

ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE IN BIOLOGY

A. N. TIKHONOV

This is a brief review of biological applications of the EPR spectroscopy. The unique capabilities of the EPR method for studying of biological systems are illustrated by using of paramagnetic centers in the electron transport chain of high plant chloroplasts and a nitric oxide (NO) radical – the mediator of many biochemical and neural processes, as well as by using of EPR signals as a biological sensor of ionizing radiation.

Статья посвящена применению спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в исследованиях биологических систем. В качестве примеров рассмотрены парамагнитные центры в цепи электронного транспорта хлоропластов, радикал оксида азота (NO) – регулятора клеточного метаболизма, а также использование метода ЭПР в биодозиметрии.

ЭЛЕКТРОННЫЙ ПАРАМАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС В БИОЛОГИИ

А. Н. ТИХОНОВ

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

ВВЕДЕНИЕ

В 1944 году Евгений Константинович Завойский открыл явление электронного парамагнитного резонанса, которое заключается в том, что парамагнитные частицы, помещенные в постоянное магнитное поле, поглощают микроволновое электромагнитное излучение определенной (резонансной) частоты. Открытие электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) нашло разнообразные применения в физике, химии и биологии. В предыдущей статье [1] рассмотрены физические основы метода ЭПР. Настоящая статья посвящена биологическим применениям спектроскопии ЭПР, дающей уникальную возможность изучать поведение парамагнитных частиц в живых системах.

Почему вскоре после открытия явления ЭПР им заинтересовались ученые, работавшие в области биофизики и биохимии? Еще в конце 20-х годов известный американский биохимик Леонор Михаэлис высказал предположение, что в ходе окислительно-восстановительных процессов, протекающих в живой клетке, в качестве промежуточных продуктов биохимических реакций должны возникать свободные радикалы – молекулы с неспаренными электронами. Как известно, ковалентные химические связи между атомами в молекулах образуются за счет спаривания электронов, имеющих противоположные ориентации спина. Поэтому у большинства молекул с четным числом электронов суммарный магнитный момент равен нулю, такие молекулы диамагнитны. Если в ходе химических превращений (например, вследствие окислительно-восстановительных реакций или разрыва химических связей) у молекулы оказывается нечетное число электронов, то такая молекула приобретает свойства парамагнетика. В сложных биологических системах, состоящих из огромного числа разных молекул, относительное содержание парамагнитных молекул невелико. Связано это, в частности, с тем, что большинство свободных радикалов обладают повышенной реакционной способностью. Свободные радикалы легко вступают в химические реакции с различными внутриклеточными соединениями, в результате чего их времена жизни оказываются, как правило, очень короткими. Поэтому традиционными магнитометрическими методами было практически невозможно

следить за химическими превращениями парамагнитных молекул в сложных биологических системах. Положение изменилось с появлением метода ЭПР, позволившего избирательно детектировать и изучать электронное строение различных парамагнитных частиц.

Первые работы по исследованию биологических объектов методом ЭПР выполнены в середине 50-х годов. В 1954 году Барри Коммонер со своими сотрудниками (США) обнаружил сигналы ЭПР в биологических образцах. Это были лиофильно высушенные препараты печени и растений. В Европе первое исследование биологических объектов методом ЭПР было независимо выполнено в 1955 году Л.А. Блюменфельдом и его сотрудником А.И. Калмансоном. Эти пионерские исследования положили начало широкому применению метода ЭПР в биологии и медицине¹.

Развитию метода ЭПР в 50-х годах способствовало то обстоятельство, что в связи с практическими потребностями (в первую очередь для целей радиолокации) в то время интенсивно развивались области науки и техники, связанные с исследованием микроволнового электромагнитного излучения. Все основные элементы, необходимые для конструирования спектрометров ЭПР (генераторы электромагнитного излучения с длиной волны $\lambda \approx 3-10$ см, волноводы и др.), уже выпускались радиотехнической промышленностью, и поэтому их можно было легко приспособить для изготовления спектрометров ЭПР в лабораторных условиях. Однако первые спектрометры ЭПР имели невысокую чувствительность, поэтому в ранних работах изучали, как правило, лиофильно высушенные биологические образцы. Связано это было с тем, что вода, присутствующая в нативных биологических системах, интенсивно поглощает микроволновое излучение. Нерезонансное поглощение микроволнового излучения водой резко снижало чувствительность спектрометров ЭПР. Однако техника спектроскопии ЭПР непрерывно совершенствовалась, а вместе с этим расширялись возможности использования метода ЭПР в биологии. Современные спектрометры ЭПР позволяют изучать парамагнитные молекулы непосредственно в процессе функционирования нативных биологических систем на разных уровнях их структурно-функциональной организации, таких, как молекулы биополимеров, макромолекулярные комплексы и субклеточные структуры, клетки, отдельные органы животных и растений, а также целые организмы. Методом ЭПР можно изучать даже небольших животных (например, подопытных мышей), помещаемых в специально сконструированный резонатор спектрометра. В современных

¹ За выдающийся вклад в области биологических применений метода ЭПР Л.А. Блюменфельд был удостоен в 1995 году серебряной медали Международного общества ЭПР.

биофизических, биохимических и медико-биологических лабораториях высокочувствительные спектрометры ЭПР стали привычными инструментами научного исследования.

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И ПАРАМАГНИТНЫЕ ИОНЫ В ЭНЕРГОПРЕОБРАЗУЮЩИХ СИСТЕМАХ ЖИВОЙ КЛЕТКИ

Каким образом можно следить за превращениями химических соединений внутри клетки, содержащей огромное количество самых разных молекул? Еще задолго до широкого внедрения в практику биологических исследований метода ЭПР основным способом наблюдения за химическими превращениями молекул в клетке было измерение их оптических спектров. Спектры поглощения света разными молекулами, как правило, различаются. Кроме этого, оптические спектры молекул изменяются в результате химических превращений. Это дает возможность следить за функционированием некоторых биомолекул по их спектрам поглощения. Например, молекула гемоглобина меняет цвет при связывании кислорода (хорошо известно, насколько заметно отличаются по цвету венозная и артериальная кровь, которые по-разному насыщены кислородом). Однако далеко не за всеми внутриклеточными соединениями удается наблюдать оптическими методами. Так, например, в энергопреобразующих органеллах клеток растений и животных (хлоропласты и митохондрии) большинство молекул – переносчиков электронов не имеет столь отчетливых спектров поглощения, по которым можно было бы выделить их на фоне других молекул, сильно поглощающих свет.

С открытием ЭПР появились принципиально новые возможности в изучении сложных биоэнергетических систем. Метод ЭПР сыграл особую роль в исследовании структурно-функциональной организации цепей электронного транспорта энергопреобразующих органелл клетки. Известно, что запасание энергии в форме химической энергии макроэргических соединений связано с окислительно-восстановительными реакциями, среди которых особую роль играют процессы переноса электронов по цепям электронного транспорта (ЦЭТ) хлоропластов и митохондрий. Молекулы электронных переносчиков, входящих в состав ЦЭТ, в ходе окислительно-восстановительных превращений меняют магнитное состояние. Принимая или отдавая электрон, диамагнитная молекула переходит в парамагнитное состояние. При этом оказывается, что большинство электронных переносчиков, находясь в парамагнитном состоянии, дают хорошо различимые сигналы ЭПР. Методом ЭПР были обнаружены несколько новых компонентов в ЦЭТ хлоропластов и митохондрий, выяснена их роль в процессах преобразования энергии.

В качестве примера, иллюстрирующего применение метода ЭПР в биоэнергетике, рассмотрим

цепь электронного транспорта (ЦЭТ) хлоропластов – энергопреобразующих оргanelл растительной клетки. Строению и функционированию ЦЭТ хлоропластов посвящены статьи в “Соросовском Образовательном Журнале” [2, 3]. Напомним, что освещение хлоропластов приводит к появлению потока электронов, переносимых между различными компонентами ЦЭТ. В хлоропластах высших растений электронтранспортная цепь включает в себя несколько крупных белковых комплексов, встроенных в тилакоидную мембрану (рис. 1). За счет энергии света по этой цепи происходит последовательный перенос двух электронов от воды, разлагаемой в фотосистеме 2, к молекуле NADP⁺ – конечному акцептору электрона, получающему электроны от фотосистемы 1.

На рис. 1 вместе со схемой строения тилакоидной мембраны показаны сигналы ЭПР, которые дают некоторые компоненты ЦЭТ хлоропластов. Можно выделить несколько источников сигналов ЭПР, к которым относятся следующие молекулы.

1. Окисленные фотосинтетические реакционные центры фотосистем 1 и 2 (P₇₀₀⁺, P₆₈₀⁺), пластосемихинон (промежуточная форма пластохинона – переносчика, связывающего фотосистему 2 и b/f-комплекс), тирозиновый радикал (окисленная форма донора электрона для фотосистемы 2). Все эти

переносчики дают так называемые свободно-радикальные сигналы ЭПР.

2. Цитохромы – белковые переносчики электрона, у которых в активном центре содержится ион железа, способный принимать и отдавать электрон (Fe³⁺ + e⁻ ↔ Fe²⁺). Железо расположено в центре гема – химического соединения, образованного плоским порфириновым кольцом, которое ковалентно связано с белковой глобулой.

3. Ферредоксины – белки, активные центры которых содержат несколько атомов “негемового” железа. В активном центре молекулы ферредоксина находятся так называемые железо-серные кластеры, в которых ионы железа связаны с атомами серы (см. рис. 3).

4. Пластоцианин – водорастворимый белок, у которого в состав активного центра входит парамагнитный ион меди Cu²⁺.

5. Марганецсодержащий белок водорасщепляющего комплекса фотосистемы 2.

Из рис. 1 видно, что сигналы ЭПР, принадлежащие разным переносчикам, заметно различаются по форме спектра. Поэтому сигналы ЭПР могут служить своеобразными паспортами, позволяющими идентифицировать электронные переносчики и следить за их химическими превращениями.

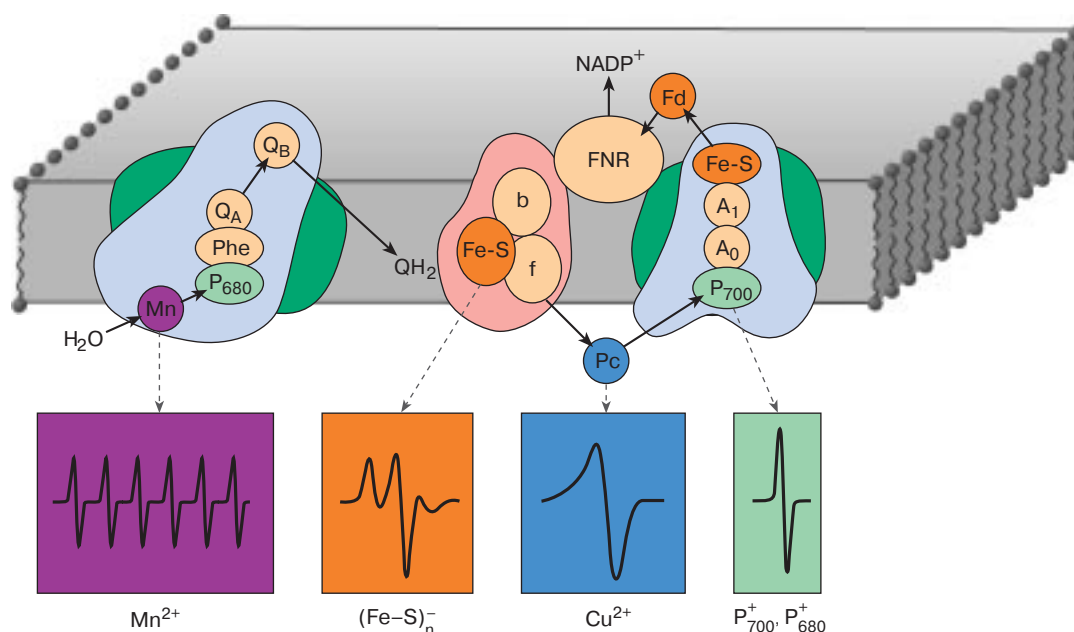
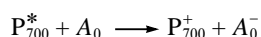


Рис. 1. Схема расположения электронных переносчиков в тилакоидной мембране хлоропласта и типичные спектры ЭПР электронных переносчиков. Сплошными стрелками показан путь переноса электронов от молекулы воды, разлагаемой фотосистемой 2, к молекуле NADP⁺ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат) – конечному акцептору фотосистемы 1. Пунктирные стрелки указывают на принадлежность сигналов ЭПР (показаны на вставках) электронным переносчикам, расположенным на различных участках цепи электронного транспорта: Mn-содержащий водорасщепляющий комплекс фотосистемы 2, восстановленные железо-серные центры, окисленный пластоцианин, окисленные реакционные центры фотосистемы 1 (P₇₀₀⁺) и фотосистемы 2 (P₆₈₀⁺)

Изучая изменения спектров ЭПР во время освещения хлоропластов, можно получить информацию о работе цепи электронного транспорта. Рассмотрим в качестве примера сигнал ЭПР от реакционных центров фотосистемы 1. Напомним, что фотосинтетические реакционные центры фотосистемы 1 (P_{700}) представляют собой специальную пару (димер) молекул хлорофилла, связанных с белком. Окисленные реакционные центры P_{700}^+ дают сигнал ЭПР, который обычно называют сигналом ЭПР 1. На рис. 2 показано, как изменяется величина этого сигнала при освещении хлоропластов. Сигнал ЭПР 1 возникает при освещении хлоропластов дальним красным светом ($\lambda \approx 700$ нм), который поглощается молекулами светособирающей антенны фотосистемы 1. Под действием этого света возбуждаются реакционные центры P_{700} . Возбужденные молекулы P_{700}^* , отдавая электроны первичным акцепторам A_0 фотосистемы 1, окисляются:



Окисленные реакционные центры P_{700}^+ являются парамагнитными, поэтому они дают сигнал ЭПР. Если затем осветить хлоропласты светом, возбуждающим обе фотосистемы (свет с длиной волны $\lambda \leq 700$ нм), то возникнет поток электронов от фотосистемы 2 к фотосистеме 1. В результате часть окисленных реакционных центров P_{700}^+ восстановится ($P_{700}^+ + e^- \longrightarrow P_{700}$). Восстановленные центры P_{700} диамагнитны, поэтому освещение хлоропластов светом, возбуждающим фотосистему 2, сопровождается потерей сигнала ЭПР 1 (рис. 2). Таким обра-

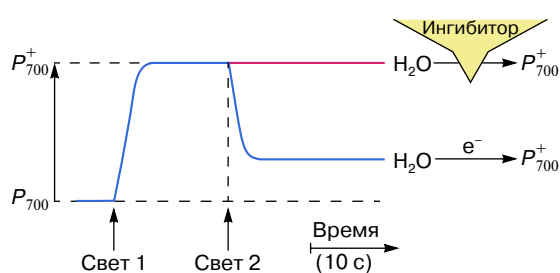


Рис. 2. Кинетика измерений сигнала ЭПР 1 от окисленных реакционных центров фотосистемы 1 (P_{700}^+) в хлоропластах бобов, вызванных действием света с различной длиной волны. Вертикальным стрелками показаны моменты включения света с длиной волны $\lambda \approx 707$ нм (свет, возбуждающий преимущественно фотосистему 1) и $\lambda \approx 650$ нм (свет, возбуждающий обе фотосистемы). Кривая синего цвета — функционально активные хлоропласты; красным цветом показаны хлоропласты, обработанные гербицидом диуроном (дихлордифенилдиметилмочевина) — ингибитором фотосистемы 2. Спад сигнала после включения света с $\lambda \approx 650$ нм обусловлен притоком электронов к окисленным реакционным P_{700}^+ от фотосистемы 2. Добавление ингибитора прерывает поток электронов между фотосистемами

зом, по поведению сигнала ЭПР 1 можно судить о функционировании цепи электронного транспорта.

Наблюдение за сигналом ЭПР 1 позволяет изучать влияние химических соединений и различных факторов внешней среды (температура, влажность, газовый состав) на работу фотосинтетического аппарата хлоропластов. Можно показать, например, что действие многих гербицидов, применяемых в сельском хозяйстве, обусловлено тем, что они подавляют активность фотосистемы 2 в хлоропластах растений. В результате этого нарушается работа цепи электронного транспорта и происходит ингибирование фотосинтеза, приводящее в конечном итоге к гибели растения. В качестве примера, иллюстрирующего действие гербицидов, обратимся вновь к рис. 2, на котором показано влияние диурона на поведение сигнала ЭПР 1. Добавление к хлоропластам гербицида диурона никак не препятствует появлению сигнала ЭПР 1 под действием света с $\lambda \approx 707$ нм, возбуждающего только фотосистему 1. Это означает, что диурон не влияет на работу фотосистемы 1. В то же время диурон прерывает поток электронов от фотосистемы 2 к фотосистеме 1. Это следует из того, что в присутствии диурона не наблюдается потери сигнала ЭПР в ответ на включение света с $\lambda \approx 650$ нм, возбуждающего фотосистему 2 (рис. 2). Таким образом, в присутствии диурона фотосистема 2 перестает быть донором электронов для окисленных центров P_{700}^+ . Такое действие гербицида обусловлено его прочным связыванием с фотосистемой 2. Занимая в фотосистеме 2 место молекулы пластохинона Q_B , молекула диурона прерывает поток электронов между двумя фотосистемами.

В хлоропластах можно наблюдать также сигнал ЭПР, принадлежащий окисленным реакционным центрам фотосистемы 2 (P_{680}^+). Однако этот сигнал виден лишь в специальных условиях, когда с помощью специфических ингибиторов блокирован приток электронов от воды к P_{680}^+ . Кроме этого, в хлоропластах можно зарегистрировать сигнал ЭПР (так называемый сигнал ЭПР 2) от окисленного переносчика Y_Z^+ , служащего донором электрона для P_{680}^+ . Источником этого сигнала является аминокислотный остаток тирозина, входящего в фотосистему 2.

