

SPIN LABELS

A. N. TIKHONOV

Spin labels represent chemically stable paramagnetic molecules to be used as the molecular probes for testing structural properties and molecular mobility of different physical, chemical and biological systems. In this paper, we consider physical and chemical properties of spin labels, and their applications to the study of biopolymers and biomembranes.

Спиновые метки – химически стабильные парамагнитные молекулы, которые используются в качестве молекулярных зондов для изучения структуры и молекулярной подвижности различных физико-химических и биологических систем. В статье рассмотрены строение и физико-химические свойства спиновых меток, приведены примеры их использования для изучения структурных перестроек биополимеров и строения биомембран.

© Тихонов А.Н., 1998

СПИНОВЫЕ МЕТКИ

А. Н. ТИХОНОВ

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

ВВЕДЕНИЕ

В статье рассмотрены свойства химически стабильных парамагнитных соединений, получивших название спиновых меток, которые нашли широкое применение в молекулярной физике, химии и биологии. Суть метода спиновых меток заключается в следующем. В исследуемую систему вводят в качестве спиновых зондов парамагнитные молекулы, которые дают характерные сигналы электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Сигналы ЭПР спиновых меток зависят от их молекулярной подвижности и физико-химических свойств ближайшего окружения. Поэтому, наблюдая за сигналами ЭПР молекулярных зондов, можно изучать структурные характеристики исследуемой системы и динамику происходящих в ней молекулярных процессов. Термин “спиновые метки” происходит от английского слова “spin” (веретено, волчок), которым называют собственный механический момент электрона. Электрон, как известно из квантовой механики, обладает механическим моментом, равным величине $\hbar/2$, и собственным магнитным моментом $\mu_B = \frac{e\hbar}{2mc}$, где \hbar – постоянная Планка, e и m – заряд и масса электрона, c – скорость света. Парамагнитные свойства молекулярных зондов определяются наличием в них неспаренного электрона, обладающего спином и являющегося источником сигнала ЭПР [1].

Идея использования парамагнитных соединений в качестве молекулярных зондов для исследования свойств вещества появилась в 60-х годах после того, как А.Б. Нейман из Института химической физики АН СССР (Москва) предложил метод синтеза химически стабильных свободных радикалов на основе нитроксильных радикалов. Вскоре такие радикалы были синтезированы и началось их широкое использование при изучении различных физико-химических систем. Особенно большое применение спиновые метки нашли при исследовании биологических систем на самых разных уровнях их структурной и функциональной организации (белки и сложные белковые комплексы, биомембраны, субклеточные органеллы, клетки, ткани и органы). Среди пионеров метода спиновых меток в биологии следует назвать известного американского физикохимика Х. Мак-Коннелла и советских ученых А.Л. Бучаченко, А.Н. Кузнецова, Г.И. Лихтенштейна и многих других.

СТАБИЛЬНЫЕ НИТРОКСИЛЬНЫЕ РАДИКАЛЫ

Химическое строение нитроксильных радикалов

В качестве спиновых меток обычно используют стабильные нитроксильные радикалы. Все молекулы спиновых меток, несмотря на разнообразие их химического строения, как правило, содержат одинаковый парамагнитный фрагмент — химически стабильный нитроксильный радикал ($>N-O\bullet$). На этом радикале локализован неспаренный электрон, служащий источником сигнала ЭПР. Конкретный выбор спиновых меток определяется задачей исследования. Так, например, для того чтобы с помощью спиновых меток следить за конформационными перестройками белков, молекулы метки обычно “пришивают” к определенным участкам белка. В этом случае спиновая метка должна содержать специальную реакционную группу, которая может образовывать ковалентную химическую связь с аминокислотными остатками молекулы белка. Для изучения свойств искусственных и биологических мембран обычно используют жирорастворимые спиновые метки, способные встраиваться в липидный слой мембраны.

