet}$ (e)						
H2,6	0,15						
H3,5	-0.615						
□	0.77						

[a] Рассчитано в этой работе. [б] Данные, взятые из работы [35] . [в] Данные, взятые из работы [16] . [г] Данные, взятые из [71] . [д] Экспериментально определено в этой работе. [e] Данные, взятые из [161] .

Мы также рассчитали КСТВ для анионных радикальных структур T-III и T-IV (диаграмма 2) с карбоксильными группами, протонированными в положении 3 или 4, которые являются таутомерными формами кетильного радикала T-II (таблица **7**). Предполагая параллельное участие нескольких радикальных видов в реакции, их относительные вклады были оптимизированы для получения наилучшего соотношения

пропорциональности между интенсивностями ХПЯ Tyr и всеми протонами TCBP, с одной стороны, и КСТВ, известными для радикала тирозина (таблица **7**), и рассчитанных для комбинации радикалов TCBP, с другой стороны. Если предположить, что только два вида из четырех были вовлечены, ни одна из шести возможных комбинаций КССВ не обеспечивала лучшую корреляцию, чем КСТВ только анионного радикала, как показано на рисунке 43. Среди комбинаций трех радикалов TCBP лучшая корреляция с R^2= 0,999 и лучшее согласие с КСТВ из статьи [16] были достигнуты с вкладами TI:T-III:T-IV = 0,56: 0,18: 0,25 или T-II:T-III:T-IV = 0,45: 0,34: 0,21. Чтобы провести различие между двумя альтернативами и идентифицировать радикальные структуры TCBP, ответственные за формирование ХПЯ, был проведен анализ интенсивностей геминальной ХПЯ для фотореакций различных карбоксибензофенонов с увеличением числа карбоксильных групп, начиная с простого бензофенона, BP, переходя к моно- и дикарбоксилзамещенным бензофенонам, 4-CBP и DCBP, и, наконец, к TCBP. Во всех случаях были использованы экспериментально полученные КСТВ для анионных радикалов. Для других радикальных структур экспериментальные данные о КСТВ отсутствуют, поэтому для них использовались рассчетные КСТВ.

В итоге соотношением, наилучшим образом описывающим экспериментальные данные, оказалось соотношение вкладов геминальных пар GI:GIII:GIV с радикалами TI, TIII и T-IV в пропорции 0,56: 0,18: 0,25, как показано на рисунке 44.

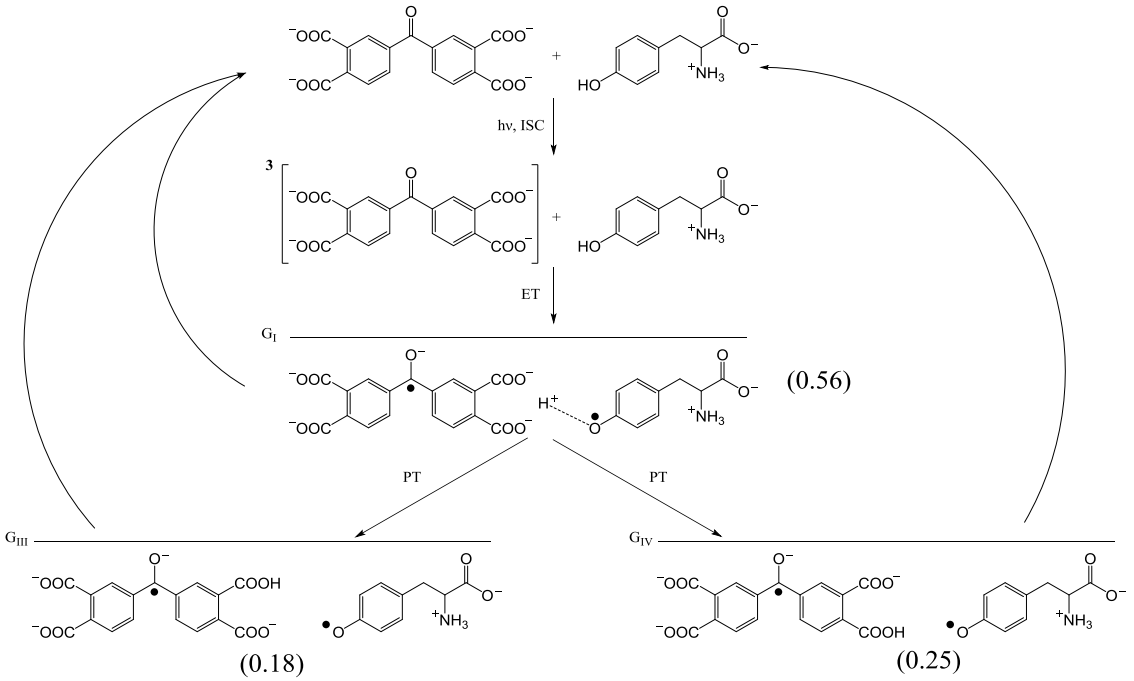


Рисунок 44. Тушение триплетного TCBP в реакции с Tyr через PCET. «G» над чертой обозначают спин-коррелированную геминальную пару. ISC – интеркомбинационная конверсия, ET – перенос электрона, PT – перенос протона

3.3.4. Пропорциональность между КСТВ и интенсивностью ХПЯ ^{13}C в фотореакции ТСВР и гистидина

Ранее мы изучали распределение ^{13}C ХПЯ интенсивностей ТСВР, полученных при его фотореакции с His (раздел 3.2). Результатом была линейная корреляция интенсивности сигнала ^{13}C ХПЯ ТСВР с ^{13}C КСТВ кетильного радикала ТСВР T-II, как рассчитано с использованием DFT, с R^2= 0,99 (раздел 3.2) (рис. 45 a). Мы провели такие вычисления ^{13}C КСТВ также для радикалов T-III и T-IV. Комбинация с ^{13}C КСТВ в пропорции TI:T-III:T-IV= 0,56: 0,18: 0,25 показала корреляцию хуже, чем корреляция ^{13}C КСТВ кетильного радикала T-II с интенсивностью гемнального сигнала ^{1}H ХПЯ из работы[151], R^2= 0,93 (рис. 45b). В этом исследовании, однако, был использован 14 мкс РЧ-детектирующий импульс, поэтому спектр ХПЯ уже не может рассматриваться как геминальный. Таким образом, мы заключаем, что первоначально образовавшиеся радикалы T-III и T-IV подвергаются таутомеризации (протонированию / депротонированию) и что на стадии F-пар преобладающей частицей в растворе является кетильный радикал T-II .

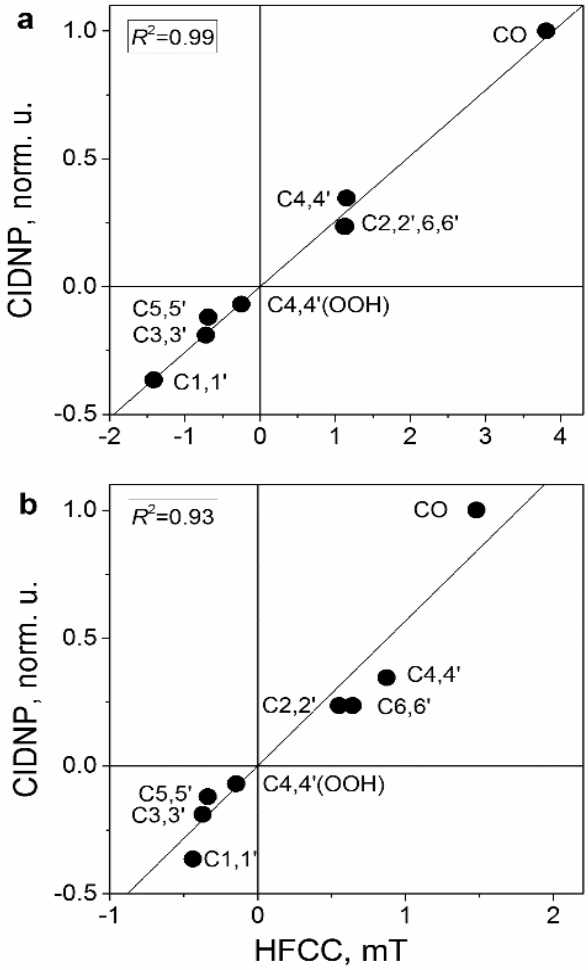


Рисунок 45. Корреляция между интенсивностью ^{13}C ХПЯ ТСВР, обнаруженной при фотореакции ТСВР и L-гистидина, и (a) соответствующих вычисленных ^{13}C КСТВ ТСВР кетильного радикала T-II и (b) суперпозиции радикалов TI: T-III: T-IV в соотношении 0,56: 0,18: 0,25 . Сплошные линии: результат наилучшей подгонки параметров по уравнению $P_{1i} = CA_{1i}$.

3.3.5. Заключение

В данном разделе описан и применен подход для исследования и характеризации короткоживущих радикалов, основанный на ЯМР-детектировании ядерной гиперполяризации, сформированной во время эволюции геминальных спин-коррелированных радикальных пар в фотоиндуцированных реакциях. КСТВ промежуточных радикалов относились к конкретным положениям в радикале и определялись с очень высокой точностью, с использованием в качестве калибровки интенсивности ЯМР-сигналов продуктов диамагнитной реакции, которые аномально усиливаются за счет ХПЯ. Подробный анализ геминальных спектров ХПЯ, обнаруженных в фотореакции бензофенонов с Tyr (или His), и сравнение интенсивностей ХПЯ с КСТВ различных радикалов бензофенона, рассчитанных с использованием метода DFT или известных из ЭПР, позволили нам выяснить механизм реакции тушения. Фотоиндуцированный перенос электронов был подтвержден как единственный реакционный канал для геминальной реакции незамещенного бензофенона. Было найдено сочетание ET и PT для 4-CBP, DCBP и TCBP. Показано, что методом ХПЯ можно идентифицировать конечное положение переданного протона. В ряду карбоксизамещенных бензофенонов протон перемещается в геминальной стадии на карбоксильную группу, но не в карбонильную группу. Только на следующем этапе, уже на микросекундной временной шкале, протон оказывается на карбонильной группе с образованием кетильного радикала II. В случае TCBP протон переносится в карбоксильные группы в положениях 3 или 4 (3′ или 4′) со сравнимыми вероятностями. Очень высокая точность нашего метода позволяет обнаружить тонкие различия в распределении спиновой плотности в промежуточных радикалах, не наблюдаемых оптическими методами или ЭПР.

Предлагаемый здесь метод представляет собой обобщение ранее предложенного подхода, основанного на линейной корреляции интенсивностей сигналов ХПЯ продуктов реакции и сверхтонких констант в промежуточных радикалах. Подробный анализ геминальной стадии реакции путем линейной комбинации вкладов от различных пар становится возможным, если только известно достаточное количество КСТВ. Хотя здесь были рассмотрена ХПЯ только спинов ^{1}H, обобщение на гетероядра, в частности, на ^{13}C ХПЯ является достаточно простым, если можно получить соответствующий спектр геминальной ХПЯ. Большое усиление сигнала, возникающее в результате гиперполяризации, открывает путь для сокращения длительности импульса регистрации ЯМР и, следовательно, для улучшения временного разрешения эксперимента.

3.4. Исследование фотосенсибилизированного окисления S-метилцистеина и S-метилглутатиона методом ХПЯ в водном растворе.

Метод времяразрешенной ХПЯ (ВР-ХПЯ) был применен к исследованию фотоокисления S-метилцистеина, Cys(Me), и S-метилглутатиона, GS(Me). Было установлено, что реакция Cys(Me) с фотосенсибилизатором, триплетно возбужденным 4-карбоксибензофеноном или 3,3’,4,4’-тетракарбоксибензофеноном, происходит за счет переноса электрона от атома серы с образованием сероцентрированного катион-радикала. Из pH-зависимости ядерной поляризации установлено, что значение pK_a концевой аминогруппы этого радикала составляет 4.3, что значительно ниже, чем у исходного соединения, pK_a = 9.0. При pH ниже 4.3 сероцентрированный катион-радикал Cys(Me), сформированный в результате тушения триплета, участвует в реакции вырожденного обмена электрона с исходной молекулой, что приводит к быстрому затуханию ХПЯ во времени. При pH выше значения pK_a, ХПЯ постоянна во времени, что является результатом быстрого декарбоксилирования циклического радикала с трехэлектронной связью между атомами серы и кислорода, который образуется из линейного радикала с незаряженной аминогруппой. Участие этого радикала было подтверждено по зависимости ХПЯ от внешнего магнитного поля в диапазоне от 0.1 до 7 Тл. Для GS(Me), образование циклического радикала, на который указывает не зависящая от времени интенсивность ХПЯ, коррелирует с депротонированием концевой аминогруппы остатка глутамата в составе молекулы GS(Me). Образование циклического радикала с трехэлектронной связью между атомами серы и азота исключается из-за отсутствия поляризации CH-протона в α-положении по отношению к аминогруппе, а также с помощью полевой зависимости ХПЯ, которая является типичной для (S∴O) радикала. Таким образом, циклический радикал, возникающий при одноэлектронном окислении серы GS(Me), является 10-членным с трехэлектронной связью между атомом серы и атомом кислорода карбоксильной группы остатка глутамата.

3.4.1. Спектры ВР-ХПЯ и кинетики.

ЯМР-спектры S-метилцистеина, и спектры ХПЯ, полученные в фотореакции 4-карбоксибензофенона и S-метилцистеина при pH^* 11.3 и 7.3, приведены на рисунках 46а и б, соответственно. Эти значения pH^* лежат выше и ниже значения pK_a Cys(Me)= 9.0, соответственно Самая высокая поляризация наблюдается для γ и β протонов; также наблюдаются сигналы нескольких побочных продуктов. Спектры ХПЯ, полученные при двух pH^* значениях очень похожи и типичны для спектров, возникающих при участии сероцентрированных катион-радикалов [13, 72]. Кроме того, видно, что сигналы Cys(Me), обнаруженные в обоих значениях pH^* сразу после лазерного импульса и по прошествии 100

мкс после лазерного импульса, имеют примерно одинаковую интенсивность. Это также видно на рисунке 47, где показаны кинетики ХПЯ.

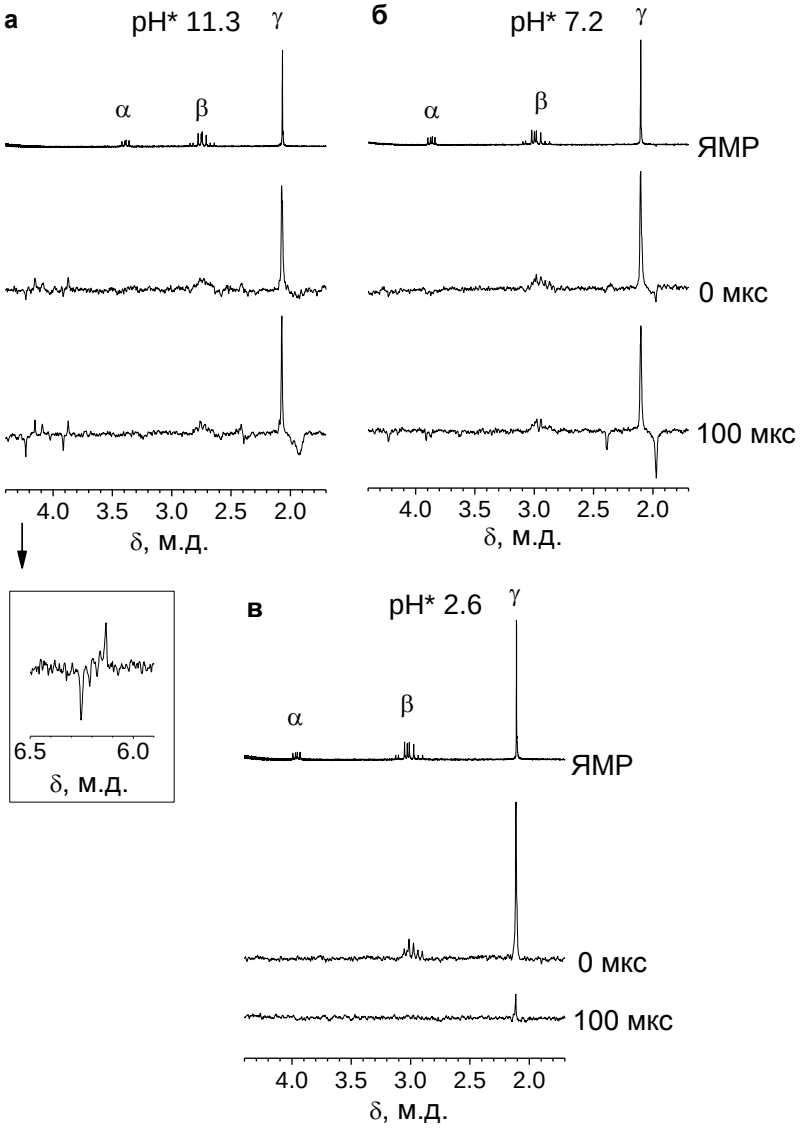


Рисунок 46. Алифатическая область 200 МГц ^{1}H ЯМР спектров S-метилцистеина и спектров ХПЯ, полученных в фотореакции 4-карбоксибензофенона (или 3,3’,4,4’-тетракарбоксибензофенона при pH* 2.6) и S-метилцистеина при pH* 11.3 (а), 7.3 (б), и 2.6 (в). Спектры ХПЯ регистрировались сразу после лазерного импульса и по прошествии 100 мкс после лазерного импульса. Вставка – область сигналов виниламина в спектре на рисунке а, при задержке после лазерного импульса 100 мкс.

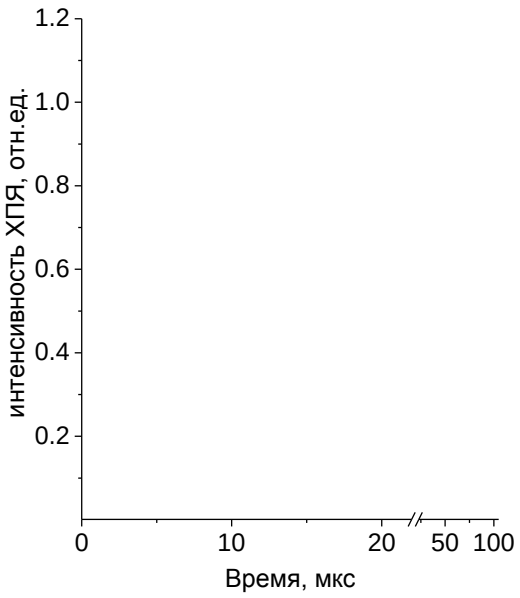


Рисунок 47. Кинетика ^{1}H ХПЯ, полученная в фотореакции 4-карбоксибензофенона и 4 мМ S-метилцистеина при pH* 11.3 (закрашенные треугольники) и 7.3 (открытые треугольники), а также в фотореакции 3,3’,4,4’-тетракарбоксибензофенона и 2 мМ (закрашенные кружки) и 4 мМ (открытые кружки) S-метилцистеина при pH* 2.6.

Отсутствие зависимости от времени для сигнала ХПЯ при pH 11.3 является четким признаком того, что время жизни радикала, ответственного за формирование ХПЯ, короче 1 мкс, что приводит к удалению этого радикала от участия в радикальных реакциях на гомогенной стадии. Для этого типа радикалов реакция радикальной трансформации – это декарбоксилирование, происходящее после образования циклического радикала с трехэлектронной связью. Трехэлектронная связь может быть образована между атомами серы и азота, или атомами серы и кислорода. Для Cys(Me) образование связи $(S\therefore N)^{+}$ требуется стерически затруднённой четырехчленной циклической структуры. Ранее было высказано предположение, что одноэлектронное окисление Cys(Me) приводит к формированию более благоприятного пятичленного циклического радикала III с $(S\therefore O)$ связью [162], хотя он менее стабилен, чем $(S\therefore N)^{+}$ радикал.

В экспериментах ХПЯ, поляризация была обнаружена только для протонов в β и γ положениях, но не наблюдалась для протона в α-положении аминокислоты. Это наблюдение исключает $(S\therefore N)^{+}$ циклическую структуру, которая должна иметь ненулевые константы СТВ не только для протонов в β и γ позициях, но и в α-положении. Реакция распада циклической радикальной структуры посредством декарбоксилирования была подтверждена косвенно: эта реакция приводит к α-аминоалкильному радикалу IV, который подвергается расщеплению с образованием виниламина V**,** для протонов которого ранее наблюдалась мультиплетная ХПЯ [36]. Спектр ХПЯ, показанный на вставке на рисунке 46, соответствует протонам виниламина VI в полном соответствии с этим путем

преобразований радикалов (см. рисунок 48). Детектирование сигналов ХПЯ, которые не зависят от времени на микросекундной временной шкале при pH*7.3, ниже pK_a аминогруппы, является показателем того, что механизм радикальных преобразований идентичен тому, который имеет место при pH* 11.3. Можно сделать вывод о том, что это циклический радикал III с (S∴O) связью, причем формирование этого радикала не зависит от протонированного состояния аминогруппы. Тем не менее, понижение pH до значений значительно ниже pK_a Cys(Me), изменяет вид кинетики ХПЯ на спадающий, как это показано на рисунках 46 и 47, где показаны спектры ХПЯ и кинетика при pH* 2.6. Так как при этом значении pH 4-карбоксибензофенон не может быть растворен в требуемой концентрации, 3,3',4,4'-тетракарбоксибензофенон был использован в качестве альтернативного фотосенсибилизатора. Были получены спадающие кинетики ХПЯ, характерные для случая, когда кинетика ХПЯ определяется вырожденным электронным обменом с исходными диамагнитными частицами, а соответствующие одноэлектронно окисленные линейные радикалы не претерпевают каких-либо преобразований [163]. Это наблюдение указывает на то, что катион-радикалы IIa, образующиеся в ходе одноэлектронного окисления Cys(Me), имеют более низкую константу кислотности аминогруппы, чем исходная молекула Ia.

Для установления того, в каком именно диапазоне значений pH происходит переход от реакции вырожденного электронного обмена к реакции декарбоксилирования, был измерен ряд спектров ХПЯ при различной кислотности растворов при двух значениях задержек: 0 и 100 мкс. Затем были взяты отношения интегралов от сигналов метильной группы в геминальных спектрах и спектрах после задержки, и полученная зависимость была аппроксимирована уравнением 6.1.

$$I = \frac{I_0 + I_1 10^{pH-pKa}}{1 + 10^{pH-pKa}} \qquad (6.1.)$$

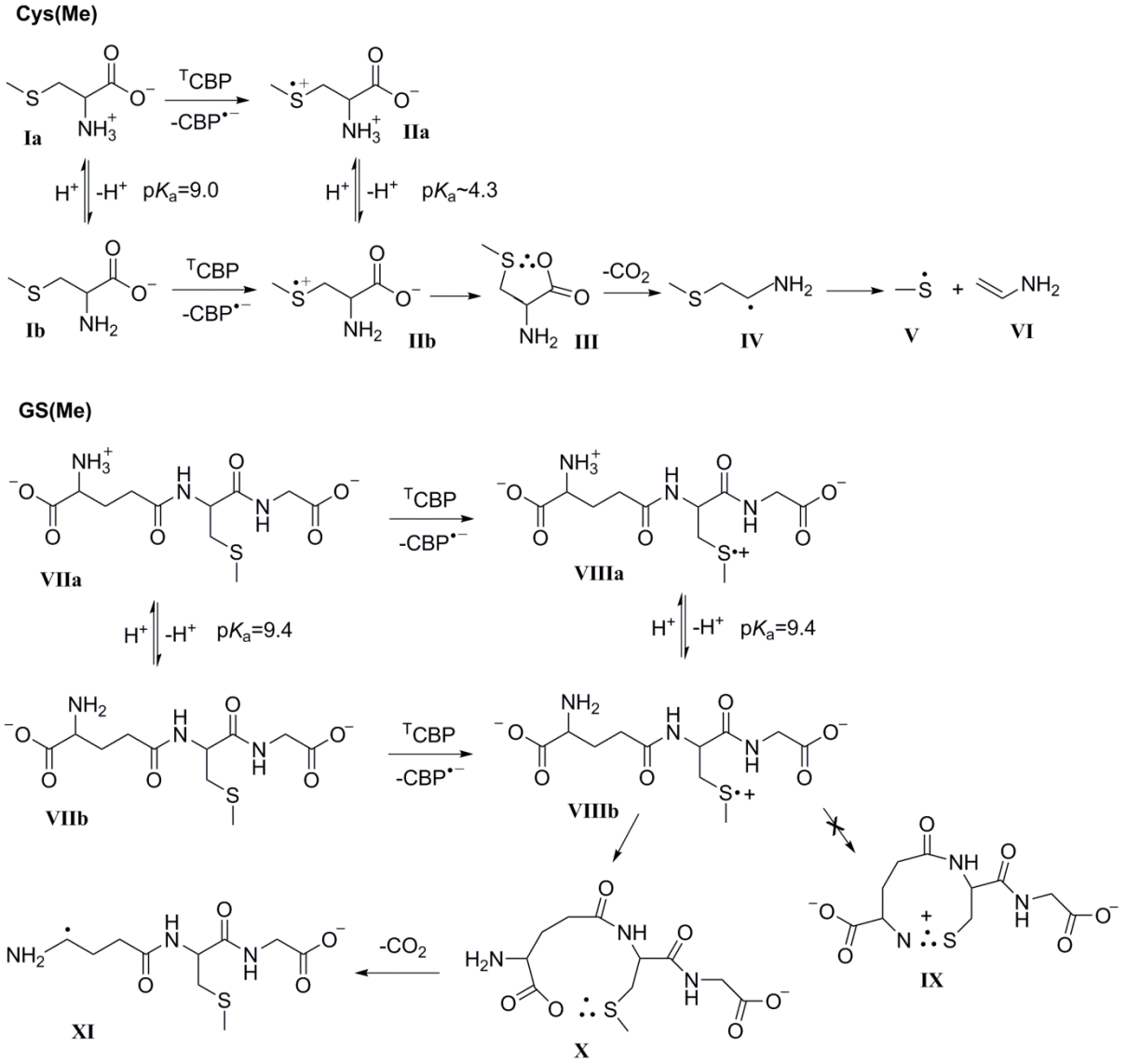


Рисунок 48. Схема реакций, происходящих в результате переноса электрона от частиц Cys(Me) или GS(Me) на триплетно-возбужденную частицу ^{T}CBP.

В реакции вырожденного электронного обмена, перенос поляризации от радикала в диамагнитную молекулу является реакцией псевдо-первого порядка, и он характеризуется константой скорости, равной произведению константы скорости второго порядка k_{ex} и концентрации исходной молекулы (индекс "P" обозначает нетермическую ядерную поляризацию):

$$^{P}R - S^{+\bullet} - CH_3 + R - S - CH_3 \xrightarrow{k_{ex}} {}^{P}R - S - CH_3 + R - S^{+\bullet} - CH_3 \quad (5.1)$$

Ядерная поляризация радикалов в объеме имеет противоположный знак по сравнению с геминальной поляризацией, следовательно, электронный обмен приводит к эффективной компенсации геминальной ХПЯ в продуктах. Чем выше концентрация, тем быстрее обмен, и тем меньше поляризации обнаруживается при более длительных задержках после лазерного импульса.

Для описания кинетики ХПЯ был использован набор дифференциальных уравнений, описанный в разделе 1.1.2.

Из моделирования получили $k_{ex} = (8 \pm 2)\times10^{8}$ $M^{-1}c^{-1}$, и время парамагнитной релаксации для γ-протонов T_1 = 100±50 мкс. Большая неопределенность в определении T_1 объясняется низкой интенсивностью стационарного сигнала ХПЯ, которая является основным источником определения T_1.

pH-зависимость соотношения интенсивностей ХПЯ γ-протонов Cys(Me), зарегистрированных через 100 мкс после лазерного импульса и сразу после лазерного импульса показана на рисунке 49. Эта зависимость отражает переход кинетической зависимости ХПЯ от спадающей до постоянной и имеет точку перегиба при pH^*=4.3, что является оценкой pK_a^* аминогруппы сероцентрированного катион-радикала IIa. Ранее в нашей лаборатории в МТЦ была определена константа кислотности 4.7 для концевой аминогруппы сероцентрированного катион-радикала пептида метионин-глицина [72], которая также значительно ниже, чем у исходной молекулы.

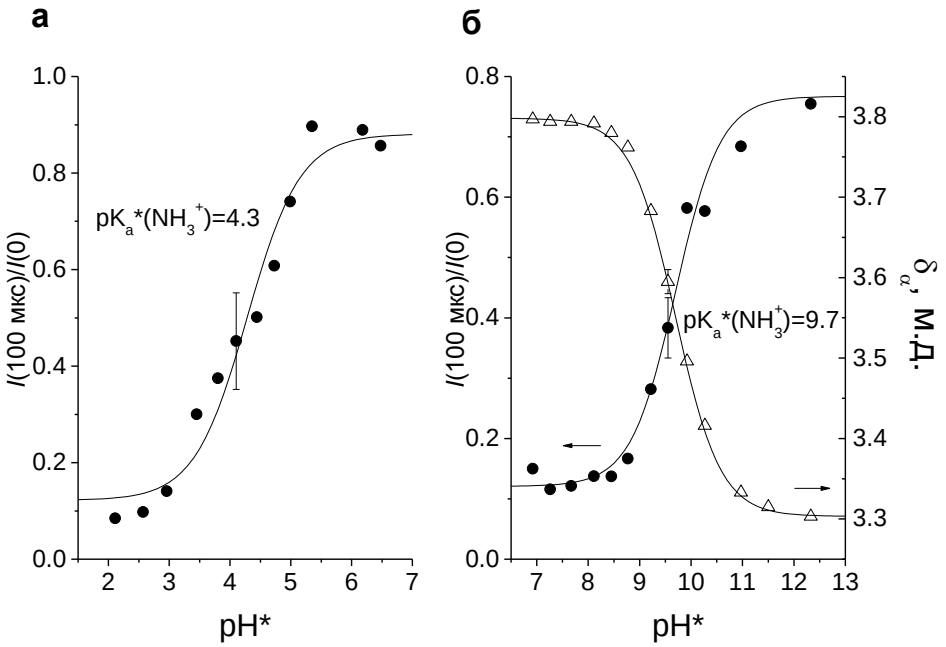


Рисунок 49. а) pH^* зависимость соотношения интенсивностей ХПЯ γ-протонов S-метилцистеина, полученных по прошествии 100 мкс после лазерного импульса и с нулевой задержкой после лазерного импульса в фотореакции 4-карбоксибензофенона и 4 мМ S-метилцистеина; б) pH^* зависимость соотношения ХПЯ интенсивностей γ-протонов остатка метилцистеина в структуре S-метилглутатиона, полученных по прошествии 100 мкс после лазерного импульса и при нулевой задержке после лазерного импульса в фотореакции 4-карбоксибензофенона и 5 мМ S-метилглутатиона (кружки); pH^* зависимость химического сдвига α-протона от остатка глутамата в структуре S-метилглутатион (треугольники).

Спектры ХПЯ и кинетика, полученные в ходе фотореакции GS(Me) показаны на рисунках 50 и 51. Вид спектров ХПЯ GS(Me) очень похожа на спектры ХПЯ Cys(Me). Отсутствие поляризации протонов в α-положении по отношению к атому азота остатка Glu

исключает формирование циклического радикала IX с трехэлектронной связью между атомами серы и азота, в отличие от того вывода, сделанного в работе [77] на основании данных по промежуточному оптическому поглощению. Для GS(Me), изменение кинетической зависимости ХПЯ от спадающей к постоянной (см. рисунок 50) происходит при pH равному pK_a концевой аминогруппы GS(Me): кривая титрования отношения интенсивностей сигналов ХПЯ γ-протонов GS(Me) при τ = 100 мкс и τ = 0 мкс имеет точку перегиба при pH^* 9.7, что совпадает с величиной pK_a GS(Me), как показано на кривой титрования химического сдвига на рисунке 49. Совпадение констант кислотности для радикала и исходной молекулы не удивляет, если принять во внимание удаленность концевой аминогруппы от радикального центра. Тем не менее, тот факт, что состояние протонирования концевой аминогруппы отвечает за структуру радикала GS(Me), формирующегося при одноэлектронном окислении последнего, позволяет провести идентификацию структуры радикала (как показано ниже).

Из моделирования кинетических данных ХПЯ получены следующие константы $k_{ex} = (2.5 \pm 0.7) \times 10^8\ M^{-1}c^{-1}$ и время парамагнитной релаксации для протонов $T_1 = 40 \pm 10$ мкс.

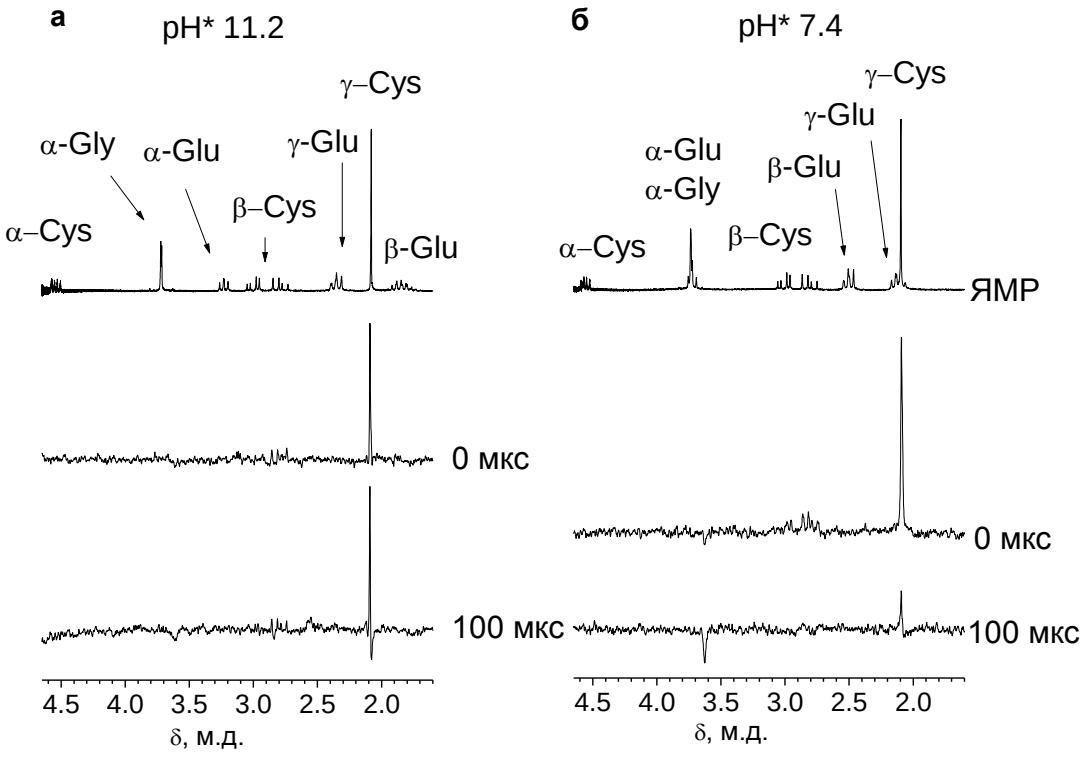


Рисунок 50. 200 МГц ^{1}H ЯМР-спектры S-метилглутатиона, и спектры ХПЯ, полученные в фотореакции 4-карбоксибензофенона с S-метилглутатионом при pH^* 11.2 (а) и 7.4 (б). ХПЯ спектры регистрировались сразу после лазерного импульса и через 100 мкс после лазерного импульса.

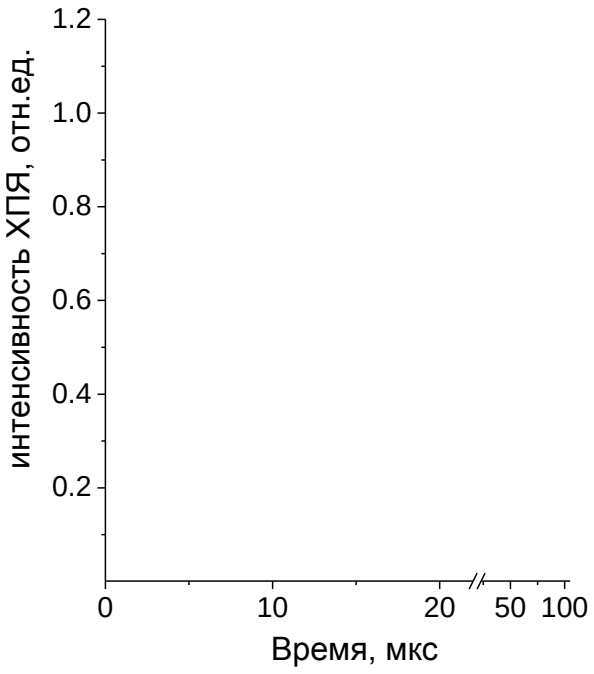


Рисунок 51**.** Кинетика ^{1}H ХПЯ, полученная в фотореакции 4-карбоксибензофенона и 5 мМ S-метилглутатиона при pH* 11.2 (треугольники), 5 мМ S-метилглутатион при pH* 7.4 (открытые кружки), и 2.5 мМ S-метилглутатиона при pH 7.4* (закрытые кружки).

3.4.2. Полевые зависимости ^{1}H ХПЯ.

На рисунке 53 показана зависимость ХПЯ от магнитного поля при значениях pH, соответствующих наблюдениям независящей от времени и спадающей кинетики ХПЯ (11.3 и 7.3 для GS(Me) и 11.2 и 2.6 для Cys(Me)). Видно, что в пределах погрешности эксперимента, полевые зависимости для каждого соединения совпадают в двух значениях pH. Максимумы наблюдаются при B ~ 0.82 Тл для Cys(Me), и при B ~ 0.73 Тл для GS(Me). На рисунке 53 показаны также полевые зависимости, рассчитанные нами ранее [72] с g-фактором CBP$^{\bullet-}$ 2.0033 [35], а также для соответствующих параметров для димерного радикала $(S\therefore S)^+$ и циклического радикала $(S\therefore N)^+$ (см. таблицу 8 для параметров расчетов). Полевые зависимости ХПЯ, полученные в настоящем исследовании, полностью исключают циклическую структуру со связью между атомами серы и азота (максимум зависимости ХПЯ ожидается около 2.2 Тл), а также исключают возможность образования димерного радикала (ожидаемый максимум ХПЯ на 0.55 Тл). Кроме того, мы рассчитали численно полевую зависимость ХПЯ с константами СТВ для S-центрированного катион-радикала (IIa или VIIIa) и $(S\therefore O)$ радикала (III или X, см. таблицу 8 для параметров). Оптимизация параметров для лучшего соответствия экспериментальным данным привела к значениям g-фактора для S-центрированного катион-радикала 2.0090 в случае Cys(Me), и 2.0100 в случае

GS(Me); для (S∴O) радикала g-фактор составил 2.0078 в случае Cys(Me), и 2.0080 в случае GS(Me). Тем не менее, из полевых зависимостей нельзя различить $S^{\bullet+}$ и (S∴O) радикалы из-за дисперсии экспериментальных данных. Вывод о циклической структуре с трехэлектронной связью между атомами S и O, либо о линейном сероцентрированном катион-радикале может быть сделан только на основании характера кинетики ХПЯ: независящее от времени поведение является результатом быстрого декарбоксилирования циклической структуры, в то время как быстрый спад ХПЯ может наблюдаться только тогда, когда присутствует вырожденный электронный обмен, который возможен между линейным катион-радикалом и соответствующей диамагнитной частицей. Сильная корреляция между типом кинетики ХПЯ и состоянием протонирования концевой аминогруппы остатка глутамата GS(Me), указывает на то, что радикальная структура представляет собой 10-членный циклический радикал с трехэлектронной связью между серой и кислородом карбоксильной группы на N-конце остатка Glu (радикал X на рисунке 48).

Влияние заряда аминогруппы на механизм фотореакции также может быть объяснено без привлечения гипотез об образовании (S∴N) радикала IX: когда аминогруппа теряет протон, остаток глутаминовой кислоты приобретает отрицательный заряд, что способствует её притяжению к положительно заряженному $S^{\bullet+}$ радикальному центру. Затем этот остаток координируется атомом кислорода карбоксильной группы к атому серы, после чего возможна реакция декарбоксилирования, причем свободная пара электронов аминогруппы может способствовать процессу разрыва связи за счет эффекта сверхсопряжения, понижающего энергию активации разрыва связей в α-положении [164].

Что касается структуры радикала Cys(Me), то предположение о циклической структуре радикала подтверждается дополнительно тем, что интенсивности сигналов двух β-протонов различны, что является следствием различных констант СТВ с данными протонами. Различие констант СТВ указывает на отсутствие усреднения за счет конформационного движения, которое следовало бы ожидать, если бы допускалось свободное вращение вокруг одинарных связей в циклическом радикале. Для подтверждения имеющихся данных автором был проведен расчет геометрии и магниторезонансных параметров методами квантовой механики. Оптимизированная структура показана на рисунке 52.

Рассчитанная величина g-фактора составляет g(Cys(Me)$^{\bullet}$)=2.0078, что попадает в диапазон значений, полученный в эксперименте. Расстояние между атомом серы и ближайшим атомом кислорода карбоксильной группы составляет d(S-O)=2.57 Å, что по

данным [165] соответствует стабилизации на уровне 1.2 эВ относительно сероцентрированного катион-радикала.

Расчеты также подтверждают, что в такой циклической структуре радикала константы СТВ для двух β-протонов существенно различны: $A_{\beta 1}$=0.014 мТл, $A_{\beta 2}$=0.68 мТл.

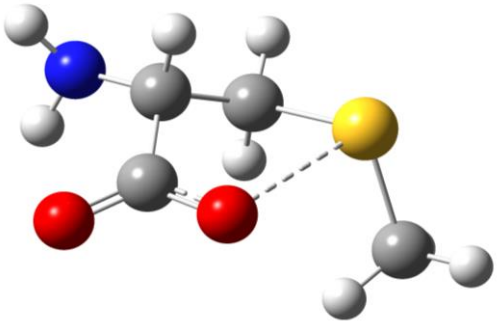


Рисунок 52. Структурная формула радикала Cys(Me), оптимизированная методом UB3LYP на базисе 6-31G. Пунктиром отмечено наименьшее расстояние между атомами серы и кислорода.

Таким образом, схема реакции на рисунке 48 была подтверждена на основании данных о зависимости ХПЯ от времени и от напряженности магнитного поля. Важно отметить, что циклическая структура с трехэлектронной связью между атомами S и O, предложенная в литературе, предполагает участие кислорода карбонильной группы [77, 165].

Концентрационная зависимость вероятности формирования $(S\therefore S)^+$ радикала может объяснить, почему эти радикалы не проявляют себя в настоящем исследовании. Например, в работе [166] такие радикалы наблюдались при концентрации исходного соединения (пептида Lys-Met) равной 20 мМ, в то время как для данной работы использовались растворы исследуемых соединений с концентрацией 2-5 мМ.

Новыми результатами данного исследования являются следующие наблюдения: (1) для циклического радикала $(S\therefore O)$ требуется также отсутствие положительного заряда на аминогруппе, смежной с карбоксильной группой, а также (2) образование $(S\therefore O)$ радикала более благоприятно, чем $(S\therefore N)^+$ радикала в случае GS(Me). Возможное объяснение последнего вывода состоит в том, что десятичленный циклический радикал является более стабильным, чем девятичленный; тем не менее, пока нет никаких более прямых доказательств этому.

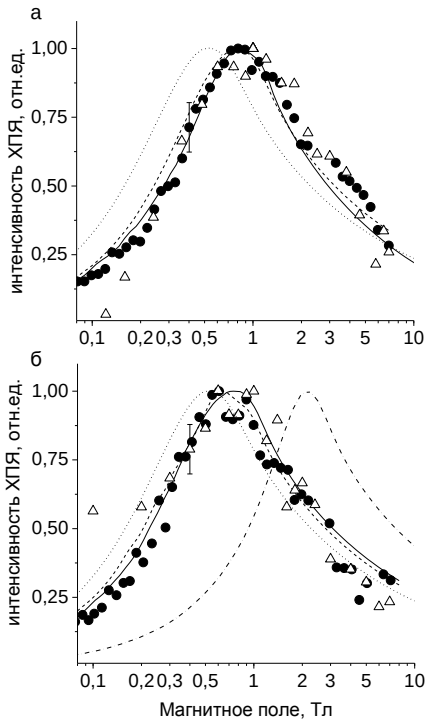


Рисунок 53. Полевые зависимости ^{1}H ХПЯ γ-протонов (остатка) метилцистеина, полученные в фотореакции (а) 4-карбоксибензофенона и метилцистеина при pH* 7.1 (кружки), а также 3,3’,4,4’-тетракарбоксибензофенона и метилцистеина при pH* 2.6 (треугольники); (б) 4-карбоксибензофенона и метилглутатиона при pH* 11.3 (кружки) и 7.3 (треугольники). Линии – результаты расчетов, параметры для каждой линии указаны в таблице 8.

Таблица 8. Параметры радикалов, используемых в расчетах полевых зависимостей ХПЯ, представленных на рисунке 53, и магнитные поля ($B_{макс}$), соответствующие максимальной ХПЯ.

Вид линии на рисунке	Радикал	g-фактор	$B_{макс}$, Тл	Константы СТВ, мТл	Константы СТВ радикала СВР,[б] мТл
Рис. 53а					
Пунктирная линия	$(S\therefore S)^+$	2.0100 [167]	0.55	0.71 (6H, γ) 0.565 (4H, β) [72]	-0.29 (4H) -0.11 (2H) 0.35 (1H) [35]
Пунктир	$S^{\bullet+}$	2.0090±0.001[a]	0.78	1.42 (3H, γ) 1.13 (2H, β)[167]	0.265 (2H) -0.253 (2H) 0.0897 (2H) [35]
Сплошная линия	$(S\therefore O)$	2.0078±0.001[a]	0.82	0.93 (3H, γ) 1.13 (1H, β1) 0.45 (1H, β2) [71]	
Рис. 53б					
Штрих-пунктирная линии	$(S\therefore N)^+$	2.0064 [168]	2.20	0.7 (3H, γ) 0.8 (2H, β) 1.0 (H, α) 2.0 (N) [168]	0.29 (4H) -0.11 (2H) 0.35 (1H) [35]
Пунктирная линия	$(S\therefore S)^+$	2.0100 [167]	0.54	0.71 (6H, γ), 0.565 (4H, β) [72]	
Пунктир	$S^{\bullet+}$	2.0100±0.001 [167]	0.64	1.42 (3H, γ), 1.13 (2H, β) [167]	
Сплошная линия	$(S\therefore O)$	2.0080±0.001[a]	0.75	0.93 (3H, γ) 1.13 (1H, β1) 0.45 (1H, β2) [71]	

[a] Получены из наилучшего соответствия между моделированием полевой зависимости ХПЯ и экспериментальными данными.

[б] Для радикала СВР был использован g-фактор 2.0033[35].

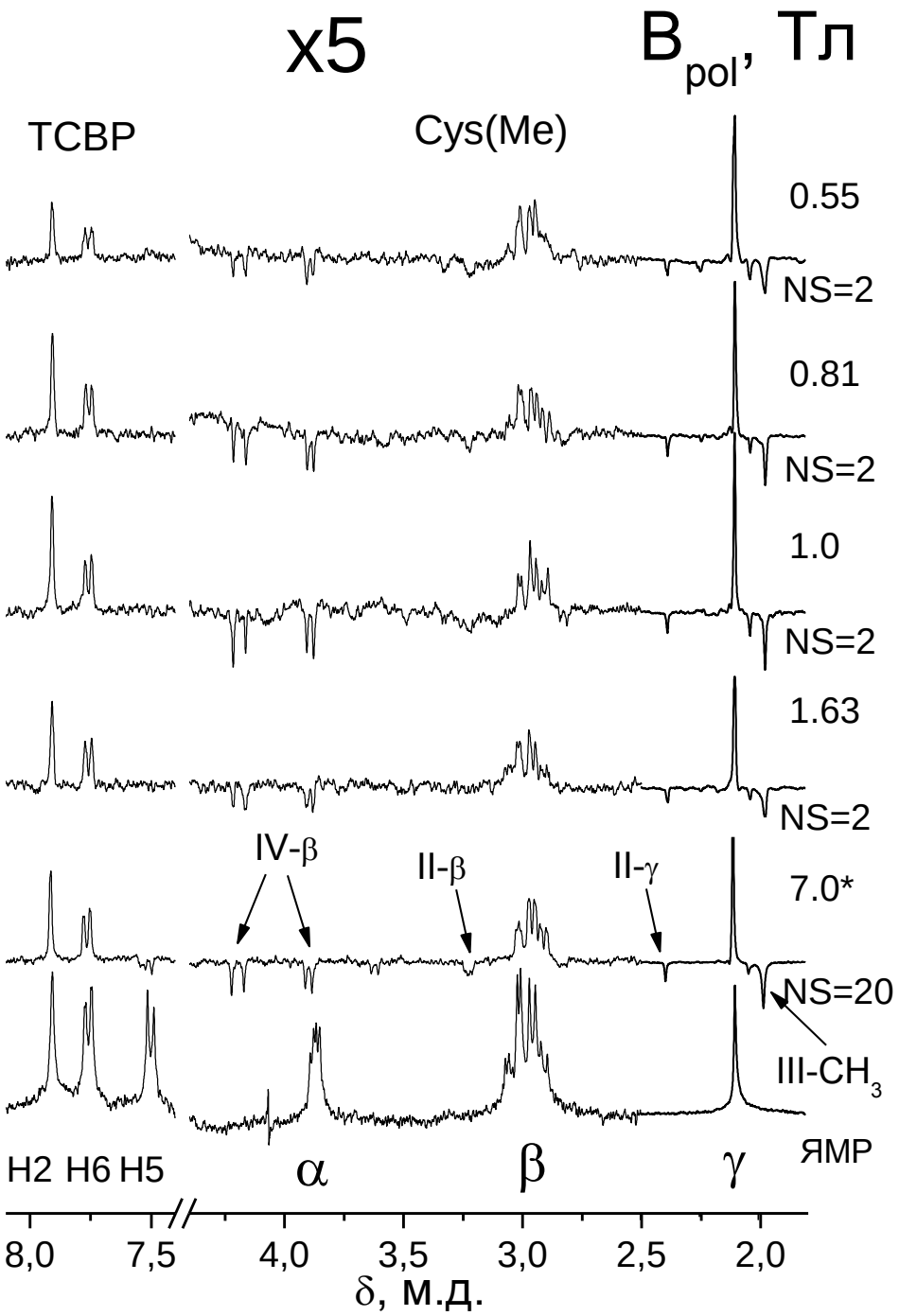


Рисунок 54. Спектры ХПЯ в фотореакции Cys(Me) и TCBP при различных значениях напряженности магнитного поля, в котором создавалась поляризация, в сравнении со спектром термической поляризации. Спектр в магнитном поле 7 Тл зарегистрирован без переключения магнитного поля, число накоплений (NS) равно 20, для остальных спектров ХПЯ число накоплений – 2. C(TCBP)=2 мМ, C(Cys(Me))=4 мМ, pH=7.4.

3.4.3. Заключение.

В данной главе описана детальная структурная информация, полученная в ЯМР-экспериментах по измерению кинетики ХПЯ, которая позволила идентифицировать промежуточные радикалы S-метилцистеина и S-метилглутатиона, образующиеся при одноэлектронном фотоокислении соответствующих диамагнитных частиц в реакции с

триплетно-возбужденными производными бензофенона (4-карбоксибензофеноном или 3,3’,4,4’-тетракарбоксибензофеноном). Использование зависимости ХПЯ от внешнего магнитного поля дало возможность определить магниторезонансные параметры (g-факторов) радикалов, образующихся в фотореакции и существенно дополнить информацию, полученную из измерений кинетики ХПЯ. Для обоих соединений линейные S-центрированные радикалы образуются при pH ниже pK_a концевой аминогруппы радикала, причем эта константа примерно на 5 единиц ниже, чем у исходной молекулы в случае Cys(Me), и совпадает с таковой для исходной молекулы в случае GS(Me), что коррелирует с удаленностью аминогруппы от положительно заряженного радикального центра. При pH выше pK_a концевой аминогруппы образуется циклический радикал с двухцентровой трехэлектронной связью между атомами O и S. Таким образом, комбинация времяразрешенной методики ХПЯ и экспериментов с варьированием магнитного поля позволила нам установить подробную схему реакции фотоиндуцированного окисления S-метилцистеина и S-метилглутатиона [169].

3.5. Исследование динамики открытия-закрытия двойной спирали тридекамерных ДНК дуплексов методом ЯМР.

Данный раздел посвящен исследованию динамики открытия-закрытия двойной спирали тридекамерных ДНК дуплексов, содержащих химически модифицированные азотистые основания, моделирующие повреждения, репарируемые алкиладенин ДНК гликозилазой человека (AAG). Несмотря на интенсивные исследования, пока неясны молекулярное происхождение широкой субстратной специфичности и механизм дискриминации между модифицированными и каноническим основаниями ДНК. Разница между этими основаниями может быть связана с различными искажениями локальной структуры ДНК вокруг модифицированного основания, влияющими на эффективность достижения каталитически активной конформации. Другим основанием для узнавания субстрата могут быть различия в скорости открытия пар оснований [101]. Этот фактор должен зависеть от стабильностей пар оснований в молекуле ДНК, что нами было изучено методом спектроскопии ЯМР.

3.5.1. Отнесение сигналов протонов.

Отнесение сигналов ЯМР было проведено в соответствии с общей стратегией, предложенной Р. Каптейном с соавторами [170] для обменивающихся протонов. Хорошо известно, что иминопротоны в канонических Уотсон-Криковских парах ДНК-дуплексов попадают в два различных диапазона химического сдвига: для AT-пар от 15 до 13.5 миллионных долей, в то время как для пар оснований CG этот диапазон составляет от 13.5 до 12 миллионных долей. Из-за эффекта “обтрепанных концов” (Fraying Effect), иминопротоны концевых азотистых оснований, как правило, не видны в спектрах ЯМР [171]. Канонический неповрежденный тридекамерный дуплекс (последовательность нуклеотидов показана в разделе 2.2.1) с A/T парой в седьмом положении содержит пять AT иминопротонов, видимых в диапазоне от 15 до 13.5 миллионных долей, в то время как модифицированные дуплексы, содержащие пары оснований Hx/T, εA/T и F/T, имеют только четыре сигнала в данном диапазоне (см. рисунок 55).

Иминопротонные участки 2D NOESY спектров для всех четырех дуплексов приведены на рисунке 55. Отправной точкой последовательного отнесения для всех дуплексов был кросс-пик T10 и T11 иминопротонов, так как эта комбинация встречается лишь один раз в структуре дуплексов. По соседству с этими основаниями находятся пары CG9 или CG12. Для того, чтобы найти правильное направление отнесения, необходимо увидеть различие между G9 и G12, что было сделано с помощью исследования процессов плавления дуплекса. Сигнал иминопротона G12 исчезает при более низких температурах, в то время как протон основания G9 еще виден в спектре. Полная последовательность кросс-

пиков показана на рисунке 55. Для εA/T и F/T эта последовательность прерывается из-за того, что иминопротон основания T7 этих дуплексов находится в быстром обмене с водой, что приводит к отсутствию кросс-пиков с соседними основаниями, в то время как для Hx/T нами был найден дополнительный иминопротон гипоксантина. Кросс-пик между Hx7 NH и T7 NH имеет более высокую интенсивность по сравнению с другими кросс-пиками между основаниями, это происходит из-за формирования водородных связей “качающегося” типа между гипоксантином и тимином (Wobble-Type Pairing) [172], где два иминопротона достаточно близки друг к другу. Неоднозначность между Hx7 и T7 иминопротонами была исключена благодаря наличию перекрестного пика между иминопротоном T7 и метильными протонами остатка тимина. После отнесения всех иминопротонов можно провести отнесение остальных обменивающихся и необменивающихся протонов. Все NH-протоны тимина имеют кросс-пики с CH_3-протонами тимина с H2-протонами комплементарных остатков аденина, а иминопротоны гуанина имеют сильные кросс-пики с сопряженными аминопротонами цитозина (H42, участвующим в образовании водородных связей, и H41, не участвующим в них). По кросс-пикам протонов H42 и H41 цитозина можно отнести ароматические протоны H5 и H6 в пределах каждого остатка цитозина. Химические сдвиги протонов тимина H6 определялись из кросс-пиков с CH_3 протонами.

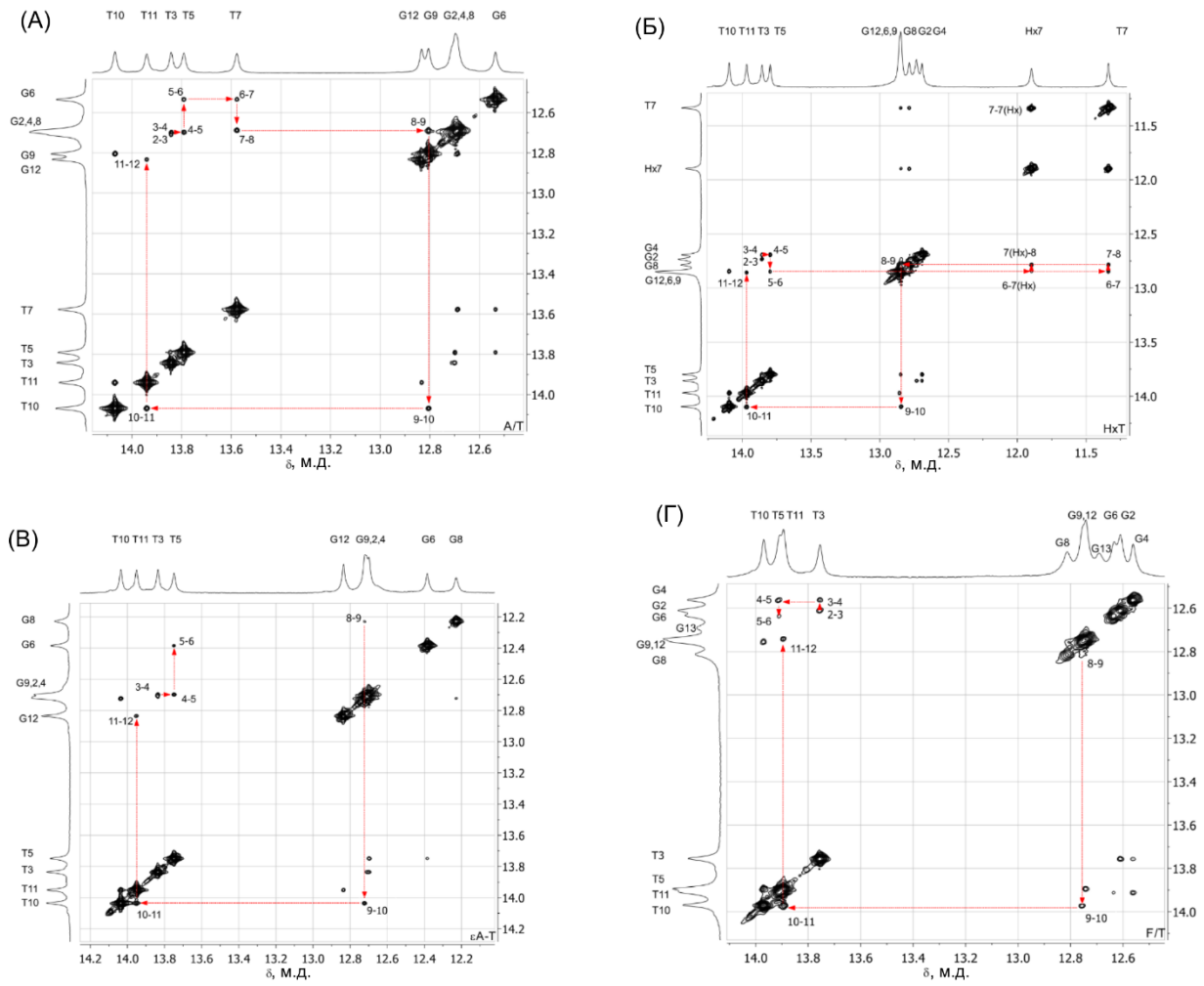


Рисунок 55. Участки 2D NOESY спектров, содержащие сигналы иминопротонов дуплексов A/T (А), Hx/T (Б), εA/T (В), F/T (Г).

3.5.2. Температурная стабильность дуплекса.

Иминопротоны в свободных T и G нуклеотидах, как известно, находятся в быстром обмене с протонами воды. Таким образом, образование водородной связи, например, в двухцепочечной спирали ДНК, является единственным способом, чтобы сделать их сигналы видимыми в спектре ^{1}H ЯМР. Следовательно, если температура раствора повышается, интенсивность ЯМР сигнала иминопротона уменьшается из-за плавления дуплекса, то есть разрыва водородных связей в нем. Для определения сайт-специфичных значений температуры раскрытия пар оснований, T_{bo}, которая соответствует уменьшению интенсивности сигнала на 50%, перекрывающиеся сигналы в спектрвх были разложены на отдельные линии, а затем нормированные интенсивности были аппроксимированы с помощью функции $I(T) = \frac{1}{1+e^{(T-Tbo)/\Delta T}}$. Пример разложения ЯМР спектра на компоненты представлен на рисунке 23.

Метильные протоны T-нуклеотидов показывают хорошо разделенные индивидуальные сигналы ЯМР в дуплексе, но в мономерной форме олигонуклеотидов они

сливаются в единый неразрешенный сигнал, сдвинутый на 0.2-0.3 миллионной доли относительно сигнала дуплекса. Температуры плавления (T_m) всех дуплексов были рассчитаны на основании интенсивности ЯМР сигналов от этих необменивающихся метильных протонов остатков тимина. Стандартная процедура определения T_m [173] основана на моделировании температурной зависимости химического сдвига необменивающихся протонов. В нашем случае, оказалось невозможным определить химический сдвиг метильных протонов при переходных температурах из-за медленного обмена между одно- и двухцепочечных формами (см. рисунок 56 (Б)). Вместо этого оказалось возможным сравнить температурную зависимость интенсивности всех линий ЯМР метильных протонов одноцепочечной и двухцепочечной форм ДНК (см. рисунок 57 (В)). В нашем исследовании, интегральная интенсивность сигналов каждого дуплекса при самой низкой температуре была нормирована на единицу, в то время как его температурная зависимость сравнивалась с зависимостью, соответствующей интегральной интенсивности сигнала тех же протонов в одноцепочечной форме олигонуклеотидов. В точке T_m, эти интенсивности были равны 0.5. Для определения T_m всего дуплекса данные аппроксимировали с общим набором подгоночных параметров T_m и ΔT для каждого дуплекса и для его одноцепочечного варианта с использованием функции Больцмана, приведенной выше, но с заменой T_{bo} на T_m.

ЯМР спектры A/T, Hx/T, εA/T и F/T дуплексов были записаны при различных температурах в диапазоне 0-60°C (см. рисунок 56). Эти данные четко показывают, что одиночная модификация нуклеотида, помещенного в центре дуплекса, оказывает существенное влияние на общую стабильность дуплекса.

Анализ интенсивностей сигналов иминопротонов позволяет сравнить стабильность пары оснований вдоль цепочки оснований модельных дуплексов. Температурные зависимости интенсивностей сигналов иминопротонов для A/T, Hx/T, εA/T и F/T дуплексов и повреждения пар оснований показаны на рисунке 57. Эти данные позволяют рассчитать температуру открытия пар оснований, T_{bo}, отдельных пар оснований вдоль ДНК дуплекса. Результирующие сайт-специфические данные о температурах плавления, соответствующих каждой паре оснований показаны на рисунке 58.

2D NOESY ЯМР-спектроскопия подтверждает, что структура Hx- и εA- содержащих ДНК дестабилизирована, но при этом находится в рамках общей конформации дуплекса типа B-спирали. Как следует из анализа данных, приведенных на рисунках 58 и 62, дуплексы содержат стабильные “ядра”, образованные с 4ой до 10ой пары оснований, имеющих максимальные температуры открытия. Стабильность дуплексных ядер уменьшается в порядке A>Hx>εA>F. Тем не менее, температура раскрытия пар оснований

T_{bo} не соответствует плавлению всего дуплекса, как это видно по спектрам ЯМР. Вместо этого, температура плавления определялась по скоростям обмена протонов с растворителем, и за счет разницы в частоте обмениваемых сигналов; таким образом, эти величины зависят от величины магнитного поля обнаружения ЯМР и подробно рассматриваются в следующем разделе.

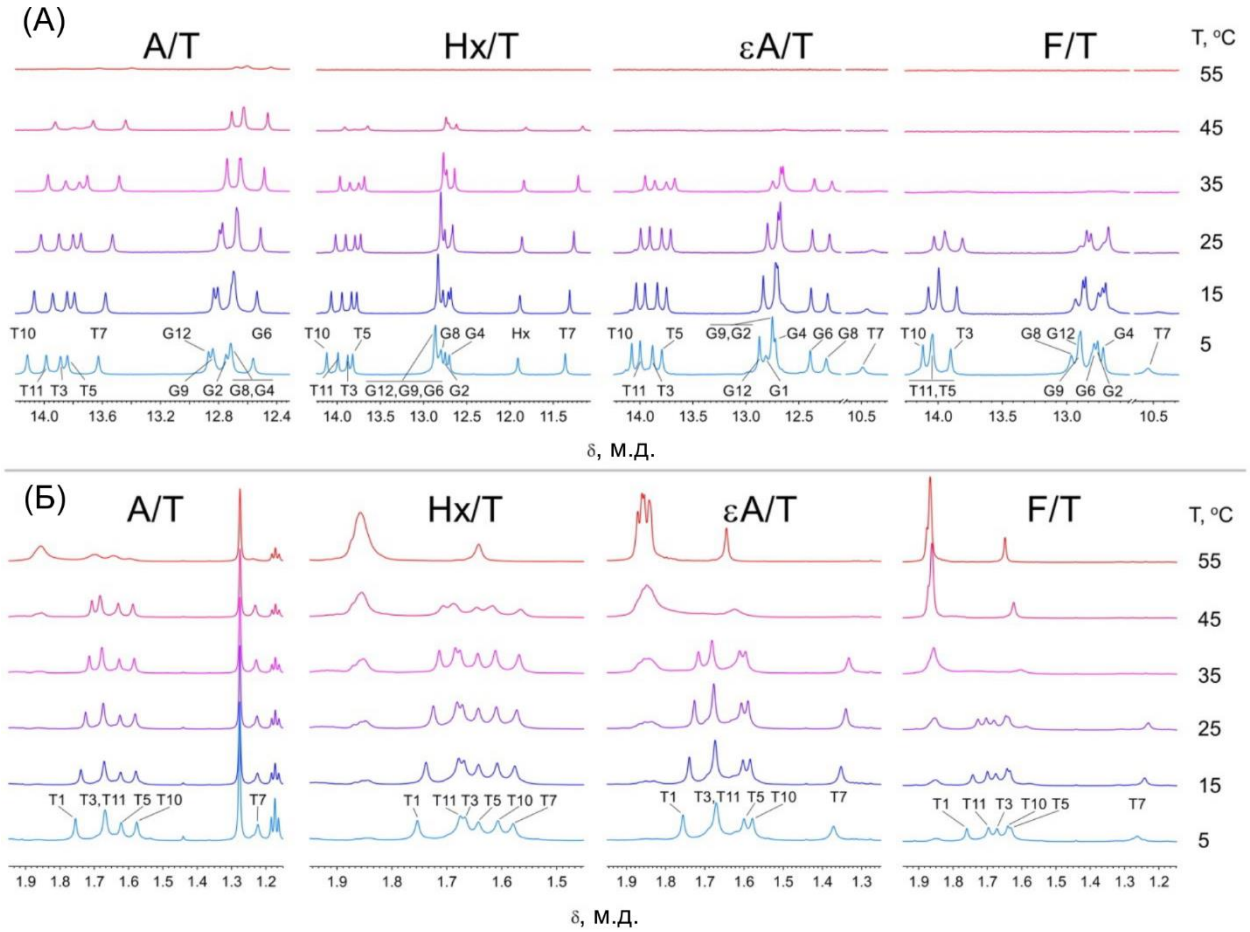


Рисунок 56. ^{1}H ЯМР-спектры ДНК-дуплексов при различных температурах. (А) область иминопротонов, (Б) область необменивающихся метильных протонов оснований тимина.

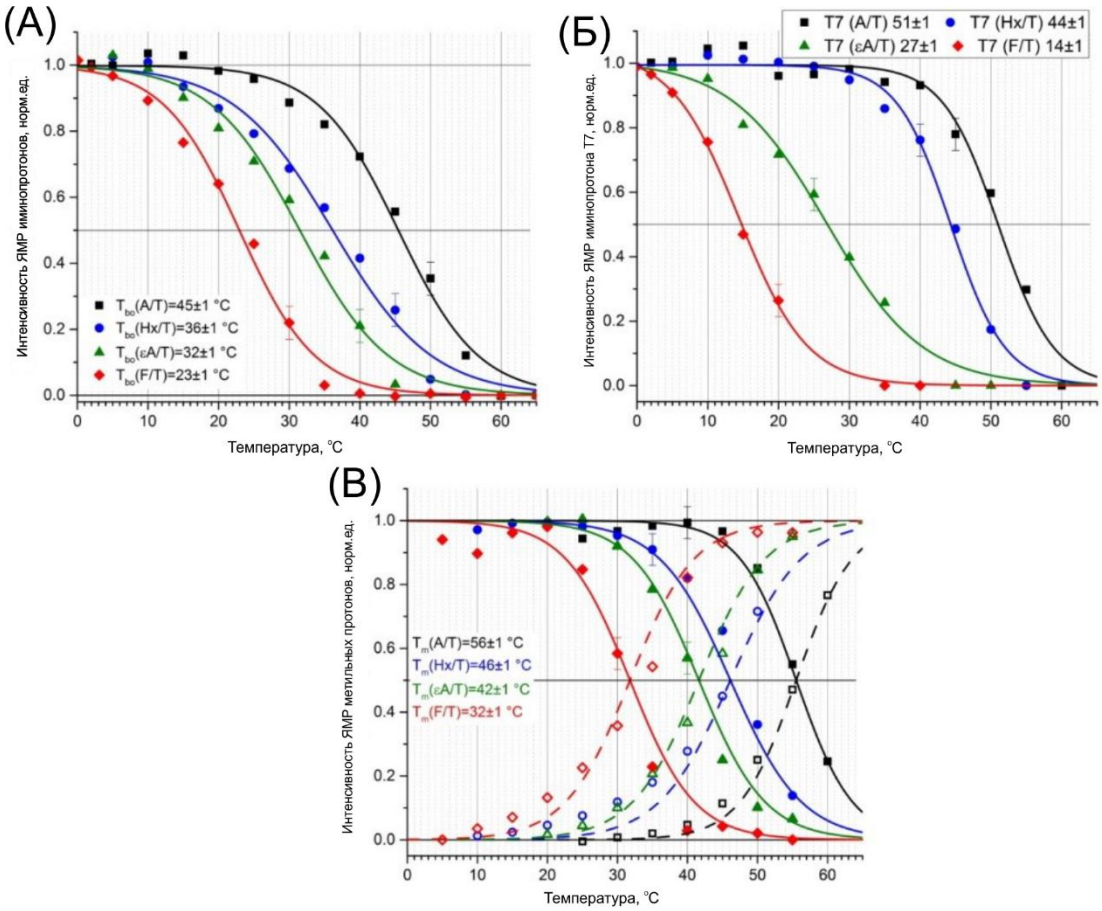


Рисунок 57. Температурные зависимости интенсивностей сигналов иминопротонов и необменивающихся протонов метильных групп для A/T, Hx/T, εA/T и F/T дуплексов. (А) Температурная зависимость суммы всех интенсивностей сигналов иминопротонов. (Б) Температурная зависимость интенсивности сигналов иминопротонов, образующих водородную связь с поврежденным основанием. (В) Температурная зависимость суммы интенсивностей сигналов необменивающихся метильных протонов в дуплексах (сплошные символы), а также в соответствующих одноцепочечных олигонуклеотидах (открытые символы). Для определения температуры плавления (T_m) всего дуплекса данные для каждого дуплекса (сплошные линии) и для ее одноцепочечного олигонуклеотида (пунктирные линии) были снабжены общим набором подгоночных параметров для модели, описанной в разделе 2.1.4.

3.5.1. Обмен протонов с молекулами воды.

В двойных спиралях ДНК иминопротоны расположены во внутренней части структуры, где они удерживаются водородными связями, и не доступны для контакта с молекулами растворителя. Их обмен протонами с растворителем происходит через самопроизвольное открытие пары оснований на миллисекундной временной шкале, при котором основание, несущее иминопротон, переходит из своего нативного положения внутри спирали в открытое состояние вне спирали. В открытом состоянии, иминопротон доступен для контактов с водой и другими акцепторами протонов, с которыми он может обмениваться [174, 175]. Кинетические параметры этой реакции открытия экспериментально определяются из зависимости скорости реакции (k_{ex}) от концентрации

акцептора протонов. В настоящей работе был использован аммиак NH_3 в качестве акцептора иминопротонов. Механизм влияния аммиака на скорость обмена протонов с молекулами воды объяснен на рисунке 63. Теоретические основы метода можно найти в [122]. Основная идея состоит в том, чтобы инвертировать поляризацию воды с помощью селективного импульса, а спустя переменную задержку τ перевернуть намагниченность воды обратно, а затем записать FID (более подробно последовательность описана в разделе 2.1.4)

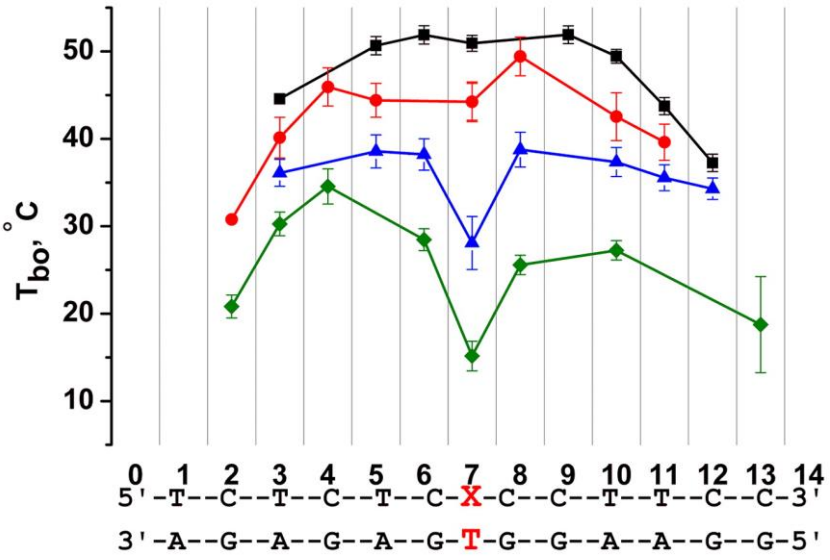


Рисунок 58. Температуры открытия пар оснований (T_{bo}) для отдельных пар в каноническом тридекамерном дуплексев котором в позиции 7 находится пара A/T (черные квадраты), в позиции 7 пара Hx/T (красные кружки), в позиции 7 пара εA/T (синие треугольники) и в в позиции 7 пара F/T (зеленые ромбы) дуплексов.

Некоторые характерные спектры подобной кинетики представлены на рисунке 64. С помощью этого метода были измерены скорости обмена отдельных иминопротонов и были определены константы равновесия для открытия каждой пары оснований $K_X = k^{bo}/k^{bcl}$ (см. таблицу 9 и рисунок 62). Анализ спектров ЯМР при различных задержках τ (см. рисунок 64), а также при различных [NH_3] (см. рисунок 59) позволяет получать кинетики обмена из всех отнесенных протонов (пример представлен на рисунке 60). Линейное приближение зависимости k^i_{ex} от концентрации активного катализатора аммиака [NH_3] дало значение константы равновесия для процессов открытия пар оснований K^i_X (см. таблицу 9 и рисунок 62).

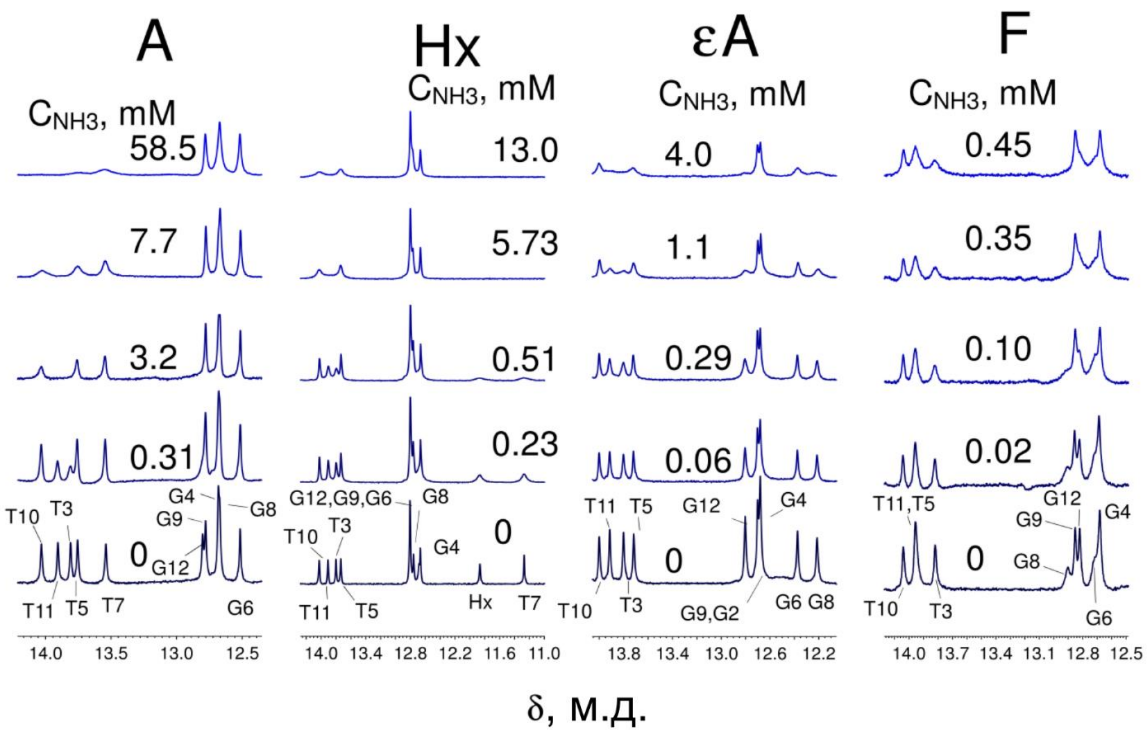


Рисунок 59. Области, содержащие сигналы иминопротонов, спектров ^{1}H ЯМР дуплексов A/T, Hx/T, εA/T F/T при различных концентрациях NH_3.

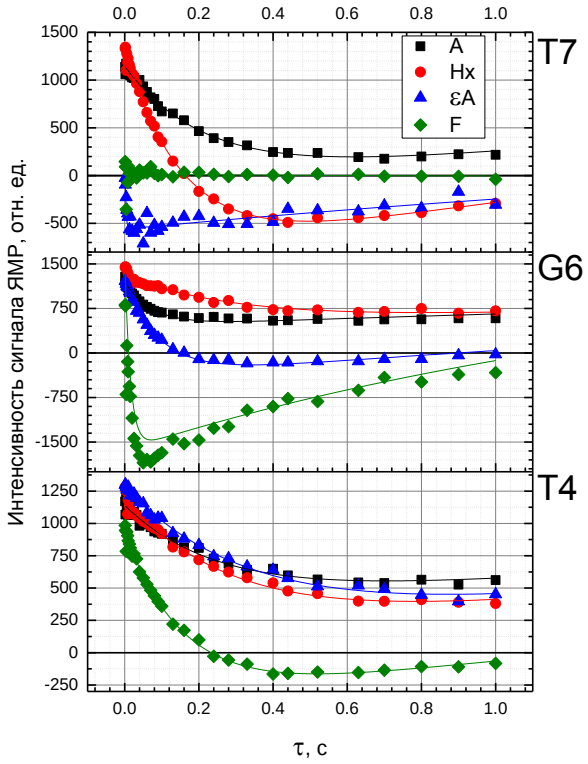


Рисунок 60. Кинетики изменения интенсивности сигналов иминопротонов в различных дуплексах при $[NH_3] = 0$. Кинетики для иминопротонов тимидина T7, расположенного в дуплексе напротив повреждённого основания, а также протона G6, сильно изменяются при изменении состава дуплекса, что указывает на различие констант равновесия открытия. Для удаленных от центра иминопротонов тимидина T4 для дуплексов с X = A, Hx, εA кинетические данные практически совпадают, но зато сильно ускоряются в F-дуплексе.

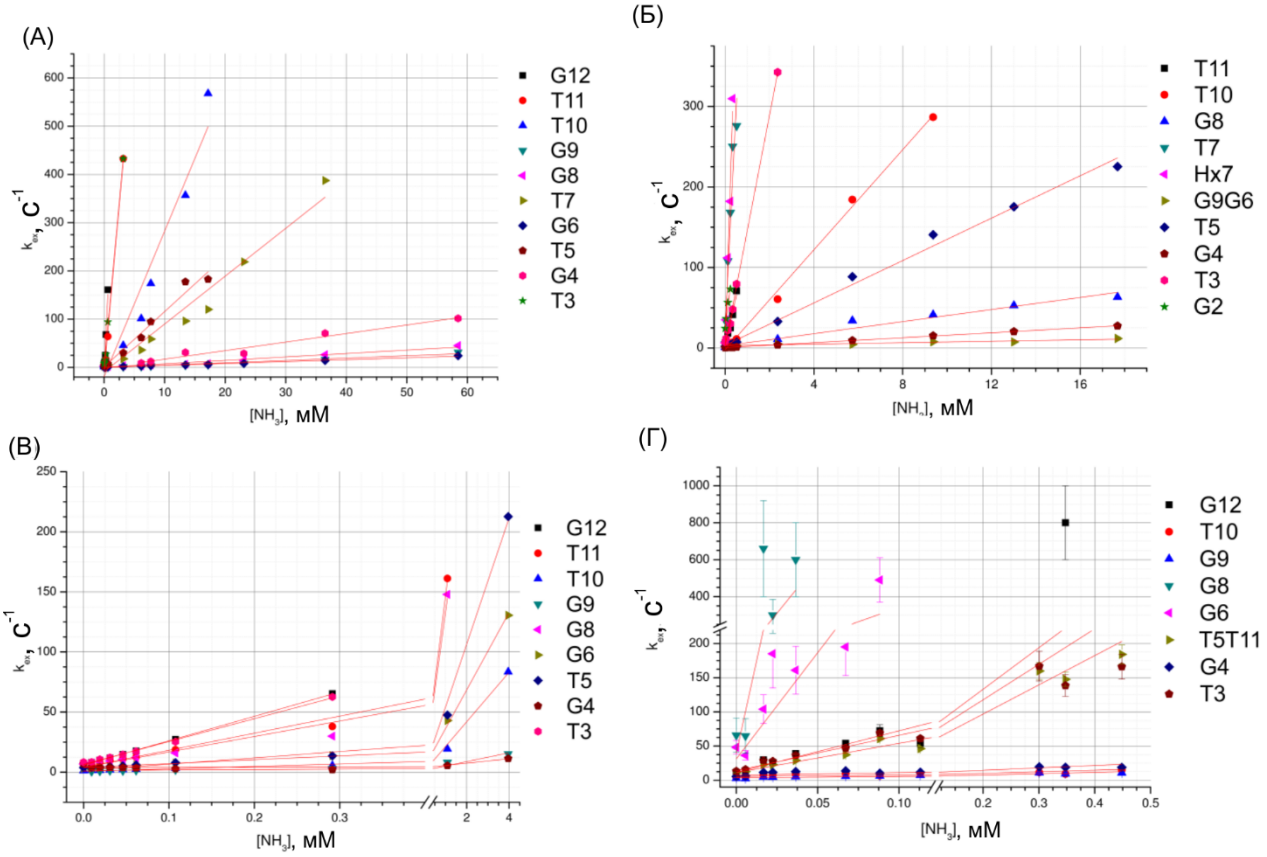


Рисунок 61. Зависимость k_{ex} от концентрации катализатора [NH_3] для дуплексов A/T (А), Hx/T (Б), εA/T (В) и F/T (Г).

В каноническом дуплексе A/T величины констант K^i_A уменьшаются по направлению от «обтрепанных» концов дуплекса к центру, таким образом, что центральные пары оснований являются наиболее стабильными с $K_X \sim (4 \div 750) \times 10^{-7}$. В противоположность этому, раскрытие поврежденной пары оснований является гораздо более простым процессом с бóльшими константами равновесия. Для F/T пары были определены только скорости обмена протонов и константы равновесия выворачивания для пар оснований 5'- и 3'-соседей поврежденного сайта, которые были выше, чем соответствующие константы для Hx- и εA-содержащих дуплексов. Следовательно, можно сделать вывод, что константы равновесия K^7_F для F/T-лиганда выше, чем 10^{-2} (Таблица 9). Эти величины значительно больше, чем даже для слабосвязанной предпоследней пары оснований. На рисунке 62 показана относительная устойчивость пар оснований в дуплексах F/T, Hx/T и εA/T. Эти данные указывают на то, что модифицированные и соседние к ним пары оснований характеризуются более высокими значениями констант равновесия процесса выворачивания отдельных нуклеотидов.

Таблица 9. Константы равновесия для процессов выворачивания отдельных пар оснований в A/T, Hx/T, εA/T и F/T дуплексов.

Номер пары оснований в структуре	Равновесные константы процессов выворачивания оснований $K_X = k^{flip}/k^{unflip}$			
	X = A	X = Hx	X = εA	X = F
2	Н/Д*	$(2.3 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	Н/Д	Н/Д
3	$(2 \pm 0.4) \times 10^{-4}$	$(2.9 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$(4.2 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	$(1.30 \pm 0.03) \times 10^{-3}$
4	$(1.4 \pm 0.5) \times 10^{-6}$	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^{-6}$	$(1.4 \pm 0.4) \times 10^{-6}$	$(3.2 \pm 0.1) \times 10^{-5}$
5	$(2.2 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	$(2.9 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	$(9.6 \pm 0.6) \times 10^{-5}$	Н/Д
6	$(3.3 \pm 0.3) \times 10^{-7}$	$(3.9 \pm 0.8) \times 10^{-7}$	$(3.4 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	$(2.8 \pm 0.5) \times 10^{-3}$
7	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^{-5}$	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	$(2.0 \pm 0.8) \times 10^{-2}$	Н/П**
8	$(3.6 \pm 0.8) \times 10^{-7}$	$(3.8 \pm 0.3) \times 10^{-6}$	$(7.5 \pm 0.7) \times 10^{-5}$	$(1.0 \pm 0.3) \times 10^{-2}$
9	$(3.0 \pm 0.3) \times 10^{-7}$	$(3.9 \pm 0.8) \times 10^{-7}$	$(3.5 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(1.8 \pm 0.04) \times 10^{-5}$
10	$(3.1 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	$(4.6 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	$(4.2 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	$(5.7 \pm 0.3) \times 1\ 0^{-5}$
11	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$(2.4 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$(2.8 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	Н/Д
12	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	Н/Д	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	$(5.5 \pm 0.3) \times 10^{-4}$

* Н/Д, не определен

** Н/П, неприменимо

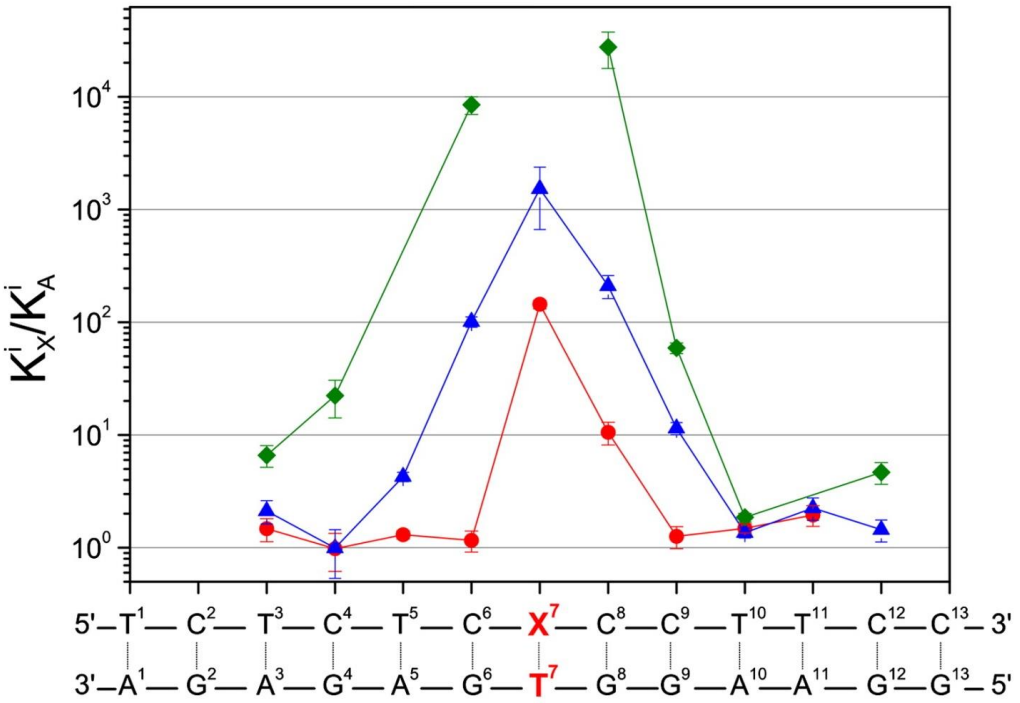


Рисунок 62. Отношение K^i_X/K^i_A, где K^i_X – сайт-специфичные константы равновесия спонтанного процесса выворачивания i-й пары оснований в поврежденных дуплексах, а K^i_A – аналогичная величина для A/T дуплекса (X = F, зеленые ромбы; X = εA, синие треугольники; X = Hx, красные кружки).

$$\mathbf{H}_2\mathrm{O} + \mathrm{NH}_4^+ + \mathrm{M}(\,)\mathrm{L}^- \leftrightarrow \mathrm{H}_2\mathrm{O} + \mathrm{N}\mathbf{H}_4^+ + \mathrm{M}(\,)\mathrm{L}^- \leftrightarrow \mathrm{H}_2\mathrm{O} + \mathrm{NH}_3 + \mathrm{M}(\,)\mathrm{L}\text{–}\mathbf{H}$$
$$\leftrightarrow \mathrm{H}_2\mathrm{O} + \mathrm{NH}_3 + (\mathrm{M} \cdots \mathbf{H}\text{–}\,\mathrm{L})$$

Рисунок 63. Кинетическая схема катализируемого аммиаком переноса отрицательной поляризации протонов воды на протоны иминогруппы для вывернутой пары оснований.

Примечание: Здесь M () L^- и M()L-H означают дуплексы ДНК с вывернутой наружу i-й парой оснований из M и L нуклеотидов с депротонированной и протонированной иминогруппой основания L, соответственно; (M ••• HL) означает невывернутый дуплекс ДНК. Жирным шрифтом **H** обозначены отрицательно поляризованные протоны.

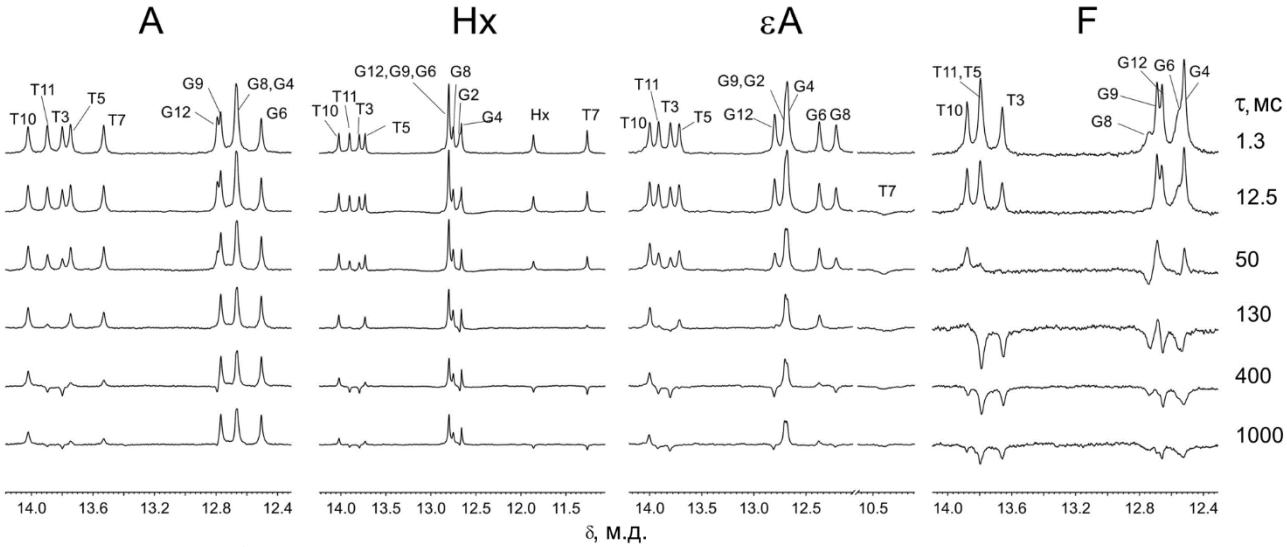


Рисунок 64. ^{1}H ЯМР-спектры дуплексов ДНК при различных значениях τ (показана только область иминопротонов) после инверсии сигнала воды. Для получения более подробной информации см. раздел 1.5.

3.5.2. Связь устойчивости дуплекса с механизмом репарации ферментом AAG.

При участии автора в 2017 году была опубликована статья [130], в которой было получено кинетическое описание процесса взаимодействия фермента AAG с рядом ДНК дуплексов. Исследование механизма было проведено двумя комплементарными методами: методом остановленной струи с наблюдением интенсивности флуоресценции различных меток, и измерение концентрации продуктов методом гель-электрофореза.

Полученные данные можно обобщить схемой, представленной на рисунке 65.

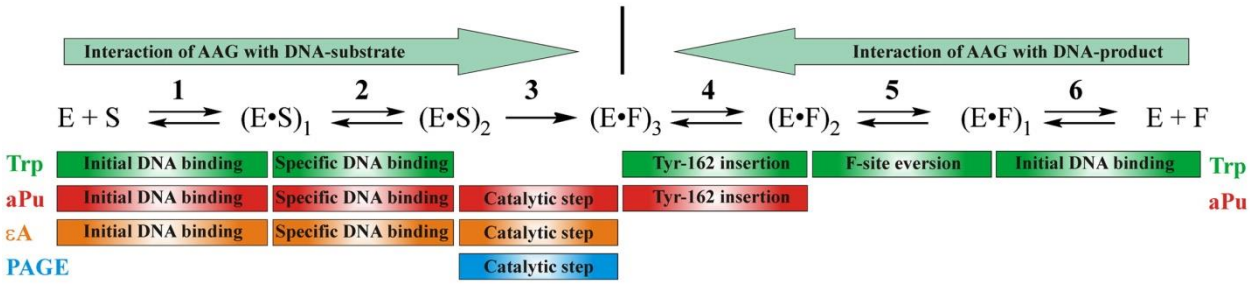


Рисунок 65. Общая кинетическая схема стадий, обнаруженных различными флуоресцентными зондами в ходе взаимодействия AAG с ДНК. Шаг 1 обнаружен по флуоресценции Trp, aPu и εA и характеризует начальное связывание ДНК; шаг 2 обнаружен Trp, aPu и εA и характеризует выворачивание поврежденного основания их спирали ДНК; шаг 3 обнаружен по флуоресценции aPu и εA флуоресценции и непосредственно контролировался методом PAGE продуктов реакции – это каталитический гидролиз N-гликозидной связи; шаг 4 обнаружен по флуоресценции Trp и aPu и характеризует введение Tyr-162 в ДНК; шаг 5 детектируется по флуоресценции Trp и характеризует выворачивание F-сайта из спирали ДНК; шаг 6 обнаружен по флуоресценции Trp и характеризует связывание ДНК-продукта с AAG. Примечание: E означает фермент AAG; S = ДНК-субстрат; F= F/T – дуплекс с удаленным азотистым основанием; $(E•S)_1$ и $(E•S)_2$ разные фермент-субстратные комплексы; $(E • F)_n$ = различные фермент/субстратные комплексы. Изображение и описание эксперимента взяты из [130].

Эффективность удаления поврежденных оснований с помощью AAG зависит от эффективности формирования каталитически активного комплекса и скорости стадии химической реакции. Из данных ЯМР по термической стабильности модифицированных пар оснований (см. рисунок 58), а также скорости спонтанного выворачивания оснований (см. рисунок 62), было показано, что модифицированные нуклеотиды дестабилизируют дуплекс в порядке F/T> εA/T > Hx/T. Оказалось, что параметры второй стадии связывания в предложенных флуоресцентных кинетических схемах непосредственно коррелируют со стабильностью поврежденных пар оснований (рисунок 62). Это означает, что выворачивание модифицированного основания, Hx или εA, из двойной спирали в активный центр AAG зависит от скорости спонтанного раскрытия и от термической стабильности пар оснований. Кроме того, эти результаты противоречат гипотезе о том, что механизм поиска поврежденных оснований ДНК-гликозилазами состоит в узнавании спонтанно вывернутых оснований. Выворачивание F-сайта из дуплекса происходит примерно в два и в четыре раза быстрее, чем выворачивание оснований εA и Hx, соответственно. Кроме того, F-сайт и основание εA возвращаются обратно в дуплекс примерно в четыре раза медленнее, чем Hx что указывает на более благоприятное внеспиральное состояние F-сайта и основания εA по сравнению с основанием Hx. Эти данные дают неоспоримые доказательства, что стабильность поврежденной пары оснований является одним из решающих факторов, определяющих эффективное образование каталитического комплекса.

В то же время, каталитические константы скорости для εA/T и Hx/T субстратов, не коррелируют со стабильностью поврежденных пар оснований. И флуоресцентный метод, и метод контроля концентрации продукта по данным PAGE показывают скорость превращения содержащего Hx субстрата на два порядка выше, чем у εA-субстрата, в отличие от 87-, 10- и 20-ти раз меньших значений констант равновесия K_X раскрытия для трех центральных пар оснований C6/G6, X7/T7, и C8/G8, соответственно (рисунок 62). Действительно, недавно опубликованная [176] оценка субстрат-селективности AAG методом молекулярной динамики показала, что, несмотря на то, что εA и Hx связываются с AAG схожим образом, тонкие различия во взаимодействиях с активным центром из-за различного нуклеотидного состава играют определенную роль в определении относительной силы связывания и каталитической эффективности.

3.6. Совпадающие сигналы в спектрах в жидкостном и твердофазном ^{1}H-фото-ХПЯ-ЯМР спектрах циклогексанона

В этом разделе описываются первые зарегистрированые ^{1}H фото-ХПЯ эффекты в твердом теле. Эффект ХПЯ наблюдался в замороженном растворе циклогексанона в 1,4-диоксане-d_8 при вращении образца под магическим углом и непрерывном облучении полным спектром ксеноновой дуговой лампы. Спектры показывают близкое сходство с ^{1}H-жидкостного фото-ХПЯ-ЯМР.

3.6.1. ХПЯ в твердых телах

Фотохимически индуцированная динамическая ядерная поляризация (фото-ХПЯ) проявляется в ЯМР-спектроскопии как аномальные интенсивности ЯМР сигналов диамагнитных продуктов реакций радикальных пар [177]. Это явление наблюдалось в газах [178], жидкостях [6] и твердых телах [179]. В газах и жидкостях фото-ХПЯ хорошо объясняется механизмом радикальных пар [180-182]. С недавнего времени, концепции пересечения и антипересечения уровней применяются [183-185] для рационализации фото-ХПЯ в жидкой фазе. Типичные системы, в которых наблюдается фото-ХПЯ в жидком состоянии, представляют собой циклические кетоны. Также фото-ХПЯ в жидкости возникает при фотоокислении различных тушителей (аминокислот, алифатических аминов) реакционноспособными триплетными состояниями фотосенсибилизаторов (производными флавина и бензофенона, 2,2-дипиридилом) [5, 6, 186].

Для твердотельного фото-ХПЯ эффекта [187-190] рассматриваются три независимых механизма: электрон-электрон-ядерный трехспиновый механизм, при котором интегральная ядерная поляризация создается в спин-коррелированной радикальной паре (СКРП) из-за действия как анизотропного сверхтонкого взаимодействия, так и взаимодействия между двумя электронными спинами [191]. Во втором случае, в механизме дифференциального распада, интегральная фото-ХПЯ вызвана анизотропной сверхтонкой константой без явного требования электрон-электронного взаимодействия если СКРП имеет различны времена жизни в синглетном и триплетном состоянии [192]. Кроме того выделяют ещё третий механизм, а именно механизм дифференциальной релаксации, который называется «циклическими реакциями» в фото-ХПЯ в жидком состоянии, основанный на быстрой и полной релаксации ядерной поляризации на доноре в его молекулярном триплетном состоянии, а поляризация на синглетной ветви остается неизменной [193, 194]. Недавно Иванов К.Л. и соавторы предложили объединяющую концепцию, позволяющую интегрировать различные вклады и основанную на пересечениях уровней и антипересечениях [183]. Теоретическое моделирование основано

на экспериментах с временным разрешением [195-197] и экспериментах с быстрым переключением магнитного поля [189, 198, 199].

До сих пор наблюдение твердотельного фото-ХПЯ было ограниченно ядрами ^{13}C и ^{15}N. Эффект наблюдался во многих фотосинтетических центрах [200-204]. Наблюдение твердотельного фото-ХПЯ эффекта возможно также с помощью жидкофазного ЯМР в фотосинтезирующих мембранах без замораживания, так как структура мембраны обеспечивает достаточную ориентацию на шкале времени ЯМР [205]. Кроме того, для мутантного C57S домена фототропина LOV1 (LOV = Light-Oxygen-Voltage) наблюдается твердотельный фото-ХПЯ эффект [206]. Для аналогичной системы фототропина LOV2 можно было наблюдать сигналы ^{13}C фото-ХПЯ в жидкой фазе [207], и можно предположить, что механизм усиления сигналов для этих двух систем идентичен.

Циклические алифатические кетоны могут выступить в роли молекулярных систем, дающих фото-ХПЯ как в жидкости, так и в твердом теле. Циклические кетоны, как известно [8], при ультрафиолетовом облучении в жидкостях дают интенсивные сигналы фото-ХПЯ. На рисунке 66 показана общепринятая схема реакции. После фотохимического расщепления связи (реакция Норриша первого типа [208]) протекающего через $^3n\pi^*$ состояние кетона, образуется алкил-ацильный бирадикал в триплетном состоянии. При интеркомбинационной конверсии полученный бирадикал может либо рекомбинировать в свое первоначальное состояние, либо образовать линейную молекулу.

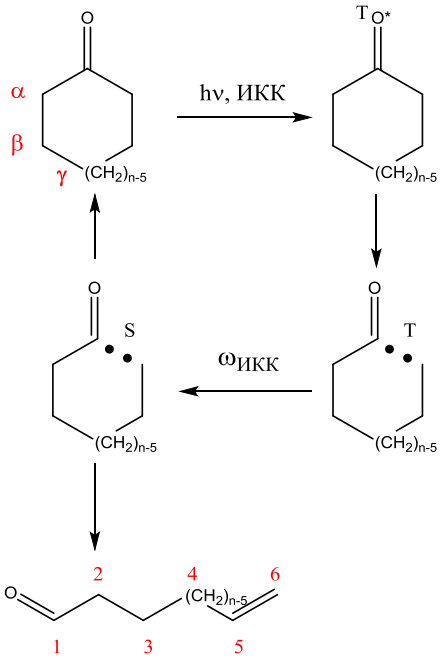


Рисунок 66. Схема фотореакции циклических кетонов (n=6÷15). ИКК – интеркомбинационная конверсия. Нумерация атомов приведена для циклогексанона.

Бирадикальный механизм образования фото-ХПЯ наиболее эффективно работает в магнитных полях, для которых выполняется соотношение B~|J|, где J – электронное

обменное взаимодействие в бирадикале. Этот механизм работает за счет совместного электрон-ядерного переворота спинов $T_- \alpha \leftrightarrow S \beta$ (T_- и S относятся к электронным спинам, α и β - к ядерному спину). Фотолиз циклических кетонов был использован для установления механизма возникновения фото-ХПЯ были измерены полевые зависимости фото-ХПЯ на ядрах ^1H и ^{13}C [8], и создана модель для расчета фото-ХПЯ для бирадикалов, связанных гибкой полиметиленовой цепью [209]. Кроме того, экспериментально и теоретически было изучено формирование фото-ХПЯ в газовой фазе [210], явление стимулированной ядерной поляризации [211], а также влияние температуры и вязкости растворителя на кинетику ХПЯ при геминальной рекомбинации бирадикалов в различных растворителях [212]. Наблюдались фото-ХПЯ эффекты в этих системах [213] в так называемых пластических кристаллах, т.е. в твердых телах, в которых высокая вращательная подвижность молекул гостя сохраняется. Таким образом, пластичные кристаллы представляют собой промежуточный случай между жидкостями и твердыми веществами, а реальный твердотельный фото-ХПЯ эффект, который возникает при фотореакции циклических кетонов, не был обнаружен до сих пор. В настоящей работе фотохимическая реакция циклического алифатического кетона циклогексанона была исследована с помощью фото-ХПЯ с быстрым вращением образца под магическим углом (MAS) в твердой матрице замороженного диоксана.

3.6.2. Спектры ХПЯ в циклогексане-d_{12}

Полевые зависимости интенсивности ХПЯ для бирадикалов имеют максимум в области Bmax ~ J [3], где J – величина обменного взаимодействия в бирадикале. Эта величина, в свою очередь, зависит от перекрывания орбиталей, несущих спиновую плотность, и имеет экспоненциальную зависимость от расстояния между радикальными центрами и, следовательно, от размера циклического кетона. Циклогексанон образует 1,6-бирадикал и для нескольких метилзамещенных циклогексанонов максимумы ХПЯ в жидком растворе были найдены в магнитном поле от 6 до 9 Тл [214], поэтому циклогексанон был выбран для тестирования ХПЯ в твердом теле в спектрометрах с магнитным полем 4.7 и 9.4 Тл (частота 200 и 400 МГц, соответственно).

На рисунке 67А показан сигнал фото-ХПЯ протона H1 5-гексеналя, обнаруженного в жидкости 90°-импульсом. 5-гексеналь возникает в растворе в виде наблюдаемого фотопродукта при облучении ксеноновой дуговой лампой раствора 0,14 М циклогексанона в циклогексане-d_{12} при комнатной температуре. Очевидно, что при 9,84 м.д. появляется эмиссионный (отрицательный) сигнал.

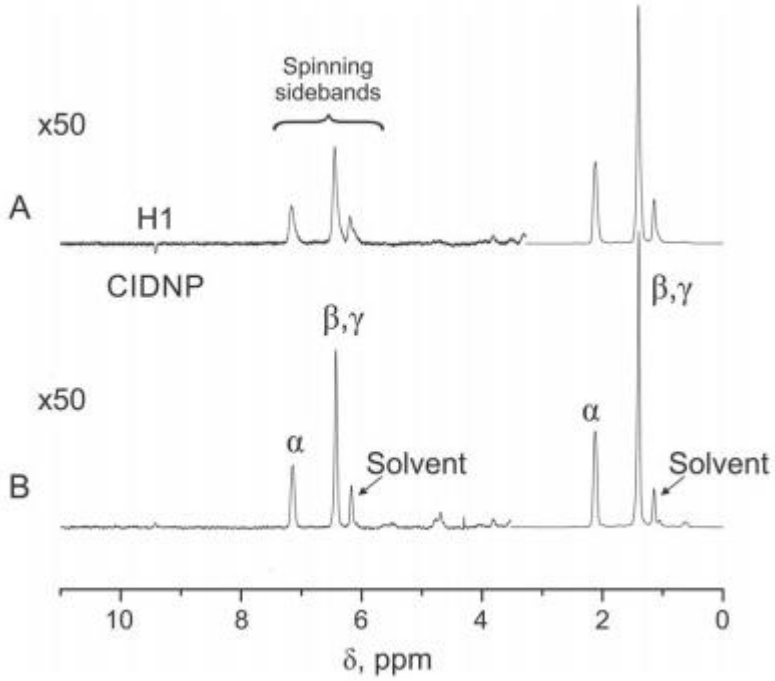


Рисунок 67. (A). Спектр ЯМР ^{1}H-ХПЯ в жидком растворе 0,14 М циклогексанона в циклогексане-d_{12} (C_6D_{12}) полученный при непрерывном облучении с помощью ксеноновой дуговой лампы и при медленном вращении под магическим углом (~ 1 кГц) при 4.7 Т. (B) такой же спектр, но без облучения. α, β, γ относятся к положениям в циклогексаноне, нумерация такая же, как на рисунке 67. Сигналы от 8 до 6 м.д. – сателлиты вращения, ни один из них не является поляризованным с помощью фото-ХПЯ.

Для подавления сигнала растворителя к образцу была приложена последовательность импульсов, показанная на рисунке 68. Последовательность импульсов состоит из (1) разрушения тепловой поляризации при помощи последовательности WALTZ-16, (2) последовательности точно заданных задержек (Δ_1 и Δ_2 на рис. 68) разделенных 180°-импульсом. Во время задержек, за счет релаксации намагниченность эволюционирует в определенной степени, затем намагниченность переворачивается, и релаксация начинается с той же точки, что и во время предыдущей задержки. При каждой второй задержке (Δ_1 + Δ_2 на рис. 68), шторка на лампе открывается, а фото-ХПЯ формируется и сохраняется в спиновой системе, при этом термическая поляризация суммируется в ноль. В результате стало возможным использовать максимальную доступную чувствительность приёмника сигнала ЯМР, несмотря на интенсивные сигналы термической поляризации протонов растворителя и циклического кетона. На рисунке 69А69 показан спектр, полученный с использованием последовательности импульсов для подавления термической поляризации для образца, содержащего раствор 0,14 М циклогексанона в циклогексане-d_{12}. Можно видеть, что сигналы от растворителя и протонов циклогексанона не полностью подавлены, но их интенсивность имеет тот же порядок величины, что и сигналы ХПЯ.

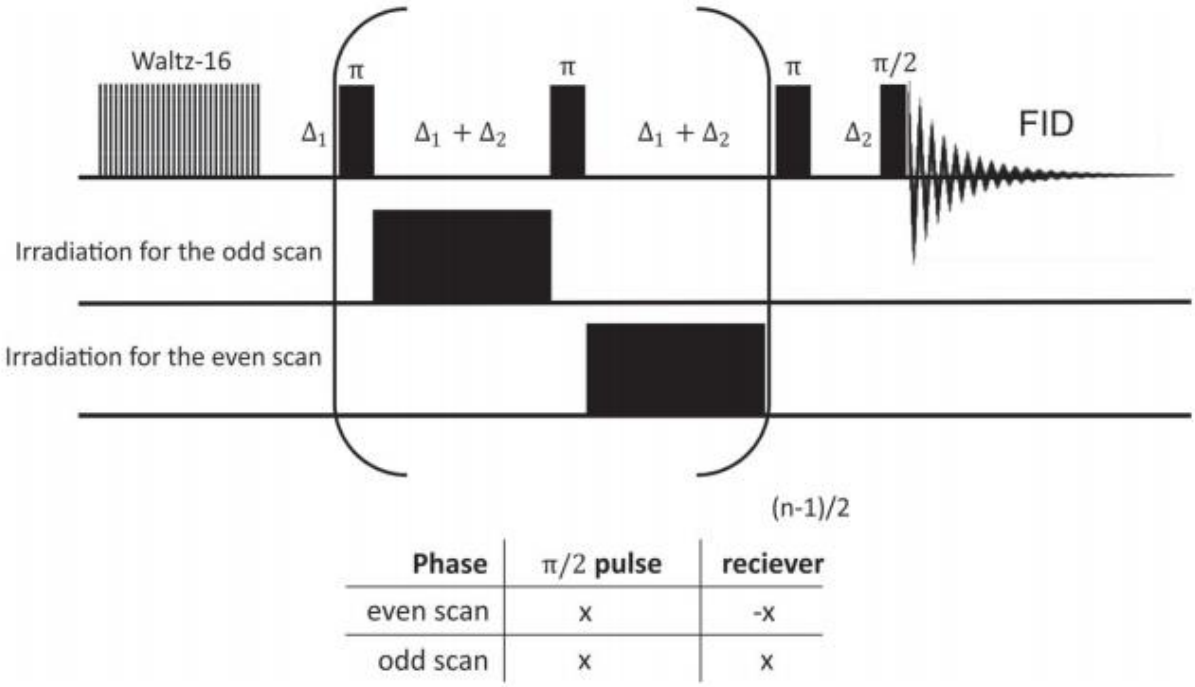


Рисунок 68**.** Оптимизированная последовательность импульсов для обнаружения фото-ХПЯ в жидком состоянии при облучении, контролируемой шторкой. T_{1min} - минимальное время релаксации среди всех протонов, возбуждаемых 90°-импульсом, $\Delta_1 = 0.02 * T_{1,min}$, $\Delta_2 = T_{1,min} * \ln [\Delta_2 - \exp (- \Delta_1 / T_{1,min})]$. В нашем случае $\Delta_1 \ll T_{1,min}$ и, следовательно, $\Delta_2 \approx \Delta_1$.

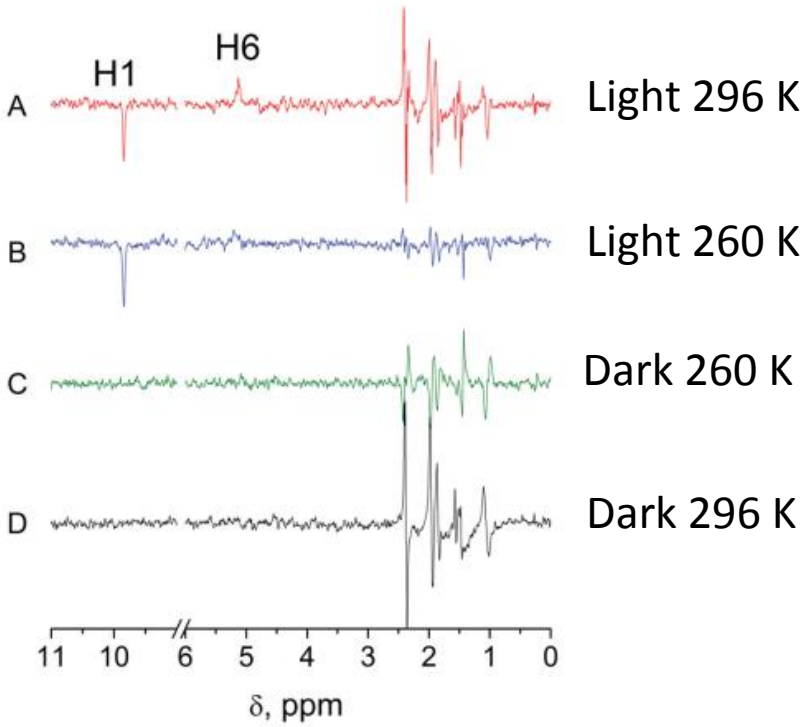


Рисунок 69. ^{1}H фото-ХПЯ спектры в жидкой фазе с подавлением растворителя. Раствор 0,14 М циклогексанона в циклогексане-d_{12} при медленном вращении под магическим углом при 9,4 Тл, полученные с периодическим облучением ксеноновой дуговой лампой (A, B) и без облучения (C, D). Спектры A и D – температура 296 К, частота вращения 1 кГц; B и C – 260 К, 4 кГц.

Различные знаки фото-ХПЯ для протонов H1 и H6 показывают, что при поле 9.4 Тл не только механизм S-T_-, но и механизм S-T_0 вызывает триплет-синглетную конверсию. Для S-T_0 знаки поляризации согласуются с правилами Каптейна [10], эти правила определяют знак поляризации как знак произведения, содержащего Δg (разность g-факторов для двух радикалов в радикальной паре), константу сверхтонкого взаимодействия и два параметра, кодирующих мультиплетность предшественника и продукта. Для H1 и H6, все указанные параметры одинаковы, кроме знака константы СТВ. В качестве оценки можно использовать константы СТВ, полученные в этиловом радикале: 2,7 мТл для H1 и H5, и -2,2 мТл для H6, что приводит к разным знакам поляризации в продуктах. Хотя H5 также имеет отличную от нуля константу СТВ, его поляризация в диамагнитных продуктах затухает за счет кросс-релаксации с сильно связанными винильными протонами [215].

Спектральные измерения также выполнялись ниже точки замерзания циклогексана (что составляет 279 K), а именно при T = 260 K (спектры B и C на рис. 70). Известно, что в этих условиях циклогексан находится в состоянии пластического кристалла, что означает сохранение незаторможенного вращения молекул циклогексана относительно неподвижных положений в кристаллической решетке. Эта приводит к относительно узким линиям в спектрах ^{1}H ЯМР: ширина линий составляет порядка нескольких десятков Гц без вращения образца [213], а в случае медленного вращения под магическим углом, как и в экспериментах, представленных в этой статье, ширина линии находится в диапазоне 2-3 Гц. Следует также отметить, что интенсивность сигналов фото-ХПЯ в замороженном и расплавленном циклогексане практически одинаковы. Это наблюдение указывает на то, что генерация поляризации, вероятно, будет следовать тем же механизмам в обоих случаях. Спектр C на рис. 70 был получен без облучения. Отсутствие поляризованных сигналов показывает, что обсуждаемые сигналы протонов H1 и H6 действительно индуцированы светом.

3.6.3. Спектр ХПЯ в твердой матрице

Если мы хотим измерить спектр ЯМР в реальной твердой матрице, имеющей кристаллическую структуру с фиксированной ориентацией молекул, растворитель должен быть изменен. Выбор растворителя был ограничен минимальной достижимой температурой (250 K), создаваемой высоким потоком азота для быстрого вращения образца под магическим углом.

Именно по этой причине был выбран 1,4-диоксан-d_8 (точка замерзания 284 K) в качестве растворителя. Согласно кристаллографическим данным [216], сразу же после кристаллизации при температуре 284 K, этот растворитель образует кристаллическую фазу. Для начала, эксперимент для наблюдения сигналов фото-ХПЯ проводился без охлаждения

образца (рис. 71, спектр B). Можно видеть, что сигналы ХПЯ протонов H1 и H6 имеют меньшую интенсивность по сравнению с аналогичным экспериментом (рис. 70, спектр A) в дейтерированном циклогексане.

После успешного наблюдения сигналов фото-ХПЯ в жидком состоянии были проведены эксперименты по измерению фото-ХПЯ в замороженном растворе (рисунок 72). Тот факт, что замороженный диоксан является кристаллическим твердым веществом, подтверждается ширинами линий в статическом спектре ^{1}H-ЯМР замороженного раствора: ширина линий имеет порядок 1 кГц (рис. 72, спектр A), тогда как в случае пластических кристаллов она составляет несколько десятков Гц. Вращение под магическим углом эффективно сужает линии ЯМР, уменьшая ширину линий до ~100 Гц (рисунок 72, спектр B). В этих условиях, используя вышеупомянутую последовательность импульсов, которая работает достаточно хорошо, как для жидкого, так и для твердого состояния, было возможно впервые зарегистрировать сигналы твердотельной фото-ХПЯ ядер ^{1}H (полученный спектр показан на рисунке 72 как спектр E, то есть разность между спектром D, зарегистрированным при облучении образца и спектром C, записанным без облучения образца).

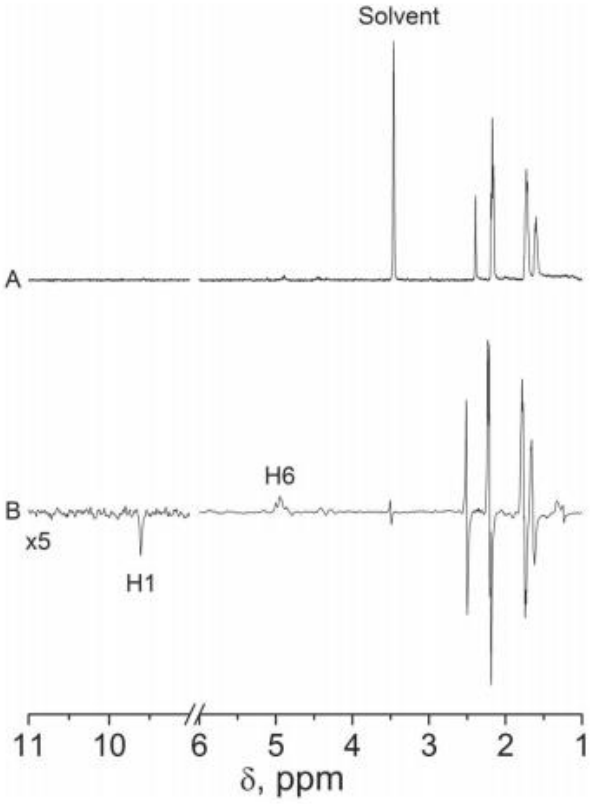


Рисунок 70. Спектры ЯМР раствора 0.14 M циклогексанона в 1,4-диоксане-d8 с медленным вращением под магическим углом (~ 1 кГц) при 9,4 Тл при 296 К. Спектр A представляет собой обычный спектр ^{1}H, а спектр B получен при облучении с использованием последовательности импульсов для подавления равновесной поляризации.

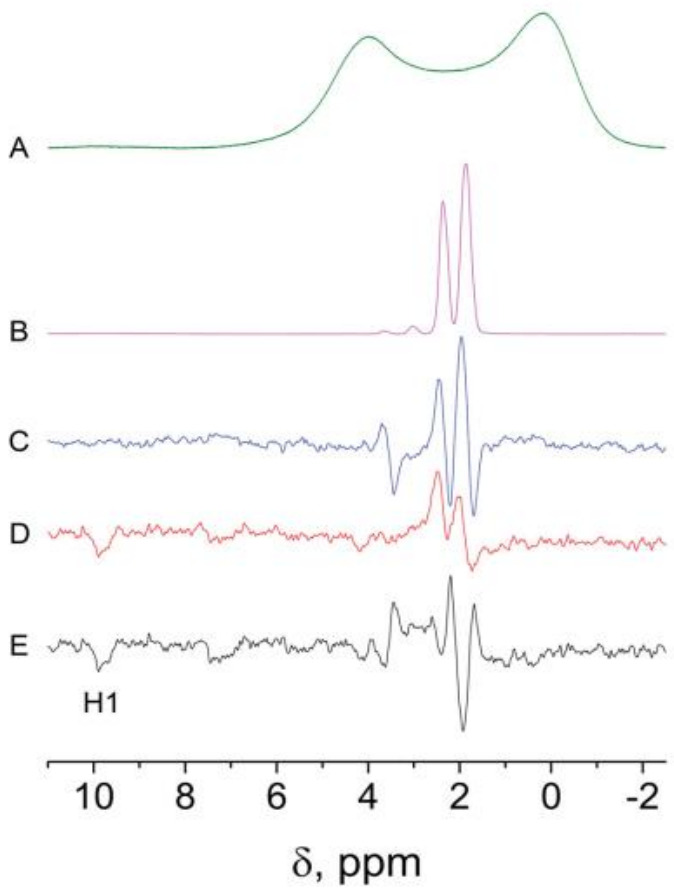


Рисунок 71. Твердотельные ЯМР-спектры замороженного раствора 0,14 М циклогексанона в 1,4-диоксане-d_8 в поле 9,4 Тл. Спектр A: ^{1}H - ЯМР в твердом состоянии, спектр без вращения и без облучения. Спектр B: твердотельный ЯМР-спектр с вращением под магическим углом (8 кГц) и без облучения. Спектр C: твердотельный ЯМР-ВМУ (8 кГц), лампа выключена, последовательность инмульсов для регистрации ХПЯ. Спектр D: спектр твердотельной фото-ХПЯ, условия такие же, как и в спектре C, но лампа включена. Спектр E – это разница между спектрами D и C.

3.6.4. Заключение

Впервые зарегистрировано проявление твердотельного фото-ХПЯ эффекта на протонах. По-видимому, механизм такой же, как в жидких растворах, этот механизм был ранее объяснен Сагдеевым и соавторами [215]. Для этого механизма ранее выдвигалось предположение наличия динамики полиметиленовой цепи бирадикала [217], поэтому необходимо будет уточнить, является ли достаточной динамика в замороженной системе или роль динамики была переоценена в прошлом. Будущие полевые исследования фото-ХПЯ с использованием челночного устройства с ВМУ может позволить дополнительно исследовать роль динамики и обменного взаимодействия [33]. Также подобные исследования на других объектах в твердом состоянии, например, коллагенах могут помочь понять процессы, возникающие при травмах.

Основные результаты и выводы

1. Был обобщен подход к анализу геминальной ХПЯ, основанный на учете вклада в ^{1}H ХПЯ от трех радикальных пар на геминальной стадии, с его помощью в реакции ТСВР с гистидином и тирозином был уточнен механизм реакции на геминальной стадии – это перенос электрона, и перенос электрона, связанный с переносом протона на одну из карбоксильных групп. Формирование кетильного радикала в результате таутомерных переходов происходит на более длинной (микросекундной) временной шкале, что подтверждается данными ^{13}C ХПЯ.
2. Изучены полевые зависимости ХПЯ в фотореакции ТСВР с S-метил-L-цистеином (Cys(Me)) в нейтральном растворе (pH 7.1) и в фотореакции 4-СВР с трипептидом S- метилглутатионом в щелочном растворе (pH 11.2). Установлено формирование короткоживущих циклических радикалов с трехэлектронной двухцентровой связью между атомами серы и кислорода для которых определены g-факторы, g(Cys(Me)$^{\bullet}$)=2.0078±0.0001 и g(GS(Me)$^{\bullet}$)=2.0080±0.0001.
3. Показано влияние когерентного переноса поляризации в диамагнитных молекулах в экспериментах по измерению полевой зависимости ХПЯ для фотореакции 4-СВР и н-бутиламина и дисперсии релаксации протонов н-бутиламина.
4. Получены сайт-специфичных данные о константах равновесия между открытой и закрытой формами тридекамерных ДНК дуплексов указывающие, что на скорость репарации влияет не стабильность двойной спирали дуплекса, а скорость химических процессов гидролиза гликозидной связи.
5. Впервые была зарегистрирована ХПЯ ^{1}H в твердой матрице при облучении замороженного раствора циклогексанона в 1,4-диоксане-d_8 при вращении под магическим углом в поле 9.4 Тл.

Результаты диссертации были опубликованы в работах:

1. Panov M. S., Saprygina N. N., Morozova O. B., Kiryutin A. S., Grishin Y. A., Yurkovskaya A. V. Photooxidation of Histidine by 3,3',4,4'-Benzophenone Tetracarboxylic Acid in Aqueous Solution: Time-Resolved and Field-Dependent CIDNP Study // Applied Magnetic Resonance. – 2014. – V. 45, № 10. – P. 1019-1033.
2. Morozova O. B., Panov M. S., Fishman N. N., Yurkovskaya A. V. Electron transfer vs proton-coupled electron transfer as the mechanism of reaction between amino acids and triplet-excited benzophenones revealed by time-resolved CIDNP // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2018. – V. 20, № 32. – P. 21127-21135.
3. Kuznetsov N. A., Kiryutin A. S., Kuznetsova A. A., Panov M. S., Barsukova M. O., Yurkovskaya A. V., Fedorova O. S. The formation of catalytically competent enzyme-substrate complex is not a bottleneck in lesion excision by human alkyladenine DNA glycosylase // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. – 2017. – V. 35, № 5. – P. 950-967.
4. Panov M.S., Pravdivtsev A.N., Ivanov K.L., Yurkovskaya A.V., Vieth H.M., Coherent Polarization Transfer Effects Are Crucial for Interpreting Low-Field CIDNP Data //Applied Magnetic Resonance. – 2014 – V. 45 P. 893-900.
5. Panov M.S., Bielytskyi P., Gräsing D., Yurkovskaya A.V., Matysik J., Same spectral signature in liquid-state and solid-state 1H photoCIDNP NMR spectra of cyclohexanone// Molecular Physics – 2019. – V. 117, №19. – P.2756-2761
6. Morozova O. B., Panov M. S., Vieth H.-M., Yurkovskaya A. V. CIDNP study of sensitized photooxidation of S-methylcysteine and S-methylglutathione in aqueous solution // Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry. – 2016. – V. 321. – P. 90-98.

Список используемых сокращений

ХПЯ	Химическая поляризация ядер
ВР-ХПЯ	ХПЯ с временным разрешением
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
МТЦ	Международный томографический центр
РП	Радикальная пара
РЧ	Радиочастотный
TCBP	3,3’,4,4’-тетракарбоксибензофенон
4CBP	4-карбоксибензофенон
AAG	Алкиладенин ДНК гликозилаза человека
BER	Base Excision Repair (эксцизионная репарация оснований)
His	Гистидин
N-ac-His	N-ацетилгистидин
Cys	Цистеин
εA	1-N6-этеноаденин
Hx	Гипоксантин
A	Аденин
T	Тимин
G	Гуанин
C	Цитозин
ССИ или FID	Free Induction Decay (спад свободной индукции)
ЭПР	Электронный парамагнитный резонанс
СТВ	Сверхтонкое взаимодействие
AP-сайты	апурино-апиримидиновые участки
DFT	Density Functional Theory (теория функционала плотности)
TSP	3-(триметилсилил)-2,2,3,3-тетрадейтеропропионовая кислота
PCET	Proton Coupled Electron Transfer (связанный с протоном перенос электрона)

ZQC	Zero-Quantum Coherence (нуль-квантовая когерентность)
АПУ	Антипересечение уровней
CIDEP	Химически индуцированная поляризация электронов
ET	Electron Transfer (перенос электрона)
PT	Proton Transfer (перенос протона)
СКРП	Спин-коррелированная радикальная пара

Список литературы

1. Free Radicals in Biology and Medicine. / Halliwell B., Gutteridge J. M. C. – Fifth edition изд. – Oxford: Oxford University Press, 2015.

2. Cadet J., Davies K. J. A. Oxidative DNA damage & repair: An introduction // Free Radical Biology and Medicine. – 2017. – Т. 107, № Supplement C. – С. 2-12.

3. Spin polarization and magnetic effects in chemical reactions. / Salikhov K. M., Molin Y. N., Sagdeev R. Z., Buchachenko A. L. – Amsterdam: Elsevier, 1984.

4. Goez M. Elucidating organic reaction mechanisms using photo-CIDNP spectroscopy // Top. Curr. Chem. – 2012. – Т. 338. – С. 1-32.

5. Yurkovskaya A., Morozova O., Gescheidt G. Structures and Reactivity of Radicals Followed by Magnetic Resonance // Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and MaterialsJohn Wiley & Sons, Ltd, 2012.

6. Goez M. Photo-CIDNP spectroscopy // Annual Reports on NMR Spectroscopy. – 2009. – Т. 66. – С. 77-147.

7. Adrian F. J. Singlet-triplet splitting in diffusing radical pairs and the magnitude of chemically induced electron spin polarization // Journal of Chemical Physics. – 1972. – Т. 57, № 12. – С. 5107-13.

8. Kanter F. J. J. d., Sagdeev R. Z., Kaptein R. Magnetic field dependent 13C and 1H CIDNP from biradicals. The role of the hyperfine coupling constant // Chemical Physics Letters. – 1978. – Т. 58, № 3. – С. 334-339.

9. Ward H. R. Chemically induced dynamic nuclear polarization (CIDNP). I. Phenomenon, examples, and applications // Accounts of Chemical Research. – 1972. – Т. 5, № 1. – С. 18-24.

10. Kaptein R. Simple rules for chemically induced dynamic nuclear polarization // Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications. – 1971.10.1039/C29710000732 № 14. – С. 732-733.

11. Morozova O. B., Yurkovskaya A. V., Tsentalovich Y. P., Forbes M. D. E., Sagdeev R. Z. Time-Resolved CIDNP Study of Intramolecular Charge Transfer in the Dipeptide Tryptophan-Tyrosine // Journal of Physical Chemistry B. – 2002. – Т. 106, № 6. – С. 1455-1460.

12. Tsentalovich Y. P., Morozova O. B., Yurkovskaya A. V., Hore P. J. Kinetics and mechanism of the photochemical reaction of 2,2'-dipyridyl with tryptophan in water: Time-resolved CIDNP and laser flash photolysis study // Journal of Physical Chemistry A. – 1999. – Т. 103, № 27. – С. 5362-5368.

13. Morozova O. B., Korchak S. E., Sagdeev R. Z., Yurkovskaya A. V. Time-Resolved Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization Studies of Structure and Reactivity of Methionine Radical Cations in Aqueous Solution as a Function of pH // Journal of Physical Chemistry A. – 2005. – Т. 109, № 45. – С. 10459-10466.

14. Jonsson M., Wayner D. D. M., Lusztyk J. Redox and Acidity Properties of Alkyl- and Arylamine Radical Cations and the Corresponding Aminyl Radicals // The Journal of Physical Chemistry. – 1996. – Т. 100, № 44. – С. 17539-17543.

15. Vollenweider J. K., Fischer H. Absolute chemically induced nuclear polarizations and yields from geminate radical-pair reactions. A test of high-field radical-pair theories // Chemical Physics. – 1988. – Т. 124, № 3. – С. 333-45.

16. Morozova O. B., Ivanov K. L., Kiryutin A. S., Sagdeev R. Z., Köchling T., Vieth H.-M., Yurkovskaya A. V. Time-resolved CIDNP: an NMR way to determine the EPR parameters of elusive radicals // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2011. – Т. 13, № 14. – С. 6619-6627.

17. Kiryutin A. S., Morozova O. B., Kuhn L. T., Yurkovskaya A. V., Hore P. J. 1H and 13C Hyperfine Coupling Constants of the Tryptophanyl Cation Radical in Aqueous Solution from Microsecond Time-Resolved CIDNP // Journal of Physical Chemistry B. – 2007. – T. 111, № 38. – C. 11221-11227.

18. Koptyug I. V., Bagryanskaya E. G., Sagdeev R. Z. Observation of C-13 Snp during the Photolysis of Cyclododecanone in Solution // Chemical Physics Letters. – 1989. – T. 163, № 6. – C. 503-508.

19. Koptyug I. V., Bagryanskaya E. G., Grishin Y. A., Sagdeev R. Z. The Main Regularities of Snp Formation in Biradicals on the Photolysis of Cycloalkanones // Chemical Physics. – 1990. – T. 145, № 3. – C. 375-384.

20. Adrian F. J. Role of diffusion-controlled reaction in chemically induced nuclear-spin polarization. II. General theory and comparison with experiment // Journal of Chemical Physics. – 1971. – T. 54, № 9. – C. 3912-17.

21. Ivanov K. L., Lukzen N. N., Vieth H.-M., Grosse S., Yurkovskaya A. V., Sagdeev R. Z. Investigation of the magnetic field dependence of CIDNP in multinuclear radical pairs. 1. Photoreaction of histidine and comparison of model calculation with experimental data // Molecular Physics. – 2002. – T. 100, № 8. – C. 1197-1208.

22. Miesel K., Ivanov K. L., Yurkovskaya A. V., Vieth H.-M. Coherence transfer during field-cycling NMR experiments // Chemical Physics Letters. – 2006. – T. 425, № 1-3. – C. 71-76.

23. Lyon C. E., Lopez J. J., Cho B.-M., Hore P. J. Low field CIDNP of amino acids and proteins: characterization of transient radicals and NMR sensitivity enhancement // Molecular Physics. – 2002. – T. 100, № 8. – C. 1261-1269.

24. De Kanter F. J. J., Kaptein R. CIDNP transfer via nuclear dipolar relaxation and spin-spin coupling // Chemical Physics Letters. – 1979. – T. 62, № 3. – C. 421-6.

25. Ivanov K. L., Yurkovskaya A. V., Vieth H.-M. Coherent transfer of hyperpolarization in coupled spin systems at variable magnetic field // Journal of Chemical Physics. – 2008. – T. 128, № 15. – C. 154701(1-13).

26. Pravdivtsev A. N., Yurkovskaya A. V., Kaptein R., Miesel K., Vieth H.-M., Ivanov K. L. Exploiting level anti-crossings for efficient and selective transfer of hyperpolarization in coupled nuclear spin systems // Physical Chemistry Chemical Physics –2013. – T. 15, № 35. – C. 14660-9.

27. Chichinin A. I. Comment on “The Landau–Zener Formula” // The Journal of Physical Chemistry B. – 2013. – T. 117, № 19. – C. 6018-6018.

28. Korchak S. E., Kiryutin A. S., Ivanov K. L., Yurkovskaya A. V., Grishin Y. A., Zimmermann H., Vieth H.-M. Low-Field, Time-Resolved Dynamic Nuclear Polarization with Field Cycling and High-Resolution NMR Detection // Applied Magnetic Resonance –2010. – T. 37. – C. 515–537.

29. Sørensen O. W., Eich G. W., Levitt M. H., Bodenhausen G., Ernst R. R. Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments // Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. – 1984. – T. 16. – C. 163-192.

30. Buljubasich L., Franzoni M. B., Spiess H. W., Münnemann K. Level anti-crossings in ParaHydrogen Induced Polarization experiments with Cs-symmetric molecules // Journal of magnetic resonance. – 2012. – T. 219. – C. 33-40.

31. Franzoni M. B., Buljubasich L., Spiess H. W., Münnemann K. Long-Lived 1H Singlet Spin States Originating from Para-Hydrogen in Cs-Symmetric Molecules Stored for Minutes in High Magnetic Fields // Journal of the American Chemical Society. – 2012. – T. 134, № 25. – C. 10393-10396.

32. Kiryutin A. S., Ivanov K. L., Yurkovskaya A. V., Kaptein R., Vieth H.-M. Transfer of Parahydrogen Induced Polarization in Scalar Coupled Systems at Variable Magnetic Field // Zeitschrift für Physikalische Chemie. – 2012. – T. 226, № 11-12. – C. 1343-1362.

33. Kiryutin A. S., Korchak S. E., Ivanov K. L., Yurkovskaya A. V., Vieth H.-M. Creating Long-Lived Spin States at Variable Magnetic Field by Means of Photochemically Induced Dynamic Nuclear Polarization // Journal of Physical Chemistry Letters. – 2012. – Т. 3, № 13. – С. 1814-1819.

34. Korchak S. E., Ivanov K. L., Pravdivtsev A. N., Yurkovskaya A. V., Kaptein R., Vieth H.-M. High resolution NMR study of T_1 magnetic relaxation dispersion. III. Influence of spin 1/2 hetero-nuclei on spin relaxation and polarization transfer among strongly coupled protons // Journal of Chemical Physics. – 2012. – Т. 137, № 9. – С. 094503.

35. Säuberlich J., Brede O., Beckert D. Photoionization of Benzophenone Carboxylic Acids in Aqueous Solution. A FT EPR and Optical Spectroscopy Study of Radical Cation Decay // Journal of Physical Chemistry. – 1996. – Т. 100, № 46. – С. 18101-18107.

36. Goez M., Rozwadowski J., Marciniak B. Photoinduced Electron Transfer, Decarboxylation, and Radical Fragmentation of Cysteine Derivatives: A Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization Study // Journal of the American Chemical Society. – 1996. – Т. 118, № 12. – С. 2882-2891.

37. Inbar S., Linschitz H., Cohen S. G. Quenching, radical formation, and disproportionation in the photoreduction of 4-carboxybenzophenone by 4-carboxybenzhydrol, hydrazine, and hydrazinium ion // Journal of the American Chemical Society. – 1981. – Т. 103, № 24. – С. 7323-8.

38. Principles of molecular photochemistry: an introduction. / Turro N. J., Ramamurthy V., Scaiano J. C.: University science books, 2009.

39. Parnachev A. P., Bagryanskaya E. G., Sagdeev R. Z. A Study of Benzophenone Photolysis in SDS Micelles in the Presence of 2,4,6-Tri-tert-butylphenol: Distinctive Features of SNP in Radical Pairs with a Natural Abundance of 13C Nuclei // Journal of Physical Chemistry A. – 1997. – Т. 101, № 21. – С. 3855-3859.

40. Nguyen T. X., Kattnig D., Mansha A., Grampp G., Yurkovskaya A. V., Lukzen N. Kinetics of Photoinduced Electron Transfer between DNA Bases and Triplet 3,3 ',4,4 '-Benzophenone Tetracarboxylic Acid in Aqueous Solution of Different pH's: Proton-Coupled Electron Transfer? // Journal of Physical Chemistry A. – 2012. – Т. 116, № 44. – С. 10668-10675.

41. Säuberlich J., Beckert D. Photoionization of benzophenonecarboxylic acids in two-photon process. A Fourier transform EPR study // Journal of Physical Chemistry. – 1995. – Т. 99, № 33. – С. 12520-4.

42. Morozova O. B., Panov M. S., Fishman N. N., Yurkovskaya A. V. Electron transfer vs proton-coupled electron transfer as the mechanism of reaction between amino acids and triplet-excited benzophenones revealed by time-resolved CIDNP // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2018. – Т. 20, № 32. – С. 21127-21135.

43. Schneider F. Histidine in Enzyme Active Centers // Angewandte Chemie International Edition in English. – 1978. – Т. 17, № 8. – С. 583-592.

44. Edgcomb S. P., Murphy K. P. Variability in the pKa of histidine side-chains correlates with burial within proteins // Proteins: Structure, Function, and Genetics. – 2002. – Т. 49, № 1. – С. 1-6.

45. Harrison A. G. The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides // Mass Spectrometry Reviews. – 1997. – Т. 16, № 4. – С. 201-217.

46. Faraggi M., Klapper M. H., Dorfman L. M. Fast reaction kinetics of one-electron transfer in proteins. The histidyl radical. Mode of electron migration // Journal of Physical Chemistry. – 1978. – Т. 82, № 5. – С. 508-512.

47. Migliore A., Polizzi N. F., Therien M. J., Beratan D. N. Biochemistry and Theory of Proton-Coupled Electron Transfer // Chemical Reviews. – 2014. – Т. 114, № 7. – С. 3381-3465.

48. Chandran K., McCracken J., Peterson F. C., Antholine W. E., Volkman B. F., Kalyanaraman B. Oxidation of Histidine Residues in Copper−Zinc Superoxide Dismutase by Bicarbonate-Stimulated

Peroxidase and Thiol Oxidase Activities: Pulse EPR and NMR Studies // Biochemistry. – 2010. – T. 49, № 50. – C. 10616-10622.

49. Konovalova T. A., Kispert L. D., Van Tol J., Brunel L.-C. Multifrequency High-Field Electron Paramagnetic Resonance Characterization of the Peroxyl Radical Location in Horse Heart Myoglobin Oxidized by H2O2 // Journal of Physical Chemistry B. – 2004. – T. 108, № 31. – C. 11820-11826.

50. Yoon J., Herzik M. A., Winter M. B., Tran R., Olea C., Marletta M. A. Structure and Properties of a Bis-Histidyl Ligated Globin from Caenorhabditis elegans // Biochemistry. – 2010. – T. 49, № 27. – C. 5662-5670.

51. Kinoshita K., Kawata M., Ogura K.-i., Yamasaki A., Watanabe T., Komoto N., Hieda N., Yamanishi M., Tobimatsu T., Toraya T. Histidine-α143 Assists 1,2-Hydroxyl Group Migration and Protects Radical Intermediates in Coenzyme B12-Dependent Diol Dehydratase† // Biochemistry. – 2008. – T. 47, № 10. – C. 3162-3173.

52. Huvaere K., Skibsted L. H. Light-Induced Oxidation of Tryptophan and Histidine. Reactivity of Aromatic N-Heterocycles Toward Triplet-Excited Flavins // Journal of the American Chemical Society. – 2009. – T. 131, № 23. – C. 8049-8060.

53. Suzuki T., Okita T., Osanai Y., Ichimura T. Reaction Dynamics of Excited 2-(3-Benzoylphenyl)propionic Acid (Ketoprofen) with Histidine // Journal of Physical Chemistry B. – 2008. – T. 112, № 47. – C. 15212-15216.

54. Sibert R., Josowicz M., Porcelli F., Veglia G., Range K., Barry B. A. Proton-coupled electron transfer in a biomimetic peptide as a model of enzyme regulatory mechanisms // Journal of the American Chemical Society. – 2007. – T. 129, № 14. – C. 4393-400.

55. Bu Y., Cukier R. I. Structural character and energetics of tyrosyl radical formation by electron/proton transfers of a covalently linked histidine-tyrosine: a model for cytochrome C oxidase // Journal of Physical Chemistry B. – 2005. – T. 109, № 46. – C. 22013-26.

56. Cukier R. I., Nocera D. G. Proton-coupled electron transfer // Annual Review of Physical Chemistry. – 1998. – T. 49. – C. 337-369.

57. Uchida K., Kawakishi S. Ascorbate-mediated specific modification of histidine-containing peptides // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1989. – T. 37, № 4. – C. 897-901.

58. Lassman G., Erikson L. A., Himo F., Lendzian F., Lubitz W. Electronic structure of a transient histidine radical in liquid aqueous solution: EPR continuous-flow studies and density functional calculations // J. Phys. Chem. A. – 1999. – T. 103. – C. 1283-1290.

59. Lassmann G., Eriksson L. A., Lendzian F., Lubitz W. Structure of a Transient Neutral Histidine Radical in Solution: EPR Continuous-Flow Studies in a Ti3+/EDTA−Fenton System and Density Functional Calculations // The Journal of Physical Chemistry A. – 2000. – T. 104, № 40. – C. 9144-9152.

60. Tsentalovich Y. P., Morozova O. B., Yurkovskaya A. V., Hore P. J., Sagdeev R. Z. Time-Resolved CIDNP and Laser Flash Photolysis Study of the Photoreactions of N-Acetyl Histidine with 2,2'-Dipyridyl in Aqueous Solution // Journal of Physical Chemistry A. – 2000. – T. 104, № 30. – C. 6912-6916.

61. Ivanov K. L., Miesel K., Vieth H.-M., Yurkovskaya A. V., Sagdeev R. Z. 2D NMR nutation analysis of non-thermal polarization of coupled multi-spin systems // Zeitschrift fuer Physikalische Chemie. – 2003. – T. 217, № 12. – C. 1641-1659.

62. Samuni A., Neta P. Electron spin resonance study of the reaction of hydroxyl radicals with pyrrole, imidazole, and related compounds // Journal of Physical Chemistry. – 1973. – T. 77. – C. 1629-1635.

63. Mok K. H., Hore P. J. Photo-CIDNP NMR methods for studying protein folding // Methods (San Diego, CA, United States). – 2004. – T. 34, № 1. – C. 75-87.

64. Saprygina N. N., Morozova O. B., Grampp G., Yurkovskaya A. V. Effect of Amino Group Charge on the Photooxidation Kinetics of Aromatic Amino Acids // Journal of Physical Chemistry A. – 2014. – T. 118, № 2. – C. 339-349.

65. Morozova O. B., Yurkovskaya A. V., Tsentalovich Y. P., Forbes M. D. E., Hore P. J., Sagdeev R. Z. Time resolved CIDNP study of electron transfer reactions in proteins and model compounds // Molecular Physics. – 2002. – T. 100, № 8. – C. 1187-1195.

66. Kantorow M., Hawse J. R., Cowell T. L., Benhamed S., Pizarro G. O., Reddy V. N., Hejtmancik J. F. Methionine sulfoxide reductase A is important for lens cell viability and resistance to oxidative stress // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – T. 101, № 26. – C. 9654-9659.

67. Schöneich C. Redox Processes of Methionine Relevant to beta -Amyloid Oxidation and Alzheimer's Disease // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2002. – T. 397, № 2. – C. 370-376.

68. Morozova O. B., Kaptein R., Yurkovskaya A. V. Reduction of Guanosyl Radical by Cysteine and Cysteine-Glycine Studied by Time-Resolved CIDNP // Journal of Physical Chemistry B. – 2012. – T. 116, № 28. – C. 8058-8063.

69. Cilento G. Generation of electronically excited triplet species in biochemical systems // Pure and Applied Chemistry. – 1984. – T. 56, № 9. – C. 1179-1190.

70. Bobrowski K., Marciniak B., Hug G. L. 4-Carboxybenzophenone-sensitized photooxidation of sulfur-containing amino acids. Nanosecond laser flash photolysis and pulse radiolysis studies // Journal of the American Chemical Society. – 1992. – T. 114, № 26. – C. 10279-88.

71. Köchling T. CIDNP as a tool for investigating radical structures in biological systems; Free University of Berlin. – Berlin, 2011. – 173 c.

72. Morozova O. B., Korchak S. E., Vieth H.-M., Yurkovskaya A. V. Photo-CIDNP Study of Transient Radicals of Met-Gly and Gly-Met Peptides in Aqueous Solution at Variable pH // Journal of Physical Chemistry B. – 2009. – T. 113, № 20. – C. 7398-7406.

73. Kanazawa A., Kakimoto Y., Nakajima T., Sano I. Identification of γ-glutamylserine, γ-glutamylalanine, γ-glutamylvaline and S-methylglutathione of bovine brain // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 1965. – T. 111, № 1. – C. 90-95.

74. Hallier E., Deutschmann S., Reichel C., Bolt H. M., Peter H. A comparative investigation of the metabolism of methyl bromide and methyl iodide in human erythrocytes // International archives of occupational and environmental health. – 1990. – T. 62, № 3. – C. 221-225.

75. Spear N., Aust S. D. Hydroxylation of deoxyguanosine in DNA by copper and thiols // Archives of biochemistry and biophysics. – 1995. – T. 317, № 1. – C. 142-148.

76. Kennedy G., Spence V. A., McLaren M., Hill A., Underwood C., Belch J. J. F. Oxidative stress levels are raised in chronic fatigue syndrome and are associated with clinical symptoms // Free Radical Biology and Medicine. – 2005. – T. 39, № 5. – C. 584-589.

77. Filipiak P., Hug G. L., Bobrowski K., Pedzinski T., Kozubek H., Marciniak B. Sensitized Photooxidation of S-Methylglutathione in Aqueous Solution: Intramolecular (S∴O) and (S∴N) Bonded Species // Journal of Physical Chemistry B. – 2013. – T. 117, № 8. – C. 2359-2368.

78. Hug G., Bobrowski K., Pogocki D., Marciniak B., Schöneich C., Hörner G. Factor analysis of transient spectra. Free radicals in cyclic dipeptides containing methionine // Research on Chemical Intermediates. – 2009. – T. 35, № 4. – C. 431-442.

79. Hug G. L., Marciniak B., Bobrowski K. Sensitized photo-oxidation of sulfur-containing amino acids and peptides in aqueous solution // Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry. – 1996. – T. 95, № 1. – C. 81-8.

80. DNA Repair and Mutagenesis. / Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W., Wood R. D., Schultz R. A., Ellenberger T. – Washington: ASM Press, 2006.

81. Wallace S. S. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – T. 33. – C. 1-14.

82. Sedgwick B., Bates P. A., Paik J., Jacobs S. C., Lindahl T. Repair of alkylated DNA: recent advances // DNA Repair (Amst). – 2007. – T. 6, № 4. – C. 429-42.

83. Roos W. P., Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis // Trends Mol Med. – 2006. – T. 12, № 9. – C. 440-50.

84. Kaina B., Christmann M., Naumann S., Roos W. P. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents // DNA Repair (Amst). – 2007. – T. 6, № 8. – C. 1079-99.

85. Kondo N., Takahashi A., Ono K., Ohnishi T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways // J Nucleic Acids. – 2010. – T. 2010. – C. 543531.

86. Beranek D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents // Mutat Res. – 1990. – T. 231, № 1. – C. 11-30.

87. O'Connor T. R., Boiteux S., Laval J. Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to in vitro DNA synthesis // Nucleic Acids Res. – 1988. – T. 16, № 13. – C. 5879-94.

88. David S. S., Williams S. D. Chemistry of glycosylases and endonucleases involved in base-excision repair // Chem. Rev. – 1998. – T. 98. – C. 1221-1261.

89. Barnes D. E., Lindahl T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells // Annu. Rev. Genet. – 2004. – T. 38. – C. 445-76.

90. Gros L., Saparbaev M. K., Laval J. Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage // Oncogene. – 2002. – T. 21. – C. 8905-8925.

91. Hitchcock T. M., Dong L., Connor E. E., Meira L. B., Samson L. D., Wyatt M. D., Cao W. Oxanine DNA glycosylase activity from Mammalian alkyladenine glycosylase // J Biol Chem. – 2004. – T. 279, № 37. – C. 38177-83.

92. O'Connor T. R. Purification and characterization of human 3-methyladenine-DNA glycosylase // Nucleic Acids Res. – 1993. – T. 21, № 24. – C. 5561-9.

93. O'Brien P. J., Ellenberger T. Dissecting the broad substrate specificity of human 3-methyladenine-DNA glycosylase // J Biol Chem. – 2004. – T. 279, № 11. – C. 9750-7.

94. Saparbaev M., Langouet S., Privezentzev C. V., Guengerich F. P., Cai H., Elder R. H., Laval J. 1,N(2)-ethenoguanine, a mutagenic DNA adduct, is a primary substrate of Escherichia coli mismatch-specific uracil-DNA glycosylase and human alkylpurine-DNA-N-glycosylase // J Biol Chem. – 2002. – T. 277, № 30. – C. 26987-93.

95. Saparbaev M., Kleibl K., Laval J. Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, rat and human 3-methyladenine DNA glycosylases repair 1,N6-ethenoadenine when present in DNA // Nucleic Acids Res. – 1995. – T. 23, № 18. – C. 3750-5.

96. Saparbaev M., Mani J. C., Laval J. Interactions of the human, rat, Saccharomyces cerevisiae and Escherichia coli 3-methyladenine-DNA glycosylases with DNA containing dIMP residues // Nucleic Acids Res. – 2000. – T. 28, № 6. – C. 1332-9.

97. Lau A. Y., Scharer O. D., Samson L., Verdine G. L., Ellenberger T. Crystal structure of a human alkylbase-DNA repair enzyme complexed to DNA: mechanisms for nucleotide flipping and base excision // Cell. – 1998. – T. 95, № 2. – C. 249-58.

98. Lau A. Y., Wyatt M. D., Glassner B. J., Samson L. D., Ellenberger T. Molecular basis for discriminating between normal and damaged bases by the human alkyladenine glycosylase, AAG // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2000. – T. 97, № 25. – C. 13573-8.

99. Setser J. W., Lingaraju G. M., Davis C. A., Samson L. D., Drennan C. L. Searching for DNA lesions: structural evidence for lower- and higher-affinity DNA binding conformations of human alkyladenine DNA glycosylase // Biochemistry. – 2012. – T. 51, № 1. – C. 382-90.

100. Bruner S. D., Norman D. P. G., Verdine G. L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA // Nature. – 2000. – T. 403, № 6772. – C. 859-866.

101. Wolfe A. E., O'Brien P. J. Kinetic mechanism for the flipping and excision of 1,N(6)-ethenoadenine by human alkyladenine DNA glycosylase // Biochemistry. – 2009. – T. 48, № 48. – C. 11357-69.

102. Vallur A. C., Maher R. L., Bloom L. B. The efficiency of hypoxanthine excision by alkyladenine DNA glycosylase is altered by changes in nearest neighbor bases // DNA Repair (Amst). – 2005. – T. 4, № 10. – C. 1088-98.

103. Hendershot J. M., O'Brien P. J. Critical role of DNA intercalation in enzyme-catalyzed nucleotide flipping // Nucleic Acids Research. – 2014. – T. 42, № 20. – C. 12681–12690.

104. Asaeda A., Ide H., Asagoshi K., Matsuyama S., Tano K., Murakami A., Takamori Y., Kubo K. Substrate specificity of human methylpurine DNA N-glycosylase // Biochemistry. – 2000. – T. 39, № 8. – C. 1959-65.

105. Krueger A., Protozanova E., Frank-Kamenetskii M. D. Sequence-Dependent Basepair Opening in DNA Double Helix // Biophysical Journal. – 2006. – T. 90, № 9. – C. 3091-3099.

106. Frank-Kamenetskii M. How the double helix breathes // Nature. – 1987. – T. 328, № 6125. – C. 17-18.

107. Cheng X., Roberts R. J. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping // Nucleic Acids Research. – 2001. – T. 29, № 18. – C. 3784-3795.

108. Larivière L., Moréra S. A Base-flipping Mechanism for the T4 Phage β-Glucosyltransferase and Identification of a Transition-state Analog // Journal of Molecular Biology. – 2002. – T. 324, № 3. – C. 483-490.

109. Russu I. M. Probing site-specific energetics in proteins and nucleic acids by hydrogen exchange and nuclear magnetic resonance spectroscopy. // Methods Enzymology, 2004. – C. 152-175.

110. Every A. E., Russu I. M. Opening dynamics of 8-oxoguanine in DNA // Journal of Molecular Recognition. – 2013. – T. 26, № 4. – C. 175-180.

111. Coman D., Russu I. M. A Nuclear Magnetic Resonance Investigation of the Energetics of Basepair Opening Pathways in DNA // Biophysical Journal. – 2005. – T. 89, № 5. – C. 3285-3292.

112. Chen C. J., Russu I. M. Sequence-dependence of the energetics of opening of AT basepairs in DNA // Biophysical Journal. – 2004. – T. 87, № 4. – C. 2545-2551.

113. Kochoyan M., Leroy J. L., Gueron M. Processes of base-pair opening and proton exchange in Z-DNA // Biochemistry. – 1990. – T. 29, № 20. – C. 4799-4805.

114. Moe J. G., Russu I. M. Kinetics and energetics of base-pair opening in 5'-d(CGCGAATTCGCG)-3' and a substituted dodecamer containing G.cntdot.T mismatches // Biochemistry. – 1992. – T. 31, № 36. – C. 8421-8428.

115. Bohon J., de los Santos C. R. Effect of 6-thioguanine on the stability of duplex DNA // Nucleic Acids Research. – 2005. – T. 33, № 9. – C. 2880-2886.

116. Szulik M. W., Pallan P. S., Nocek B., Voehler M., Banerjee S., Brooks S., Joachimiak A., Egli M., Eichman B. F., Stone M. P. Differential Stabilities and Sequence-Dependent Base Pair Opening

Dynamics of Watson–Crick Base Pairs with 5-Hydroxymethylcytosine, 5-Formylcytosine, or 5-Carboxylcytosine // Biochemistry. – 2015. – T. 54, № 5. – C. 1294-1305.

117. Leroy J. L., Gao Xl Fau - Gueron M., Gueron M Fau - Patel D. J., Patel D. J. Proton exchange and internal motions in two chromomycin dimer-DNA oligomer complexes // Biochemistry. – 1991. – T. 30, № 23. – C. 5653-61.

118. Leroy J. L., Gao Xl Fau - Misra V., Misra V Fau - Gueron M., Gueron M Fau - Patel D. J., Patel D. J. Proton exchange in DNA-luzopeptin and DNA-echinomycin bisintercalation complexes: rates and processes of base-pair opening // Biochemistry. – 1992. – T. 31, № 5. – C. 1407-15.

119. Hwang T. L., Shaka A. J. Water Suppression That Works - Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients // Journal of Magnetic Resonance Series A. – 1995. – T. 112, № 2. – C. 275-279.

120. Goddard T. D., Kneller, D. G. SPARKY 3 // Book SPARKY 3 / Editor. – San Francisco: University of California, 2008.

121. Plateau P., Gueron M. Exchangeable Proton Nmr without Base-Line Distortion, Using New Strong-Pulse Sequences // Journal of the American Chemical Society. – 1982. – T. 104, № 25. – C. 7310-7311.

122. Russu I. M. Probing site-specific energetics in proteins and nucleic acids by hydrogen exchange and nuclear magnetic resonance spectroscopy // Methods Enzymol. – 2004. – T. 379. – C. 152-75.

123. Wenke B. B., Huiting L. N., Franke E. B., Lane B. F., Nunez M. E. Base Pair Opening in a Deoxynucleotide Duplex Containing a cis-syn Thymine Cyclobutane Dimer Lesion // Biochemistry. – 2013. – T. 52, № 51. – C. 9275-9285.

124. Moe J. G., Russu I. M. Kinetics and Energetics of Base-Pair Opening in 5'-D(Cgcgaattcgcg)-3' and a Substituted Dodecamer Containing G.T Mismatches // Biochemistry. – 1992. – T. 31, № 36. – C. 8421-8428.

125. Krezel A., Bal W. A formula for correlating pKa values determined in D2O and H2O // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2004. – T. 98, № 1. – C. 161-166.

126. Becke A. D. Density-Functional Thermochemistry .3. The Role of Exact Exchange // Journal of Chemical Physics. – 1993. – T. 98, № 7. – C. 5648-5652.

127. Lee C., Yang W., Parr R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density // Physical Review B: Condensed Matter. – 1988. – T. 37, № 2. – C. 785-789.

128. Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. Quantum mechanical continuum solvation models // Chemical Reviews. – 2005. – T. 105, № 8. – C. 2999-3093.

129. M.J. Frisch G. W. T., H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Ma-lick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople. Gaussian 03 // Book Gaussian 03 / EditorGaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

130. Kuznetsov N. A., Kiryutin A. S., Kuznetsova A. A., Panov M. S., Barsukova M. O., Yurkovskaya A. V., Fedorova O. S. The formation of catalytically competent enzyme-substrate complex is not a bottleneck in lesion excision by human alkyladenine DNA glycosylase // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. – 2017. – Т. 35, № 5. – С. 950-967.

131. MATLAB // Book MATLAB / Editor. – Natick, Massachusetts, United States.: MathWorks, 2009.

132. Origin // Book Origin / Editor. – Northampton, MA, USA: OriginLab, 2015.

133. Grosse S., Gubaydullin F., Scheelken H., Vieth H.-M., Yurkovskaya A. V. Field cycling by fast NMR probe transfer: design and application in field-dependent CIDNP experiments // Applied Magnetic Resonance. – 1999. – Т. 17, № 2-3. – С. 211-225.

134. Protein NMR Spectroscopy, Second Edition: Principles and Practice. / Palmer III A. G., Fairbrother W. J., Cavanagh J., Skelton N. J., Rance M.: Academic Press, 2005. – 912 с.

135. Protein NMR spectroscopy : principles and practice. / Cavanagh J. – 2nd изд. – Amsterdam ; Boston: Academic Press, 2007. – xxv, 885 p. с.

136. Ivanov K. L., Miesel K., Yurkovskaya A. V., Korchak S. E., Kiryutin A. S., Vieth H.-M. Transfer of CIDNP among coupled spins at low magnetic field // Applied Magnetic Resonance. – 2006. – Т. 30, № 3-4. – С. 513-534.

137. Salikhov K. M. Creation of spin coherent states in the course of chemical reactions

// Chemical Physics Letters. – 1993. – Т. 201. – С. 261-264.

138. iRelax program. –. – URL: http://www.tomo.nsc.ru/en/nmr/iRelax/. (дата обращения: 12.09.2017.

139. Zhukov I. V., Kiryutin A. S., Yurkovskaya A. V., Grishin Y. A., Vieth H.-M., Ivanov K. L. Field-cycling NMR experiments in ultra-wide magnetic field range: relaxation and coherent polarization transfer // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2018. – Т. 20, № 18. – С. 12396-12405.

140. Bornet A., Jannin S., Konter J. A., Hautle P., van den Brandt B., Bodenhausen G. Ultra High-Resolution NMR: Sustained Induction Decays of Long-Lived Coherences // Journal of the American Chemical Society. – 2011. – Т. 133, № 39. – С. 15644-15649.

141. Panov M. S., Pravdivtsev A. N., Ivanov K. L., Yurkovskaya A. V., Vieth H. M. Coherent Polarization Transfer Effects Are Crucial for Interpreting Low-Field CIDNP Data // Applied Magnetic Resonance. – 2014. – Т. 45, № 9. – С. 893-900.

142. Saprygina N. N., Morozova O. B., Kaptein R., Yurkovskaya A. V., Sagdeev R. Z. Influence of the charge of amino group on photoinduced oxidation of histidine // Doklady Physical Chemistry. – 2013. – Т. 449. – С. 66-70.

143. Saeuberlich J., Brede O., Beckert D. Photoionization of Benzophenone Carboxylic Acids in Aqueous Solution. A FT EPR and Optical Spectroscopy Study of Radical Cation Decay // Journal of Physical Chemistry. – 1996. – Т. 100, № 46. – С. 18101-18107.

144. Hammes-Schiffer S., Stuchebrukhov A. A. Theory of Coupled Electron and Proton Transfer Reactions // Chemical Reviews. – 2010. – Т. 110, № 12. – С. 6939-6960.

145. Kumar A., Sevilla M. D. Proton-Coupled Electron Transfer in DNA on Formation of Radiation-Produced Ion Radicals // Chem. Rev. – 2010. – Т. 110, № 12. – С. 7002-7023.

146. Williamson H. R., Dow B. A., Davidson V. L. Mechanisms for control of biological electron transfer reactions // Bioorganic Chemistry. – 2014. – Т. 57. – С. 213-221.

147. Kim G., Weiss S. J., Levine R. L. Methionine oxidation and reduction in proteins // Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects. – 2014. – Т. 1840, № 2. – С. 901-905.

148. Wang M., Gao J., Müller P., Giese B. Electron Transfer in Peptides with Cysteine and Methionine as Relay Amino Acids // Angewandte Chemie, International Edition. – 2009. – T. 48, № 23. – C. 4232-4234.

149. Schleicher E., Hitomi K., Kay C. W. M., Getzoff E. D., Todo T., Weber S. Electron Nuclear Double Resonance Differentiates Complementary Roles for Active Site Histidines in (6-4) Photolyase // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – T. 282, № 7. – C. 4738-4747.

150. Morozova O. B., Yurkovskaya A. V. Intramolecular Electron Transfer in the Photooxidized Peptides Tyrosine–Histidine and Histidine–Tyrosine: A Time-Resolved CIDNP Study // Angewandte Chemie, International Edition. – 2010. – T. 49, № 43. – C. 7996-7999.

151. Panov M. S., Saprygina N. N., Morozova O. B., Kiryutin A. S., Grishin Y. A., Yurkovskaya A. V. Photooxidation of Histidine by 3,3',4,4'-Benzophenone Tetracarboxylic Acid in Aqueous Solution: Time-Resolved and Field-Dependent CIDNP Study // Applied Magnetic Resonance. – 2014. – T. 45, № 10. – C. 1019-1033.

152. Morozova O. B., Fishman N. N., Yurkovskaya A. V. Chemically induced dynamic nuclear polarization study of the reduction of histidine radical in the reactions with aromatic amino acids // Russian Chemical Bulletin. – 2016. – T. 65, № 12. – C. 2907-2913.

153. Morozova O. B., Yurkovskaya A. V. Modulation of the Rate of Reversible Electron Transfer in Oxidized Tryptophan and Tyrosine Containing Peptides in Acidic Aqueous Solution // Journal of Physical Chemistry B. – 2015. – T. 119, № 1. – C. 140-149.

154. Morozova O. B., Kaptein R., Yurkovskaya A. V. Changing the Direction of Intramolecular Electron Transfer in Oxidized Dipeptides Containing Tryptophan and Tyrosine // Journal of Physical Chemistry B. – 2012. – T. 116, № 40. – C. 12221-12226.

155. Morozova O. B., Yurkovskaya A. V., Vieth H.-M., Sagdeev R. Z. Intramolecular Electron Transfer in Tryptophan-Tyrosine Peptide in Photoinduced Reaction in Aqueous Solution // Journal of Physical Chemistry B. – 2003. – T. 107, № 4. – C. 1088-1096.

156. Morozova O. B., Yurkovskaya A. V., Sagdeev R. Z. Reversibility of Electron Transfer in Tryptophan-Tyrosine Peptide in Acidic Aqueous Solution Studied by Time-Resolved CIDNP // Journal of Physical Chemistry B. – 2005. – T. 109, № 8. – C. 3668-3675.

157. Morozova O. B., Hore P. J., Sagdeev R. Z., Yurkovskaya A. V. Intramolecular electron transfer in lysozyme studied by time-resolved chemically induced dynamic nuclear polarization // Journal of Physical Chemistry B. – 2005. – T. 109, № 46. – C. 21971-21978.

158. Bargon J., Fischer H., Johnsen U. Kernresonanz-Emissionslinien während rascher Radikalreaktionen // Zeitschrift fuer Naturforschung, A: Physical Sciences. – 1967. – T. 22. – C. 1551-1555.

159. Hurley J. K., Linschitz H., Treinin A. Interaction of halide and pseudohalide ions with triplet benzophenone-4-carboxylate: kinetics and radical yields // Journal of Physical Chemistry. – 1988. – T. 92, № 18. – C. 5151-9.

160. Amorati R., Valgimigli L., Viglianisi C., Schmallegger M., Neshchadin D., Gescheidt G. Proton-Coupled Electron Transfer from Hydrogen-Bonded Phenols to Benzophenone Triplets // Chemistry-a European Journal. – 2017. – T. 23, № 22. – C. 5299-5306.

161. Tomkiewicz M., McAlpine R. D., Cocivera M. Photooxidation and decarboxylation of tyrosine studied by EPR and CIDNP [chemically-induced dynamic nuclear polarization] techniques // Canadian Journal of Chemistry. – 1972. – T. 50, № 23. – C. 3849-56.

162. Asmus K. D., Göbl M., Hiller K. O., Mahling S., Monig J. S:.N and S:.O Three-electron-bonded Radicals and Radical Cations in Aqueous-Solutions // Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2. – 1985.10.1039/P29850000641 № 5. – C. 641-646.

163. Closs G. L., Sitzmann E. V. Measurements of degenerate radical ion-neutral molecule electron exchange by microsecond time-resolved CIDNP. Determination of relative hyperfine coupling constants of radical cations of chlorophylls and derivatives // Journal of the American Chemical Society. – 1981. – T. 103, № 11. – C. 3217-19.

164. Modern Physical Organic Chemistry. / Anslyn E. V., Dougherty D. A. – United States of America: University Science Books, 2006.

165. Hendon C. H., Carbery D. R., Walsh A. Three-electron two-centred bonds and the stabilisation of cationic sulfur radicals // Chemical Science. – 2014. – T. 5, № 4. – C. 1390-1395.

166. Ignasiak M. T., Pedzinski T., Rusconi F., Filipiak P., Bobrowski K., Houee-Leyin C., Marciniak B. Photosensitized Oxidation of Methionine-Containing Dipeptides. From the Transients to the Final Products // Journal of Physical Chemistry B. – 2014. – T. 118, № 29. – C. 8549-8558.

167. Yashiro H., White R. C., Yurkovskaya A. V., Forbes M. D. E. Methionine Radical Cation: Structural Studies as a Function of pH Using X- and Q-Band Time-Resolved Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy // Journal of Physical Chemistry A. – 2005. – T. 109, № 26. – C. 5855-5864.

168. Korchak S. E., Ivanov K. L., Yurkovskaya A. V., Vieth H.-M. Structure and magnetic resonance parameters of the cation-radicals of methionine as studied by the CIDNP magnetic field dependence // ARKIVOC (VIII). – 2004. № 8. – C. 121-131.

169. Morozova O. B., Panov M. S., Vieth H.-M., Yurkovskaya A. V. CIDNP study of sensitized photooxidation of S-methylcysteine and S-methylglutathione in aqueous solution // Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry. – 2016. – T. 321. – C. 90-98.

170. Boelens R., Scheek R. M., Dijkstra K., Kaptein R. Sequential Assignment of Imino-Proton and Amino-Proton Resonances in H-1-Nmr Spectra of Oligonucleotides by Two-Dimensional Nmr-Spectroscopy - Application to a Lac Operator Fragment // Journal of Magnetic Resonance. – 1985. – T. 62, № 3. – C. 378-386.

171. Patel D. J., Hilbers C. W. Proton nuclear magnetic resonance investigations of fraying in double-stranded d-ApTpGpCpApT in H2O solution // Biochemistry. – 1975. – T. 14, № 12. – C. 2651-6.

172. Carbonnaux C., Fazakerley G. V., Sowers L. C. An NMR structural study of deaminated base pairs in DNA // Nucleic Acids Res. – 1990. – T. 18, № 14. – C. 4075-81.

173. Taylor J. S., Garrett D. S., Brockie I. R., Svoboda D. L., Telser J. Proton NMR assignment and melting temperature study of cis-syn and trans-syn thymine dimer containing duplexes of d(CGTATTATGC).cntdot.d(GCATAATACG) // Biochemistry. – 1990. – T. 29, № 37. – C. 8858-8866.

174. Smith L. J., Mark A. E., Dobson C. M., Van Gunsteren W. F. Molecular dynamics simulations of peptide fragments from hen lysozyme: insight into non-native protein conformations // Journal of Molecular Biology. – 1998. – T. 280, № 4. – C. 703-719.

175. Guéron M., Leroy J.-L. Studies of base pair kinetics by NMR measurement of proton exchange // Methods in enzymology. – 1995. – T. 261. – C. 383-413.

176. Lenz S. A., Wetmore S. D. Evaluating the Substrate Selectivity of Alkyladenine DNA Glycosylase: The Synergistic Interplay of Active Site Flexibility and Water Reorganization // Biochemistry. – 2016. – T. 55, № 5. – C. 798-808.

177. Closs G. L., Miller R. J., Redwine O. D. Time-resolved CIDNP: applications to radical and biradical chemistry // Accounts of Chemical Research. – 1985. – T. 18, № 7. – C. 196-202.

178. Dushkin A. V., Yurkovskaya A. V., Sagdeev R. Z. CIDNP observation in the gas phase // Chemical Physics Letters. – 1979. – T. 67, № 2–3. – C. 524-526.

179. Zysmilich M. G., McDermott A. Photochemically Induced Dynamic Nuclear Polarization in the Solid-State 15N Spectra of Reaction Centers from Photosynthetic Bacteria Rhodobacter sphaeroides R-26 // Journal of the American Chemical Society. – 1994. – T. 116, № 18. – C. 8362-8363.

180. Closs G. L., Closs L. E. Induced dynamic nuclear spin polarization in photoreductions of benzophenone by toluene and ethylbenzene // Journal of the American Chemical Society. – 1969. – T. 91, № 16. – C. 4550-2.

181. Kaptein R., Oosterhoff L. J. Chemically induced dynamic nuclear polarization. III. Anomalous multiplets of radical coupling and disproportionation products // Chemical Physics Letters. – 1969. – T. 4, № 4. – C. 214-16.

182. Kaptein R., Oosterhoff L. J. Chemically induced dynamic nuclear polarization. II. Relation with anomalous ESR spectra // Chemical Physics Letters. – 1969. – T. 4, № 4. – C. 195-197.

183. Sosnovsky D. V., Jeschke G., Matysik J., Vieth H. M., Ivanov K. L. Level crossing analysis of chemically induced dynamic nuclear polarization: Towards a common description of liquid-state and solid-state cases // Journal of Chemical Physics. – 2016. – T. 144, № 14.

184. Pravdivtsev A. N., Yurkovskaya A. V., Ivanov K. L., Vieth H.-M. Importance of polarization transfer in reaction products for interpreting and analyzing CIDNP at low magnetic fields // Journal of Magnetic Resonance. – 2015. – T. 254, № 0. – C. 35-47.

185. Morozova O. B., Yurkovskaya A. V., Vieth H.-M., Sosnovsky D. V., Ivanov K. L. Light-induced spin hyperpolarisation in condensed phase // Molecular Physics. – 2017. – T. 115, № 23. – C. 2907-2943.

186. Kuhn L. T. Photo-CIDNP NMR Spectroscopy of Amino Acids and Proteins // Hyperpolarization Methods in NMR Spectroscopy. – 2013. – T. 338. – C. 229-300.

187. Jeschke G., Matysik J. A reassessment of the origin of photochemically induced dynamic nuclear polarization effects in solids // Chemical Physics. – 2003. – T. 294, № 3. – C. 239-255.

188. Matysik J., Diller A., Roy E., Alia A. The solid-state photo-CIDNP effect // Photosynthesis Research. – 2009. – T. 102, № 2. – C. 427-435.

189. Thamarath S. S., Bode B. E., Prakash S., Sai Sankar Gupta K. B., Alia A., Jeschke G., Matysik J. Electron Spin Density Distribution in the Special Pair Triplet of Rhodobacter sphaeroides R26 Revealed by Magnetic Field Dependence of the Solid-State Photo-CIDNP Effect // Journal of the American Chemical Society. – 2012. – T. 134, № 13. – C. 5921-5930.

190. Bode B. E., Thamarath S. S., Gupta K. B. S. S., Alia A., Jeschke G., Matysik J. The Solid-State Photo-CIDNP Effect and Its Analytical Application // Hyperpolarization Methods in NMR Spectroscopy / Kuhn L. T. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. – C. 105-121.

191. Jeschke G. Electron-electron-nuclear three-spin mixing in spin-correlated radical pairs // Journal of Chemical Physics. – 1997. – T. 106, № 24. – C. 10072-10086.

192. Polenova T., McDermott A. E. A Coherent Mixing Mechanism Explains the Photoinduced Nuclear Polarization in Photosynthetic Reaction Centers // Journal of Physical Chemistry B. – 1999. – T. 103, № 3. – C. 535-548.

193. McDermott A., Zysmilich M. G., Polenova T. Solid state NMR studies of photoinduced polarization in photosynthetic reaction centers: mechanism and simulations // Solid State Nuclear Magnetic Resonance. – 1998. – T. 11, № 1-2. – C. 21-47.

194. Goldstein R. A., Boxer S. G. Effects of Nuclear-Spin Polarization on Reaction Dynamics in Photosynthetic Bacterial Reaction Centers // Biophysical Journal. – 1987. – T. 51, № 6. – C. 937-946.

195. Daviso E., Prakash S., Alia A., Gast P., Neugebauer J., Jeschke G., Matysik J. The electronic structure of the primary electron donor of reaction centers of purple bacteria at atomic resolution as observed by

photo-CIDNP 13C NMR // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – T. 106, № 52. – C. 22281-22286.

196. Daviso E., Alia A., Prakash S., Diller A., Gast P., Lugtenburg J., Matysik J., Jeschke G. Electron−Nuclear Spin Dynamics in a Bacterial Photosynthetic Reaction Center // The Journal of Physical Chemistry C. – 2009. – T. 113, № 23. – C. 10269-10278.

197. Diller A., Prakash S., Alia A., Gast P., Matysik J., Jeschke G. Signals in solid-state photochemically induced dynamic nuclear polarization recover faster than signals obtained with the longitudinal relaxation time // Journal of Physical Chemistry B. – 2007. – T. 111, № 35. – C. 10606-10614.

198. Prakash S., Alia, Gast P., de Groot H. J. M., Jeschke G., Matysik J. Magnetic Field Dependence of Photo-CIDNP MAS NMR on Photosynthetic Reaction Centers of Rhodobacter sphaeroides WT // Journal of the American Chemical Society. – 2005. – T. 127, № 41. – C. 14290-14298.

199. Gräsing D., Bielytskyi P., Céspedes-Camacho I. F., Alia A., Marquardsen T., Engelke F., Matysik J. Field-cycling NMR with high-resolution detection under magic-angle spinning: determination of field-window for nuclear hyperpolarization in a photosynthetic reaction center // Scientific Reports. – 2017. – T. 7, № 1. – C. 12111.

200. Zill J. C., He Z., Tank M., Ferlez B. H., Canniffe D. P., Lahav Y., Bellstedt P., Alia A., Schapiro I., Golbeck J. H., Bryant D. A., Matysik J. 15N photo-CIDNP MAS NMR analysis of reaction centers of Chloracidobacterium thermophilum // Photosynthesis Research. – 2018.10.1007/s11120-018-0504-1.

201. Zill Jeremias C., Kansy M., Goss R., Köhler L., Alia A., Wilhelm C., Matysik J. Photo-CIDNP in the Reaction Center of the Diatom Cyclotella meneghiniana Observed by 13C MAS NMR // Book Photo-CIDNP in the Reaction Center of the Diatom Cyclotella meneghiniana Observed by 13C MAS NMR / Editor, 2017. – C. 347.

202. Najdanova M., Janssen G. J., de Groot H. J. M., Matysik J., Alia A. Analysis of electron donors in photosystems in oxygenic photosynthesis by photo-CIDNP MAS NMR // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2015. – T. 152. – C. 261-271.

203. Janssen G. J., Roy E., Matysik J., Alia A. (15)N Photo-CIDNP MAS NMR To Reveal Functional Heterogeneity in Electron Donor of Different Plant Organisms // Applied Magnetic Resonance. – 2012. – T. 42, № 1. – C. 57-67.

204. Roy E., Alia, Gast P., van Gorkom H., de Groot H. J. M., Jeschke G., Matysik J. Photochemically induced dynamic nuclear polarization in the reaction center of the green sulphur bacterium Chlorobium tepidum observed by 13C MAS NMR // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. – 2007. – T. 1767, № 6. – C. 610-615.

205. Daviso E., Janssen G. J., Alia A., Jeschke G., Matysik J., Tessari M. A 10 000-fold Nuclear Hyperpolarization of a Membrane Protein in the Liquid Phase via a Solid-State Mechanism // Journal of the American Chemical Society. – 2011. – T. 133, № 42. – C. 16754-16757.

206. Thamarath S. S., Heberle J., Hore P. J., Kottke T., Matysik J. Solid-State Photo-CIDNP Effect Observed in Phototropin LOV1-C57S by 13C Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy // Journal of the American Chemical Society. – 2010. – T. 132, № 44. – C. 15542-15543.

207. Richter G., Weber S., Roemisch W., Bacher A., Fischer M., Eisenreich W. Photochemically Induced Dynamic Nuclear Polarization in a C450A Mutant of the LOV2 Domain of the Avena sativa Blue-Light Receptor Phototropin // Journal of the American Chemical Society. – 2005. – T. 127, № 49. – C. 17245-17252.

208. Diau E. W. G., Kotting C., Zewail A. H. Femtochemistry of Norrish type-I reactions: I. Experimental and theoretical studies of acetone and related ketones on the S1 surface // ChemPhysChem. – 2001. – T. 2, № 5. – C. 273-293.

209. Bargon J. CIDNP Studies of Macromolecular Systems .1. Photolysis of Poly(Methyl Isopropenyl Ketone) and Its Model Compounds in Solution // Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry. – 1978. – T. 16, № 11. – C. 2747-2758.

210. Yurkovskaya A. V., Galimov R. R., Obynochny A. A., Salikhov K. M., Sagdeev R. Z. The field dependence of CIDNP in gas-phase reactions of biradicals // Chemical Physics. – 1987. – T. 112, № 2. – C. 259-64.

211. Dvinskikh S. V., Yurkovskaya A. V., Vieth H.-M. A Time-Resolved Stimulated Nuclear Polarization Study of Biradicals in Low Magnetic Field // Journal of Physical Chemistry. – 1996. – T. 100, № 20. – C. 8125-30.

212. Yurkovskaya A. V., Tsentalovich Y. P., Lukzen N. N., Sagdeev R. Z. The Effect of Medium on CIDNP Kinetics in Geminate Recombination of Biradicals - Experiment and Calculation // Research on Chemical Intermediates. – 1992. – T. 17, № 2. – C. 145-171.

213. Miesel K., Yurkovskaya A. V., Vieth H.-M. Field dependence of CIDNP in photoreactions in plastic crystalline matrix // Applied Magnetic Resonance. – 2004. – T. 26, № 1-2. – C. 51-64.

214. Doubleday C. Absorption and emission in the cidnp derived from 1,6-biradicals // Chemical Physics Letters. – 1981. – T. 77, № 1. – C. 131-134.

215. Yurkovskaya A. V., Obynochnyi A. A., Sagdeev R. Z. CIDNP studies of biradicals in super-high magnetic fields // Chemical Physics Letters. – 1984. – T. 104, № 2-3. – C. 284-9.

216. Buschmann J., Muller E., Luger P. X-Ray Structure-Analysis of 1,4-Dioxane, Phase-I at 279-K and Phase-Ii at 153-K // Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications. – 1986. – T. 42. – C. 873-876.

217. de Kanter F. J. J., den Hollander J. A., Huizer A. H., Kaptein R. Biradical CIDNP and the dynamics of polymethylene chains // Mol. Phys. – 1977. – T. 34. – C. 857-874.

Приложение 1.

Ниже представлена программа для определения наиболее подходящей разности g-факторов радикалов в РП, которая лучше всего описывает экспериментально полученную зависимость интенсивности ХПЯ от напряженности магнитного поля.

Программа рассчитывает полевую зависимость ХПЯ по модели Адриана [20], сравнивает с экспериментальными данными, затем изменяет параметры расчета до тех пор, пока не будет достигнута наименьшая сумма квадратов отклонений.

Знаком % помечены комментарии.

```
function [deviation_of_parameter, optim_par] = CIDNP_FD()
% The main aim of the program is to optimise g-factor difference for an
% experimentally measured field dependence.
% HFI constants for all nuclei in radical pair have to be known, end result
% strongly depends on them.
% The script was written in MATLAB 7.8.0 (R2009b).

% To run script write [deviation_of_parameter, optim_par] = CIDNP_FD() in
% MATLAB command line

% At the end, the script will try to save optimized parameters and optimized
% field dependence curve to file. Be sure to write down a valid path to an
% existing folder.

%% Parameters for calculations

% HFI vector should be written as follows:
% HFI=[constant1 constant2;
%      spin1     spin2];
% constants should be in Gauss!

%MTPA SN + tcbp (N alpha(x2) gamma(x2) delta(x3) TCBP H2,2'H6,6' H5,5')
HFI=[20 10  10  8   8   7   7   7   -2.65   -2.65   -2.53   -2.53   0.897
0.897;
     1  0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5  0.5     0.5     0.5     0.5     0.5
0.5];

HFI=HFI';
N=length(HFI(:,1));
```

```
%new 400, MTPA+tcbp

Fields=[8   7   6.5 4.73    3.43    2.49    1.8 1.31    0.948   0.687   0.498
0.3613  0.2612  0.1899  0.1377  0.0998];

Fields=Fields*10000; %converting Tesla to Gauss

L=length(Fields);


%new 400, MTPA + TCBP alpha proton of MTPA

nucleus=2; % Intensities are given for a certain nucleus, here one have to
specify number of this nucleus in HFI vector

Ints=[0.461874795   0.496565087 0.534072674 0.70801421  0.950343617 1
0.809585712 0.570061661 0.3800143   0.266807322 0.199567981 0.179265744
0.113130954 0.133408059 0.107166508 0.118698315];


% the range of fields in which field dependence will be calculated and saved
at the end

B1=50;

B2=95000;


%% calculate Multiplicity vector %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% this vector contains multiplicities for different subensembles, is used
below for

% calculation of matrix with all possible spin states in alpha/beta basis.

% If, for example, in HFI vector in parameters section above two nuclei with

% spin I1=1 and I2=1/2 are declared, this part produces vector in the form

% Multiplicity =[6

%                2

%                1];

Multiplicity=zeros(N+1,1);

Multiplicity(N+1)=1;

for YYY=1:N

    Multiplicity(N+1-YYY)=Multiplicity(N+2-YYY)*(2*HFI(N+1-YYY,2)+1);

end


%% Creating matrix A with all possible spin states %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% If, for example, in HFI vector in parameters section above two nuclei with

% spin I1=1 and I2=1/2 are declared, this part produces matrix in the form

% A=[ 1    0.5

%     1   -0.5

%     0    0.5
```

```
%      0    -0.5
%     -1     0.5
%     -1    -0.5];

M=Multiplicity(1);
A=zeros(M,N);
for k2=0:(M-1)
    R=k2;
    for i2=1:N
        T=fix(R/Multiplicity(i2+1));
        A(k2+1,i2)=HFI(i2,2)-T;
        R=mod(R,Multiplicity(i2+1));
     end
end

%% Nested functions declarations

function [ FIELDS ] = magn_field(B1,B2,L1)
%This function calculates L1 points of log space between B1 and B2
%%
FIELDS=zeros(L1,1);
z=(log(B1)-log(B2))/(L1-1);
for k=1:(L1)
    FIELDS(k)=B2*exp((k-1)*z);
end;
end

function [P] = prob2(k,h,B,delta,N,A)
% This function calculates probability of S-T0 conversion for a given
% overall nuclei spin states at given magnetic field
% A - matrix of all nuclei spin states, has dimensions (overall
% multiplicity)*(number of nuclei)
% N - number of nuclei, is calculated as length of HFI vector
% B - magnetic field in Gauss for which probability is calculated
% delta - g-factors difference
% k - number of a row in matrix A
% h - HFI-vector,
```

```
PR=0.25*(delta)*B;
for i=1:N
    PR=PR+0.5*h(i)*A(k,i);
end;
P=(abs(PR)).^(0.5);
end

function [R] = Pol2(nucleus,h,B,delta,N,A,M)
%This function calculates polarization of each spin in one magnetic field
% Polarization is based on probability of S-T0 conversion calculated by
% prob2 function
% A - matrix of all nuclei spin states, has dimensions (overall
% multiplicity)*(number of nuclei)
% M - number of rows in matrix A
% N - number of nuclei, is calculated as length of HFI vector
% B - magnetic field in Gauss for which polarization is calculated
% delta - g-factors difference
% h - HFI-vector
% nucleus number of the spin in HFI-vector for which polarization is
% calculated
R=0;
P=zeros(M,N);
for k=1:M
    P(k)=prob2(k,h,B,delta,N,A);
    R=R+A(k,nucleus)*P(k);
end;

end

function [ adr ] = Adrian3(nucleus,h,B,delta,L,A,M)
% This function calculates polarization of each spin in all magnetic fields
% Polarization is based on probability of S-T0 conversion calculated by
% prob2 function
% A - matrix of all nuclei spin states, has dimensions (overall
% multiplicity)*(number of nuclei)
% M - number of rows in matrix A
% N - number of nuclei, is calculated as length of HFI vector
```

```
% B - VECTOR of magnetic field in Gauss for which polarizations are
calculated
% delta - g-factors difference
% L - length of vector B
% h - HFI-vector
% nucleus - number of the spin in HFI-vector for which polarization is
% calculated
N=length(h);
adr=zeros(1,L);

for k=1:L
    F=B(k);
    Polpol=Pol2(nucleus,h,F,delta,N,A,M);
    adr(k)=Polpol;
end;
adr=adr./max(abs(adr));
end

function [ Q ] = Dev2(x)
% This function calculates difference between calculated and experimental
% field dependence. Is used for optimization of g-factor difference
delta=x(1);
a=x(2);
Test=Adrian3(nucleus,HFI(:,1),Fields,delta,L,A,M);
Q=(sum((Test*a-Ints).^2)).^(0.5);
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%% All functions are declared %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%% Optimization of g-factor difference and normalization factor %%%%%%
Approximation1=[ 0.0020    1]; % the initial guess for delta-g and scaling
factor
q=@(x) Dev2(x);
[optim_par]=fminsearch(q,Approximation1,optimset('TolX',1e-
8,'MaxIter',10000,'Display','iter', 'MaxFunEvals',20000));
```

```
%% calculations of delta g deviation %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

differential=zeros(11,1);

for kk=1:11

    Mesh_grid=[optim_par(1)*(1+0.0001*(kk-6)),optim_par(2)];

    test=Dev2(Mesh_grid);

    differential(kk)=test;

end;


deviation=(Dev2(optim_par).*(optim_par(1)*0.0001).^(2)./abs(diff(diff(differe
ntial)))).^(0.5);

deviation_of_parameter=deviation(5)




%% calculate the optimized curve and show it with experimental points %%%

FField=magn_field(B1,B2,100);

PPol=(abs(Adrian3(nucleus,HFI(:,1),FField,optim_par(1),100,A,M)));




semilogx(Fields, Ints,'o', FField',PPol.*optim_par(2))


%% save the curve and optimized parameters to files %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

 FField=FField/10000; % converts fields back to Tesla

 Dependence_for_saving=[FField PPol'];

 Parameters_to_save=[optim_par deviation_of_parameter];

save(strcat('D:/Users/user/Documents/MATLAB/Field_dep_',date,'_',strrep(dates
tr(now,15), ':', '_'),'.txt'),'Dependence_for_saving','-ASCII');

save(strcat('D:/Users/user/Documents/MATLAB/Opt_par_',date,'_',strrep(datestr
(now,15), ':', '_'),'.txt'),'Parameters_to_save','-ASCII');

end
```