Следует отметить одну методическую особенность. Для регистрации спектров ЭПР электронных переносчиков, у которых неспаренные электроны локализованы на ионах металлов (ферредоксины, цитохромы, пластоцианин, белок водорасщепляющего комплекса), приходится проводить измерения спектров ЭПР при достаточно низких температурах. Это связано с тем, что во многих биологических системах для парамагнитных ионов металлов наблюдается очень сильное тепловое взаимодействие неспаренного электрона с окружением (это явление называется спин-решеточной релаксацией, см. подробнее в статье [1]). В результате такого взаимодействия линия ЭПР уширяется и соответственно

уменьшается величина сигнала ЭПР. По этой причине в отличие от большинства органических свободных радикалов, которые дают хорошо различимые сигналы при комнатных температурах, большинство металлсодержащих электронных переносчиков при комнатных температурах дает настолько широкие сигналы, что они становятся практически невидимыми. Для наблюдения сигналов ЭПР от этих переносчиков необходимо ослабить спин-решеточное взаимодействие. Это можно сделать понизив температуру измерения (часто приходится понижать температуру измерения спектров ЭПР вплоть до 4–20 К). Используя этот прием, Р. Малкин и А. Берден в 1971 году обнаружили в цепи электронного транспорта хлоропластов новый переносчик. Этот белок принадлежит к числу ферредоксинов – электронных переносчиков, у которых в активном центре находятся атомы железа, окруженные атомами серы. Несколько раньше в лабораториях Б. Чанса, Х. Байнерта, Дж. Риске и Е. Слейтера были открыты подобные железо-серные парамагнитные центры, которые функционируют в цепи электронного транспорта митохондрий. В восстановленном состоянии железо-серные центры дают характерные сигналы ЭПР, по которым их можно легко идентифицировать. Строение активных центров двух типов железо-серных белков, содержащих соответственно по два и четыре атома железа на одну молекулу белка, показано на рис. 3. В этих центрах каждый атом железа окружен четырьмя атомами серы. Каждый из таких железо-серных центров независимо от количества содержащихся в нем атомов железа является переносчиком одного электрона.

В цепи электронного транспорта хлоропластов были выявлены пять разных железо-серных переносчиков электрона. Эти переносчики дают сигналы ЭПР, которые несколько отличаются по форме. Четыре молекулы железо-серных центров, называемые ферредоксинами, включены в цепь переноса электрона от первичных акцепторов фотосистемы I к NADP^+ – конечному акцептору электронов в ЦЭТ хлоропластов. Один железо-серный переносчик электрона находится в составе b/f -комплекса, зани-

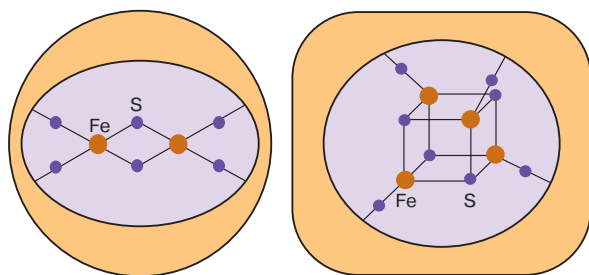


Рис. 3. Схемы строения активных центров железо-серных белков

мающего промежуточное положение между фотосистемой 2 и фотосистемой 1 (рис. 1).

Методом ЭПР было также доказано, что в работе ЦЭТ хлоропластов участвует медьсодержащий белок пластоцианин. Так же как и железосодержащие белки, пластоцианин является одноэлектронным переносчиком. В активном центре этого белка находится ион меди, принимающий электрон от b/f -комплекса ($\text{Cu}^{2+} + e^- \rightarrow \text{Cu}^+$). Восстановленный пластоцианин затем отдает электрон окисленному реакционному центру фотосистемы 1 ($\text{Cu}^+ + \text{P}_{700}^+ \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{P}_{700}$). В окисленном состоянии пластоцианин дает характерный сигнал ЭПР, типичный для ионов меди Cu^{2+} (рис. 1).

Кроме этого, при низких температурах в хлоропластах можно зарегистрировать шестикомпонентный сигнал ЭПР от ионов Mn^{2+} , входящих в каталитический центр водорасщепляющего комплекса. Ионы Mn^{2+} дают характерный сигнал ЭПР, состоящий из шести линий сверхтонкой структуры, обусловленных взаимодействием электронов с ядром атома марганца (спин ядра $J = 5/2$). При работе водорасщепляющего комплекса ионы марганца отдают электроны окисленным реакционным центрам фотосистемы 2 ($\text{Mn}^{2+} + \text{P}_{680}^+ \rightarrow \text{Mn}^{3+} + \text{P}_{680}$), накапливая положительные заряды (“дырки”), необходимые для разложения воды (см. [2, 3]). Измерения спектров ЭПР хлоропластов показали, что при работе водорасщепляющего комплекса действительно происходят изменения валентного состояния ионов марганца, связанные с работой фотосистемы 2. В хлоропластах можно также наблюдать сигналы ЭПР, принадлежащие цитохромам b и f , которые входят в состав b/f -комплекса.

Приведенные примеры показывают, как методом ЭПР удается проследить за путем движения неспаренного электрона по всей цепи электронного переноса в хлоропластах. При этом оказывается, что спектроскопия ЭПР является не только эффективным, но часто даже единственным методом наблюдения за окислительно-восстановительными превращениями электронных переносчиков. Именно так, методом ЭПР, впервые были обнаружены многочисленные железо-серные переносчики электронов в энергопреобразующих мембранах и доказано их участие в процессах преобразования энергии. Микроволновое излучение ($\lambda = 0,2\text{--}10$ см), используемое в спектрометрах ЭПР, проникает внутрь биологических тканей. Поэтому методом ЭПР можно следить за превращениями парамагнитных молекул внутри оптически плотных образцов. Последнее обстоятельство особенно важно при изучении электронтранспортных процессов в неразрушенных тканях, например в целом листе (или в его кусочке).

Естественно, что применения метода ЭПР не ограничиваются исследованием только фотосинтеза. Этот метод успешно используется для изучения и

других энергопреобразующих систем: митохондрий, хромофоров фотосинтезирующих бактерий, аэробных и анаэробных бактерий. Методом ЭПР исследуют электронное строение каталитических центров различных металлосодержащих ферментов, катализирующих многочисленные окислительно-восстановительные реакции в клетке.

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ЭПР

Применения метода ЭПР в биологии и медицине весьма разнообразны. Ежегодно в мире проводятся несколько международных симпозиумов и научных конференций, посвященных различным аспектам медико-биологических применений метода ЭПР. Однако в короткой статье не представляется возможным дать обзор всех основных направлений современных исследований в этой области, поэтому рассмотрим лишь два примера, иллюстрирующие возможности использования метода ЭПР в медико-биологических исследованиях.

Оксид азота в биологических системах. Двухатомная молекула оксида азота NO играет исключительно важную роль в качестве универсального регулятора клеточного и тканевого метаболизма. Многочисленные исследования последних лет показали, что молекула NO используется в системе регуляции кровяного давления, в развитии иммунной реакции и, вероятно, является важным биохимическим компонентом в системе долговременной памяти. Сравнительно недавно было обнаружено, что оксид азота является нейромедиатором, то есть выполняет роль переносчика сигналов в нервной системе. Установлено, в частности, что образование избыточного количества NO может быть связано с возникновением некоторых патологических состояний центральной нервной системы, включая судорожные расстройства. Понятно, почему все больший интерес к изучению свойств и механизмов регуляторного действия NO радикалов проявляют биохимики, физиологи и медики. Ученые были поражены тем, что такие важные функции в организме выполняет простая молекула двухатомного газа. Не случайно в 1992 году молекула NO была удостоена звания “Молекула года” [4].

Решающую роль в обнаружении NO в клетках и тканях различных животных и микроорганизмов сыграл метод ЭПР. Связано это с тем, что окись азота содержит неспаренный электрон (химическая формула этой молекулы $\cdot\text{N}=\text{O}$) и поэтому обладает парамагнитными свойствами, благодаря которым появление NO в клетке можно зарегистрировать по сигналу ЭПР. Молекула NO представляет собой короткоживущий радикал, который обладает высокой реакционной способностью, поэтому концентрация свободных молекул NO в клетке очень мала. Для улавливания NO радикалов обычно используют специальные химические ловушки, которые

связывают NO, образуя стабильные парамагнитные нитрозильные комплексы. Эти комплексы дают характерные сигналы ЭПР, по которым судят об образовании в клетках и тканях NO радикалов.

История открытия радикалов NO в биологических системах и выяснения их важной регуляторной роли весьма интересна и поучительна. Сигнал ЭПР, обусловленный радикалом NO, был открыт в нашей стране в 1963 году А.Ф. Ванин и Р.М. Налбандян, работавшие в то время в лаборатории Л.А. Блюменфельда в Институте химической физики АН СССР в Москве, обнаружили в пекарских дрожжах новый сигнал ЭПР (рис. 4), который имел вид дублета и среднее значение g -фактора, равное 2,03 (благодаря чему источник сигнала получил название “комплекс 2,03” [5]). Позже были обнаружены парамагнитные центры, дающие такой же сигнал ЭПР, в тканях животных. Первоначально авторы открытия предположили, что источником сигнала являются серные радикалы. Однако в ходе дальнейших исследований А.Ф. Ванин убедительно доказал, что “сигнал 2,03” принадлежит нитрозильным комплексам железа ($\text{Fe}-\text{NO}$). Сигналы ЭПР нитрозильных комплексов были обнаружены в различных биологических тканях и микроорганизмах. На основании полученных многочисленных экспериментальных данных А.Ф. Ванин предположил, что появление NO радикалов связано с определенными процессами клеточного метаболизма. Оказалось, что нарушения нормальных процессов жизнедеятельности приводят к увеличению концентрации “комплексов 2,03”. Впоследствии было доказано, что NO радикалы играют ключевую роль в регуляции многих важнейших биологических процессов, о которых шла речь выше. Метод ЭПР, позволяющий

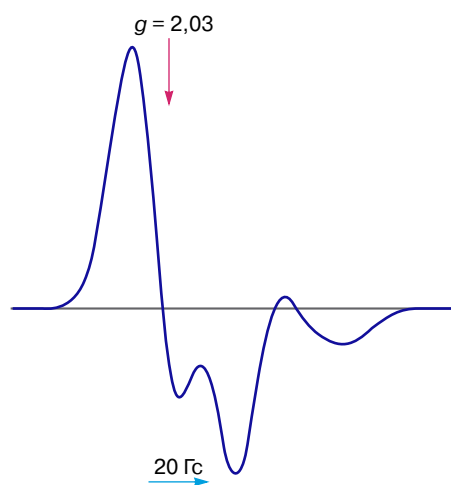


Рис. 4. Спектр ЭПР нитроксильного комплекса в печени кролика

регистрировать сигналы NO радикалов и их комплексов, сыграл в этом решающую роль¹.

Сигналы ЭПР, вызванные радиационными повреждениями. Наряду с биологическими парамагнитными центрами естественного происхождения, к которым, в частности, относятся рассмотренные электронные переносчики хлоропластов и NO радикалы, в биологических системах могут возникать парамагнитные центры, вызванные радиационными повреждениями биомолекул. Методом ЭПР были обнаружены свободные радикалы и ион-радикалы, появляющиеся под действием ионизирующего излучения в целых клетках и тканях, изолированных белках и нуклеиновых кислотах. Нет необходимости говорить о большой научной и практической значимости исследований в области радиационной биофизики. В рамках короткой статьи невозможно осветить все аспекты этой исключительно важной темы, поэтому ограничимся лишь одним примером практического применения метода ЭПР в области дозиметрии ионизирующих излучений.

Одной из важных практических задач радиационной биофизики является проведение биодозиметрических обследований населения, пострадавшего при радиоактивном загрязнении окружающей среды, в частности после аварии на Чернобыльской АЭС и многолетних испытаний ядерного оружия. Население, проживающее вблизи ядерных полигонов или аварийных АЭС, подвергалось неконтролируемому облучению ионизирующими излучениями, однако подавляющее большинство людей, как правило, не имели дозиметров. Поэтому в настоящее время приходится определять поглощенные дозы облучения ретроспективно, используя биодозиметры, созданные природой. В основе метода биодозиметрии лежит тот факт, что под действием ионизирующего излучения в некоторых биологических тканях и материалах накапливаются долгоживущие парамагнитные центры, количество которых пропорционально поглощенной дозе. Такие стабильные радиационно-индуцированные парамагнитные центры возникают, в частности, в эмали зубов и костях. Эмаль зубов имеет минеральную основу в виде изоморфных кристаллов апатита, в которую включены некоторые органические соединения. Образующиеся при радиационном облучении эмали зубов парамагнитные центры исключительно стабильны. По некоторым оценкам, их времена жизни составляют 10^9 лет! Это неудивительно, поскольку парамагнитные центры, возникающие при облучении в твердой минеральной основе эмали зубов, жестко фиксированы и не могут рекомбинировать друг с другом. Поэтому на протяжении всей жизни животных и человека в эмали их зубов на-

капливаются устойчивые парамагнитные центры, возникающие под действием ионизирующего излучения. Чем выше полученная доза, тем больше образуется таких парамагнитных центров. Иными словами, каждый человек, имеющий хотя бы один зуб, обладает своеобразным природным дозиметром ионизирующего излучения.

Дозу излучения, поглощенного эмалью зубов, нетрудно рассчитать, если с помощью спектрометра ЭПР измерить концентрацию радиационно-индуцированных парамагнитных центров. На рис. 5, а показан спектр ЭПР небольшого кусочка эмали зуба. На фоне сравнительно широкого сигнала, принадлежащего органическим компонентам (сигнал 1), выделяется более узкий сигнал, индуцированный радиационным облучением (сигнал 2). Величина узкого сигнала 2 от радиационных парамагнитных центров (РПЦ) определяется всей предысторией образца. У животных и людей, подвергшихся ионизирующему облучению, интенсивность этого сигнала выше, чем у животных и людей, которые на протяжении своей жизни подвергались лишь воздействию естественного фонового излучения. Интенсивность узкого сигнала 2, как видно из рис. 5, б,

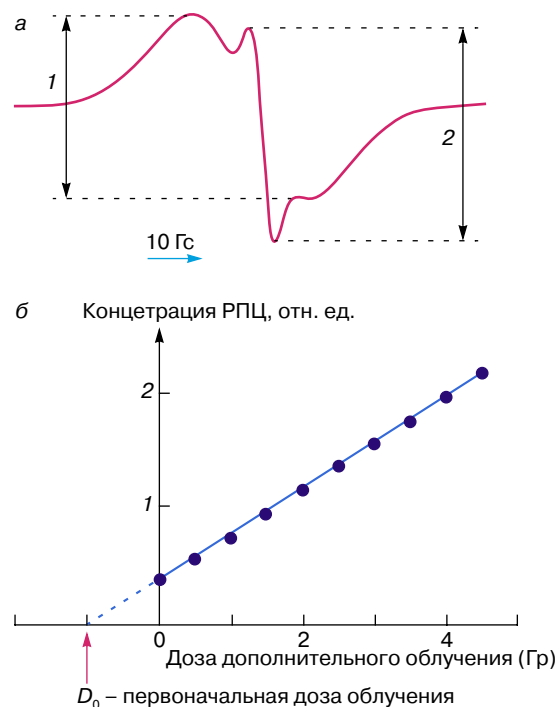


Рис. 5. Спектр ЭПР эмали зубов (а) и зависимость интенсивности радиационно-индуцированного сигнала 2 от дозы дополнительного ионизирующего облучения (б). Значение D_0 , полученное путем линейной экстраполяции зависимости сигнала 2 от дозы дополнительного облучения образца, соответствует дозе облучения, полученной организмом

¹ За выдающийся вклад в открытие и исследование сигналов ЭПР нитрозильных комплексов в биологических системах А.Ф. Ванин был удостоен в 1997 году серебряной медали Международного общества ЭПР.

возрастает прямо пропорционально дозе дополнительного облучения образца. Естественно, что индивидуальная чувствительность такого “зубного” дозиметра может быть различной у разных людей. Однако можно определить эту чувствительность используя зависимость интенсивности сигнала ЭПР в образце от дозы дополнительного облучения (рис. 5, б). Крутизна этой кривой пропорциональна радиационной чувствительности “зубного” дозиметра. Экстраполируя эту зависимость к нулевой величине сигнала I_0 , можно найти суммарную дозу излучения, поглощенного организмом к тому моменту времени, когда образец зубной эмали был взят для исследования. Таким образом, измеряя интенсивность радиационно-индуцированного сигнала ЭПР, можно определить дозу ионизирующего излучения, поглощенного организмом в течение всей его жизни. К сожалению, для того чтобы приготовить стандартный образец зубной эмали и провести соответствующие измерения методом ЭПР, пациенту обычно приходится жертвовать своим зубом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, мы рассмотрели некоторые примеры, показывающие, какую информацию о функционировании биологических систем можно получить методом ЭПР. Оказывается, что во многих случаях использование метода ЭПР является не только удобным, но часто и единственным способом узнать о протекании внутриклеточных процессов. Однако возможности метода не ограничиваются лишь измерениями собственных сигналов ЭПР от различных компонент исследуемой системы. Другое направление биологических применений метода ЭПР, которое активно развивается уже более трех десятилетий, заключается в использовании искусственных и некоторых природных парамагнитных соединений. Эти соединения вводят в исследуемую систему в качестве молекулярных зондов (такие мо-

лекулы обычно называют спиновыми метками или спиновыми зондами). Наблюдая за сигналами ЭПР парамагнитных зондов, можно следить за структурными перестройками биополимеров (белков и нуклеиновых кислот), макромолекулярных комплексов, биомембран и других надмолекулярных структур клетки. Применению спиновых меток для изучения структуры и молекулярной подвижности различных физико-химических и биологических систем будет посвящена следующая статья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блюменфельд Л.А., Тихонов А.Н. Электронный парамагнитный резонанс // Соросовский Образовательный Журнал. 1997. № 9. С. 91–99.
2. Тихонов А.Н. Трансформация энергии в хлоропластах – энергопреобразующих органеллах растительной клетки // Там же. 1996. № 4. С. 24–32.
3. Климов В.В. Окисление воды и выделение молекулярного кислорода при фотосинтезе // Там же. № 11. С. 9–12.
4. Koshland D.E., Jr. The Molecule of the Year // Science. 1992. Vol. 258. P. 1861.
5. Ванин А.Ф., Налбандян Р.М. Свободные радикалы нового типа в дрожжевых клетках // Биофизика. 1966. Т. 10. С. 167.

* * *

Александр Николаевич Тихонов, доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник кафедры биофизики физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: биофизика фотосинтеза, биоэнергетика, магнитная радиоспектроскопия. Автор трех книг (совместно с Л.А. Блюменфельдом, А.К. Кукушкиным, В.А. Твердисловым и Л.В. Яковенко) и более 130 статей в отечественных и зарубежных научных журналах.