На рис. 1 показано химическое строение одной из наиболее простых спиновых меток — молекулы 1,1,4,4-тетраметилпиперидиноксила. Неспаренный электрон схематически изображен в виде электронного облака, образованного атомными орбиталями двух типов: сферической *s*-орбиталью и гантелеобразной *p*-орбиталью. Химическую формулу нитроксильного радикала можно представить в виде двух валентных структур — *A* и *B*, соответствующих различной локализации неспаренного электрона. Одна из них (структура *A*) относится к случаю, когда неспаренный электрон находится на атоме кислорода ($>N-O\bullet$), а другая (структура *B*) соответствует

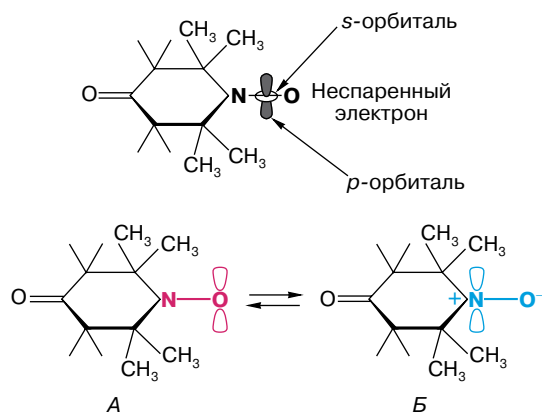
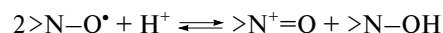


Рис. 1. Химическое строение спиновой метки: *A* и *B* — две валентные структуры нитроксильного радикала

локализации неспаренного электрона на атоме азота ($>^+N\bullet-O^-$). Происхождение этих структур можно пояснить следующим образом. В первом случае (структура *A*) три электрона из пяти, находящиеся на внешней оболочке атома азота, образуют три химические связи (две с атомами углерода и одну с атомом кислорода), а два электрона образуют неподеленную пару. Таким образом, все электроны, локализованные на атоме азота, оказываются спаренными. При этом двухвалентный атом кислорода, который образует лишь одну ковалентную связь с атомом азота, сохраняет один неспаренный электрон. Вторая структура (*B*) относится к случаю, когда один из электронов атома азота перемещается к атому кислорода. В результате этого на положительно заряженном азоте остается один неспаренный электрон, а у отрицательно заряженного кислорода все электроны оказываются спаренными. В действительности имеет место суперпозиция этих двух валентных структур. Можно считать, что одну часть времени молекула находится в валентном состоянии *A*, а другую — в состоянии *B*, иными словами, существует динамическое равновесие $A \rightleftharpoons B$, когда электрон постоянно перемещается между атомами кислорода и азота. В квантовой химии это явление называется резонансом. Такое представление об электронном строении нитроксильного радикала, как мы увидим ниже, оказывается полезным для объяснения формы сигналов ЭПР спиновых меток в зависимости от полярности среды, окружающей радикал.

Хорошо известно, что свободные радикалы обладают повышенной реакционной способностью. Так, например, в результате взаимодействия двух нитроксильных радикалов (реакция диспропорционирования)



они превращаются в диамагнитные молекулы, которые не дают сигналов ЭПР. Нитроксильные радикалы способны реагировать с другими соединениями, в результате чего они также могут терять парамагнитные свойства. Поэтому основное требование, предъявляемое к спиновым меткам, заключается в химической стабильности нитроксильного радикала, которая исключала бы потерю парамагнетизма. Обычно это достигается тем, что в молекуле спиновой метки парамагнитный фрагмент окружен метильными группами ($-CH_3$), ограничивающими сближение группы $>N-O\bullet$ с другими реакционноспособными соединениями. Благодаря такой защите нитроксильного радикала спиновые метки могут в течение длительного времени (годами) сохранять парамагнитные свойства.

Спектры ЭПР нитроксильных радикалов

Спиновые метки дают характерные сигналы ЭПР, которые весьма чувствительны к изменениям

их молекулярной подвижности и физико-химических свойств среды, окружающей нитроксильный радикал. Для того чтобы понять, какую информацию можно получить из формы спектра ЭПР, рассмотрим подробнее схему энергетических уровней неспаренного электрона в молекуле спиновой метки (рис. 2).

При отсутствии внешнего магнитного поля энергия свободного электрона не зависит от его ориентации в пространстве. При включении внешнего магнитного поля \vec{H}_0 происходит расщепление уровня энергии электрона на два подуровня, соответствующих двум противоположным ориентациям спина электрона – по направлению магнитного по-

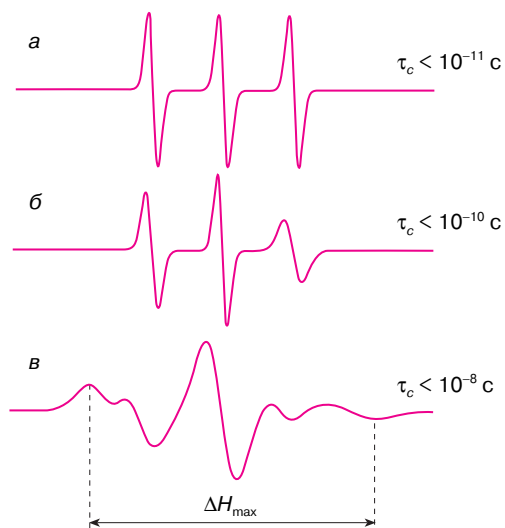
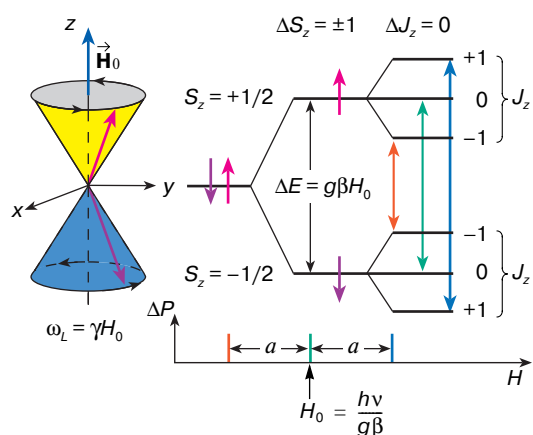


Рис. 2. Схема энергетических уровней неспаренного электрона в молекуле спиновой метки. Индуцируемые переменным магнитным полем \vec{H}_1 переходы между энергетическими уровнями неспаренного электрона должны удовлетворять квантовомеханическим правилам отбора: $\Delta S_z = \pm 1$ и $\Delta J_z = 0$; а–в – спектры ЭПР для разных времен вращательной корреляции нитроксильного радикала

ля ($S_z = +1/2$) и против поля ($S_z = -1/2$). Это явление называется эффектом Зеемана. В молекуле спиновой метки неспаренный электрон локализован вблизи ядра азота, который имеет собственный магнитный момент $\vec{\mu}_N$. Поэтому к внешнему магнитному полю \vec{H}_0 , действующему на неспаренный электрон, добавляется магнитное поле, создаваемое магнитным моментом $\vec{\mu}_N$ ядра азота. Ядро азота имеет спин $J = 1$, поэтому, согласно законам квантовой механики, магнитный момент ядра азота $\vec{\mu}_N$ может иметь три ориентации: по направлению, перпендикулярно и против внешнего магнитного поля ($J_z = +1, 0, -1$). Следовательно, за счет взаимодействия неспаренного электрона с ядром азота каждый из зеемановских уровней энергии неспаренного электрона расщепится на три подуровня (рис. 2). Это явление называется сверхтонким взаимодействием. Индуцируемые микроволновым излучением переходы между энергетическими уровнями должны удовлетворять квантовомеханическим правилам отбора: $\Delta S_z = \pm 1$ (ориентация спина электрона изменяется) и $\Delta J_z = 0$ (ориентация ядерного спина сохраняется). Таким образом, в результате сверхтонкого взаимодействия в спектре ЭПР нитроксильного радикала появятся три линии, соответствующие трем возможным ориентациям магнитного момента ядра азота ($J_z = -1, 0, +1$, см. рис. 2).

В простейшем случае, когда молекулы нитроксильных радикалов находятся в разбавленном растворе и совершают быстрое изотропное вращение, их спектр ЭПР (зависимость поглощения микроволнового излучения ΔP от магнитного поля H , рис. 2) действительно представляет собой триплет – три сравнительно узкие линии, отстоящие друг от друга на расстоянии a . Параметр сверхтонкой структуры a определяется эффективностью взаимодействия неспаренного электрона с ядром азота. Однако наблюдаемый сигнал ЭПР спиновых меток часто имеет гораздо более сложный вид, который в общем случае зависит от ориентации, подвижности и полярности окружения парамагнитного зонда.

Почему форма спектра ЭПР зависит от ориентации радикала? Связано это с тем, что расстояние между электронными подуровнями зависит от угла θ между направлениями постоянного магнитного поля \vec{H}_0 и p -орбитали неспаренного электрона. Взаимодействие p -орбитали неспаренного электрона с ядром азота можно рассматривать как взаимодействие двух магнитных диполей. Эффективность диполь-дипольного взаимодействия, как известно, зависит от расстояния r между магнитными моментами неспаренного электрона ($\vec{\mu}_e$) и ядра азота ($\vec{\mu}_N$), а также от угла θ между ними:

$$\Delta E_{eN} = -(\vec{\mu}_e \cdot \vec{\mu}_N) \propto \frac{1}{r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta).$$

Расстояние между электронными подуровнями сверхтонкой структуры максимально, если ориентация молекулы зонда такова, что p -орбиталь неспаренного электрона параллельна вектору внешнего магнитного поля \vec{H}_0 . Если в образце имеются парамагнитные молекулы с различной пространственной ориентацией, то наблюдаемый спектр ЭПР будет представлять сумму спектров, принадлежащих всем этим молекулам. В результате такого усреднения по всем возможным углам ориентации молекул вместо простого сигнала из трех узких линий получится спектр ЭПР более сложного вида (спектр на рис. 2, в).

Вид спектра ЭПР зависит также от молекулярной подвижности спиновых меток. Благодаря этому по форме спектра ЭПР можно определить скорость вращательного движения метки. Чтобы пояснить сказанное, рассмотрим два крайних случая: быстрое и медленное вращение метки. При быстром хаотическом движении нитроксильного радикала наблюдаемый спектр ЭПР состоит из трех узких линий (рис. 2, а). Это обусловлено тем, что при очень быстром вращении радикалов полностью усредняется анизотропное (зависящее от ориентации) взаимодействие между неспаренным электроном и ядром азота. Если характерное время τ_c поворота метки на угол $\varphi = 90^\circ$ (параметр τ_c называется временем вращательной корреляции) существенно короче времени $\tau_{эл}$ перехода электрона между двумя энергетическими уровнями, то произойдет усреднение анизотропного взаимодействия. Действительно, все быстро движущиеся молекулы, у которых время вращательной корреляции $\tau_c \ll \tau_{эл}$, оказываются как бы в равном положении — за время электронного перехода $\tau_{эл}$ каждая из них успеет многократно изменить свою ориентацию. Поэтому в масштабе времени $\tau_{эл}$ быстро движущиеся молекулы метки будут практически неразличимы, а это значит, что каждая из них будет давать одинаковый сигнал ЭПР — три сравнительно узкие линии сверхтонкой структуры. В этом случае величина сверхтонкого расщепления a будет определяться лишь изотропным (не зависящим от ориентации) взаимодействием сферически симметричной s -орбитали неспаренного электрона с ядром азота (см. рис. 1, на котором показано распределение электронной плотности неспаренного электрона). Время $\tau_{эл}$ не трудно оценить, если известна длина волны λ микроволнового излучения, индуцирующего переходы между энергетическими уровнями. Очевидно, что $\tau_{эл} \approx \lambda/c$, где c — скорость света. Для спектрометров ЭПР, в которых используется излучение с длиной волны $\lambda \approx 3$ см, получается $\tau_{эл} \approx 10^{-10}$ с.

В другом крайнем случае — при медленном вращении молекул метки ($\tau_c \gg \tau_{эл} \approx 10^{-10}$ с) такого усреднения не происходит, поскольку за время электронного перехода $\tau_{эл}$ ориентация каждого из радикалов остается практически неизменной. В этом случае

наблюдается сложный спектр ЭПР, который представляет собой сумму сигналов ЭПР от молекул метки, имеющих различную ориентацию в пространстве (рис. 2, в). Таким образом, по форме спектра ЭПР можно судить о характере движения спиновых меток. Существует хорошо разработанная теория, которая устанавливает количественную связь между подвижностью и ориентированностью в пространстве нитроксильных радикалов и формой их спектров ЭПР [2–5].

Спектр ЭПР спиновой метки зависит также от полярности среды, окружающей нитроксильный радикал. Если молекулы растворителя, в котором находится метка, обладают дипольным моментом, то такая среда называется полярной. К числу полярных растворителей относится вода, молекулы которой имеют сравнительно большой дипольный момент (отрицательный заряд локализован на атоме кислорода, положительные заряды — на атомах водорода). Если у молекул растворителя отсутствует дипольный момент, то такой растворитель называется неполярным (например, этиловый спирт). Не трудно понять, почему полярность окружения влияет на спектр ЭПР нитроксильного радикала, если вспомнить, что вклад валентных структур A и B (рис. 1), описывающих нитроксильный радикал, зависит от полярности среды, окружающей радикал. Для молекул зонда, растворенных в полярной среде (например, в водном растворе), вклад “полярной” структуры B , представляющей собой электрический диполь, будет выше, чем в неполярной среде (например, для метки в спиртовом растворе). Поэтому в полярной среде неспаренный электрон будет сильнее взаимодействовать с парамагнитным ядром азота, чем в неполярной среде. В результате этого расщепление электронных уровней (и соответственно расстояние между линиями сверхтонкой структуры в спектре ЭПР) для молекул метки, растворенных в полярной среде, будет больше, чем для молекул метки, находящихся в неполярной (гидрофобной) среде.

Описанные выше свойства нитроксильных радикалов — зависимость формы спектра от подвижности и окружения метки — широко используются в практике физических, химических и медико-биологических исследований. Ниже мы рассмотрим лишь некоторые примеры, иллюстрирующие возможности применения метода спиновых меток в биологии.

СПИНОВЫЕ МЕТКИ КАК ИНДИКАТОРЫ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕСТРОЕК МАКРОМОЛЕКУЛ

Функционирование большинства биологических макромолекул (белки, нуклеиновые кислоты) сопровождается их структурными перестройками. Спиновые метки оказались удобными молекулярными зондами, с помощью которых можно следить за конформационными перестройками биополимеров.

Суть метода заключается в том, что молекулы метки химическим путем “пришивают” к определенным группам макромолекул, а затем по форме спектра ЭПР наблюдают за изменениями молекулярной подвижности спиновой метки, обусловленными структурными перестройками в макромолекуле.

Для иллюстрации сказанного мы обратимся к рис. 3, на котором схематически изображена макромолекула (это может быть, например, белок), к изгибу которой ковалентно присоединена спиновая метка. В левой части рисунка показана молекула белка в “открытой” конформации (состояние А). В этом случае спиновая метка обладает сравнительно высокой подвижностью, совершая быстрые вращения внутри конуса с углом θ_1 вокруг “ножки”, связывающей ее с белком. Если в ходе функционирования белка изменяется его конформация, то при этом также может измениться подвижность метки, связанной с белком. Так, например, при переходе макромолекулы в “закрытую” конформацию Б, которая схематически изображена на рис. 3, метка оказывается зажатой в узкой щели, в результате чего ее движение становится заторможенным. Форма спектра ЭПР медленно вращающейся метки отли-

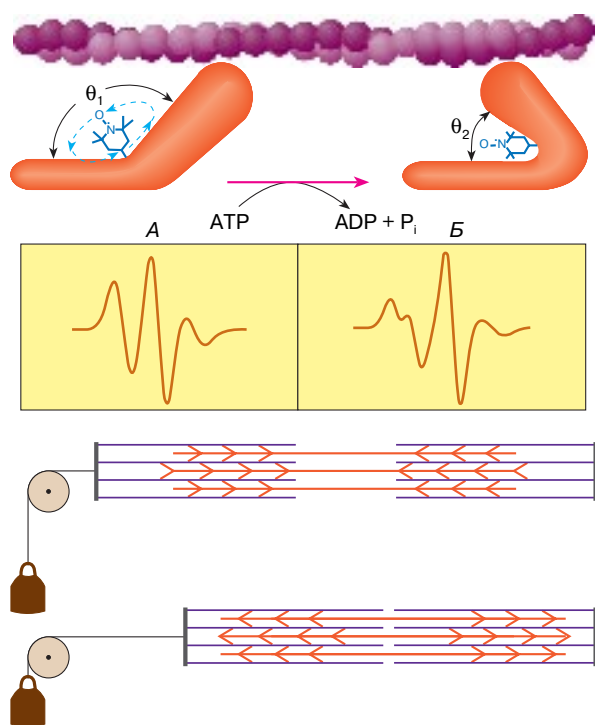


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая использование спиновых меток для изучения структурных перестроек белков. В нижней части рисунка дано схематическое изображение фрагмента мышечного волокна: А, Б – спектры ЭПР спиновой метки, связанной с белком, имеющим “открытую” (А) или “закрытую” (Б) конформацию

чается от формы спектра свободно вращающейся метки (см. рис. 3). Таким способом, наблюдая за изменением спектра ЭПР спиновой метки можно зарегистрировать изменение конформации макромолекулы белка.

Структурные изменения белка, подобные тем, которые схематически изображены на рис. 3, были обнаружены при работе миозина – белка, играющего ключевую роль в мышечном сокращении. В мышечном волокне поперечнополосатых мышц молекулы миозина, как известно, образуют толстые нити, которые с помощью специальных мостиков зацепляются за тонкие нити актина (рис. 3). Конформационные перестройки в миозине вызывают изменение угла наклона этих мостиков относительно нитей актина, в результате чего возникает скольжение нитей миозина и актина друг относительно друга, приводящее в конечном итоге к сокращению мышцы. Источником энергии, обеспечивающей такие структурные перестройки, служит энергия, выделяемая при гидролизе молекулы АТФ миозином (миозин является АТФазой – ферментом, катализирующим гидролиз АТФ). Опыты с использованием спиновых меток, выполненные еще в начале 70-х годов в нашей стране (Э.К. Рууге с сотрудниками) и в США (Дж. Гергели), наглядно доказали существование конформационных перестроек молекулы миозина задолго до того, как было выяснено детальное молекулярное строение головки миозина и методом рентгеноструктурного анализа изучена динамика структурных изменений в мышечном волокне. Свидетельством энергозависимых структурных перестроек в молекуле миозина послужил тот факт, что реакция гидролиза АТФ миозином сопровождается изменением спектра ЭПР спиновой метки (рис. 3), “пришитой” химическим путем к подвижной головке молекулы миозина.

В короткой статье нет возможности упомянуть о всем разнообразии исследований биополимеров с помощью спиновых меток. Спиновые метки широко используются для изучения динамики биополимеров в растворах и составе сложных макромолекулярных комплексов, то есть в условиях, наиболее близких к естественным. Тем самым метод спиновых меток удачно дополняет другие физические методы исследования биополимеров, такие, как рентгеноструктурный анализ и ядерный магнитный резонанс.

ПРИМЕНЕНИЕ СПИНОВЫХ МЕТОК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Спиновые метки оказались одним из самых удобных инструментов для изучения структурно-функциональных свойств искусственных и биологических мембран. Для этой цели чаще всего используют жирорастворимые спиновые метки, которые сравнительно легко встраиваются в мембрану и поэтому становятся чувствительными индикаторами

происходящих в них структурных изменений. На рис. 4, А показано схематическое расположение в бислоидной липидной мембране двух таких меток — спин-меченых производных стеариновой кислоты. Отрицательно заряженная карбоксильная группа COO^- стеариновой кислоты не проникает внутрь мембраны и удерживается вблизи ее поверхности, в то время как электронейтральный жирорастворимый “хвост” молекулы оказывается втянутым в липидный бислоид мембраны. Используя набор спиновых меток, у которых парамагнитные фрагменты “пришиты” к различным участкам стеариновой кислоты, можно зондировать строение липидного бислоя на разной глубине.

В качестве меры упорядоченности молекул в мембране обычно используют величину “параметра порядка” S , значение которого можно вычислить по форме спектра ЭПР. Если все молекулы имеют строго одинаковую ориентацию, то $S = 1$; в системе

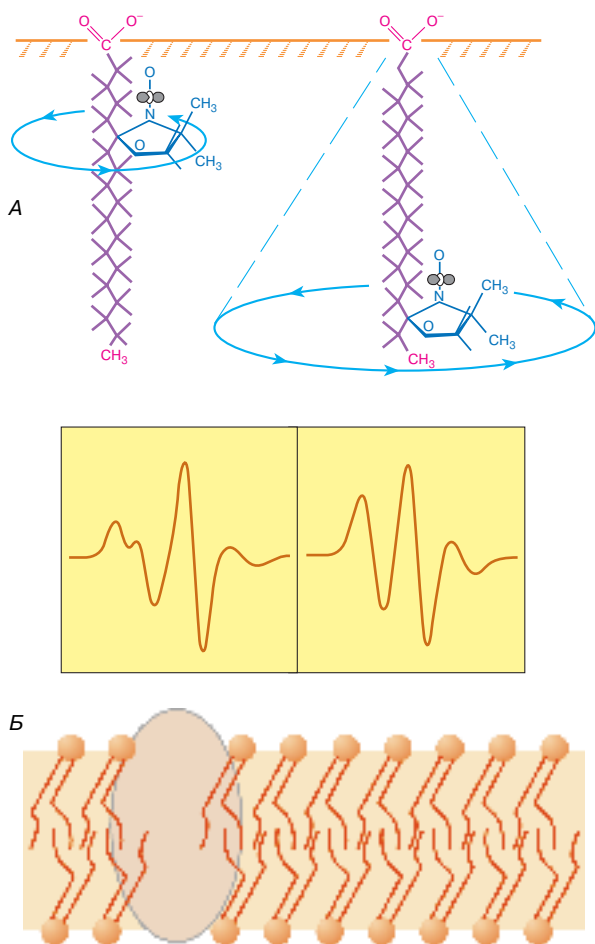


Рис. 4. А — схема расположения в мембране и спектры ЭПР липидорастворимых спиновых меток — производных стеариновой кислоты; Б — схематическое изображение профиля упорядоченности углеводородных цепей липидов в мембране

с хаотическим распределением молекул в пространстве величина $S = 0$. С помощью спиновых меток было показано, что липидные мембраны имеют неоднородный профиль “жесткости” — вблизи от поверхности мембраны углеводородные цепи липидов упорядочены, в то время как по мере удаления в глубь мембраны степень их ориентированности заметно уменьшается (рис. 4, Б).

С помощью спиновых меток были изучены различные искусственные и биологические мембраны. