

УДК 577

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

А. М. СЕРЕБРЯНЫЙ, Р. М. МНАЦКАНЯН

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА
МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ НИТРОЗОАЛКИЛМОЧЕВИН.
РЕАКЦИЯ НИТРОЗОАЛКИЛМОЧЕВИН С ЦИТИДИНОМ**

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 18 I 1971)

Ранее было высказано предположение (^{1, 2}), что мутагенный эффект нитрозоалкилмочевин (НАМ) можно объяснить, по крайней мере частично, их карбамоилирующими свойствами. Для подтверждения этого предположения необходимо доказать, что НАМ способны карбамоилировать основания ДНК. С этой целью нами исследована реакция цитидина с N-нитрозо-N-метилмочевинной (НММ) и N-нитрозо-N-этилмочевинной (НЭМ).

Смесь 0,1288 г НММ (или 0,1462 г НЭМ), 0,0608 г цитидина (молярное отношение НАМ:цитидин 5:1) и 1 мл дистиллированной воды кипятили до полного разложения НММ и полученный раствор наносили на колонку (1,8 × 32 см) с сульфэтилцеллюлозой. Элюцию продуктов реакции осуществляли вначале дистиллированной водой, а затем градиентом концентрации соляной кислоты. Полученный профиль элюции приведен на рис. 1а. Как видно из рисунка, реакционная масса содержит несколько различных веществ. Основным компонентом является «цитидиновая фракция». (При хроматографии этой фракции на Дауэксе 50 × 8 в K⁺-форме удается разделить содержащиеся в ней цитидин и 1-метилцитидин.) Остальные вещества, обозначенные цифрами I, II, III и IV, выходят с колонки раньше цитидина и имеют, следовательно, рK_a < 4. Это отличает их от 1-метилцитидина, для которого рK_a = 8,7 (³). У.-ф. спектры этих веществ (рис. 2) также отличаются от у.-ф. спектров цитидина и 1-метилцитидина. Строение веществ I — IV установлено на основании следующих данных.

Вещество I. В кислой и нейтральной среде у.-ф. спектр поглощения I практически совпадает с у.-ф. спектром уридина. В спектре я.м.р. I имеется сигнал с δ 3,2 м.д., характерный для группировки CH₃—N/CO— (4). Эти данные позволили предположить, что вещество I является 1-метилури-

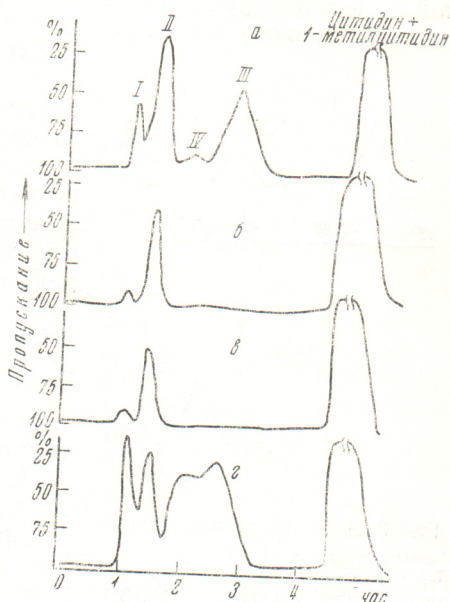


Рис. 1. Профиль элюции продуктов реакции цитидина с НММ при 100° (а), с нитромочевинной (б), с НЭМ при 100° (в), с НММ при 37°, рН 6,8 (г). Резервуар 300 мл 0,05 N HCl. Смеситель 450 мл дистиллированной воды. Скорость элюции 50 мл/час

дином. Окончательное доказательство было получено при хроматографии I на бумаге. Во всех трех использованных системах (бутанол, насыщенный водой; *n*-пропанол — вода — концентрированный раствор аммиака 6:1:3 по объему; метанол — вода — концентрированная соляная кислота 7:1:2

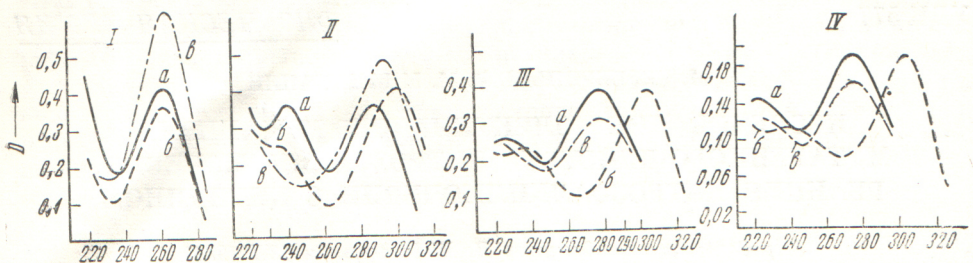


Рис. 2. У.-ф. спектры продуктов реакции цитидина с НММ в нейтральной среде (а), в 0,1 N HCl (б), в 0,1 N KOH (е)

по объему) R_f I совпадает с R_f 1-метилуридина, синтезированного по (5). Совпадают также и у.-ф. спектры веществ, элюированных с бумаги.

Вещество II. Как следует из у.-ф. спектра, II протонируется в кислоте и диссоциирует в щелочной среде. При нагревании раствора II в 0,1 N соляной кислоте в течение часа при 100° II полностью гидролизуется.

Продукт гидролиза по своим хроматографическим свойствам и у.-ф. спектру идентичен уридину. И.-к. спектр II (таблетки в KBr) имеет, в отличие от цитидина, полосу поглощения при 1700 cm^{-1} (рис. 3), что указывает на наличие в II дополнительной (по сравнению с цитидином) карбонильной группы. На это же указывает сходство у.-ф. спектра II с у.-ф. спектром N⁶-ацетилцитидина (6). Сходство этих спектров позволяет предположить, что новый заместитель присоединен к N⁶-атому азота.

Совокупность приведенных данных позволяет приписать II формулу N⁶-карбамоилцитидина.

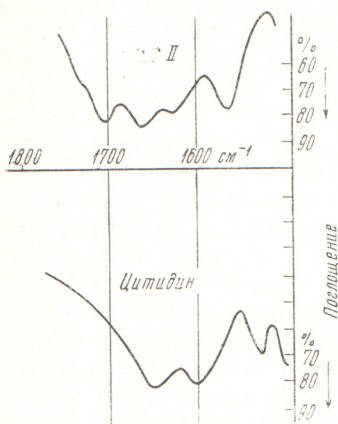
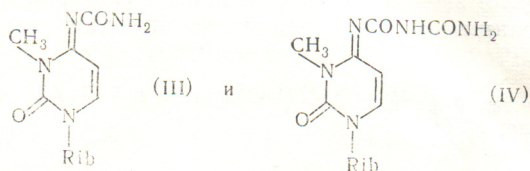


Рис. 3. И.-к. спектр вещества II

продукт мягкого гидролиза гидролиза уретанов нужны довольно жесткие условия. Окончательным доказательством приведенной формулы является образование II при реакции цитидина с нитромочевинной, употребительным агентом карбамоилирования аминов (рис. 16). Тожество продуктов реакции нитромочевинной и НММ с цитидином доказано сравнением их поведения при хроматографии на бумаге в трех указанных выше системах, и сходством у.-ф. спектров как в кислоте, так и щелочной среде.

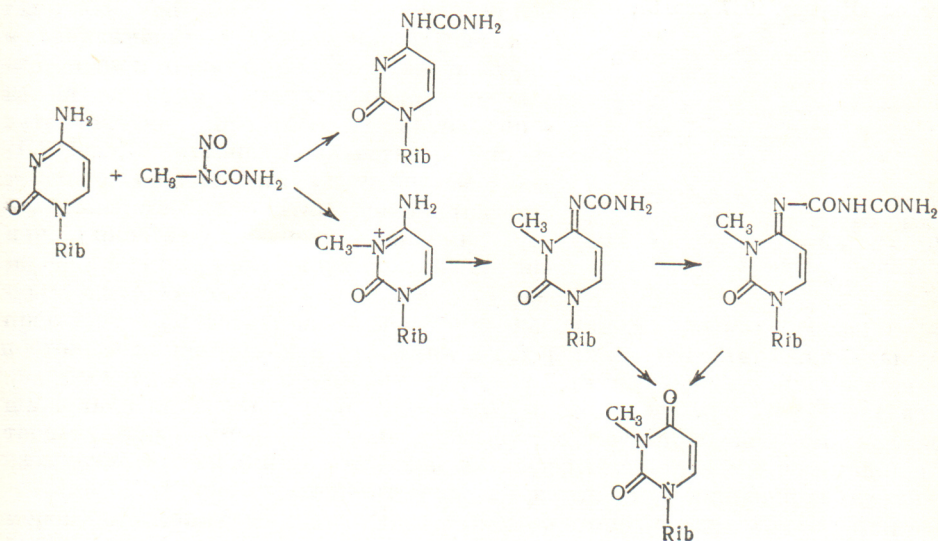
Вещества III и IV. Оба эти вещества сходят с колонки после II и, следовательно, имеют R_{K_a} промежуточное между R_{K_a} цитидина и II. Практически полная идентичность у.-ф. спектров этих соединений при всех pH указывает на одинаковое строение хромофорной системы этих соединений. У.-ф. спектр III и IV сходен со спектром II, с той разницей, что отсутствует сдвиг максимума поглощения в длинноволновую область при переходе к щелочным pH. Эти факты указывают, что, по-видимому, соединения III и IV являются производными II по N-1 азоту. III и IV гидролизуются гораздо легче II. Так, если III гидролизуется почти полностью за 1 час при 100° и pH 2,8, то II в этих условиях практически не из-

меняется. R_f продукта гидролиза вещества III во всех 3 системах и его у.-ф. спектр как в кислой, так и щелочной среде совпадает с R_f и у.-ф. спектром I и, следовательно, 1-метилцитидина. Указанные данные позволили приписать веществам III и IV следующие формулы:



Доказательством строения III является образование его при действии нитромочевины на 1-метилцитидин. Тождество продукта реакции НММ с цитидином и 1-метилцитидина с нитромочевинной доказано сравнением их поведения при хроматографии на бумаге и сходством у.-ф. спектров.

Таким образом, суммарная схема реакции НММ с цитидином заключается в следующем:



При замене НММ на НЭМ следует ожидать, что вследствие меньшей алкилирующей способности НЭМ количество образующихся соединений типа III и IV уменьшится. Опыт показал (рис. 1а), что в реакции образуется практически один карбамоилцитидин приблизительно в том же количестве, что и в случае НММ. Однако при увеличении молярного отношения НЭМ цитидин до 50 : 1 результаты реакции резко меняются. В реакционной массе практически не остается цитидина и образуются другие продукты, строение которых исследуется.

Все описанные выше опыты были проведены в условиях, далеких от биологических. Поэтому была поставлена специальная серия опытов. Смесь 0,1288 г НММ, 0,0608 г цитидина и 1 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 6,8 выдерживали 72 часа при 37° и затем подвергали хроматографии на сульфэтилцеллюлозе (рис. 1б). Как видно из профиля элюции и результатов сравнительной рехроматографии всех веществ из опытов а и б (рис. 1), при взаимодействии НММ с цитидином в фосфатном буфере pH 6,8 и 37° не образуется других веществ, кроме I, II, III и IV, однако резко возрастает количество образующегося вещества IV.

Таким образом, учитывая данные настоящей работы и данные работы (4), следует предположить, что в результате действия НММ цитидиновые

звенья ДНК могут превращаться в звенья самого различного строения: метилцитидиновые типа II, III и IV, которые, в свою очередь, подвергаясь гидролитическому распаду, превращаются в уридиновые и метилуридиновые звенья. Подобным образом могут, по-видимому, модифицироваться и другие звенья ДНК. По-видимому, именно это разнообразие протекаемых реакций и ответственно за высокий мутагенный эффект НАМ.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
12 I 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. М. Серебряный, М. А. Смотряева и др., ДАН, 185, 847 (1969).
² Л. Н. Матвиенко, А. М. Серебряный, ДАН, 187, 1169 (1969). ³ P. Wooskes, P. D. Lawley, J. Chem. Soc., 1962, 1348. ⁴ Р. Г. Костяновский, В. В. Якшин и др., Изв. АН СССР, сер. хим., 1968, 391. ⁵ H. T. Miles, *Biochim. et biophys. acta*, 22, 247 (1956). ⁶ Т. В. Венкстерн, А. А. Баев, Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонуклеиновых кислот, «Наука», 1967, стр. 37.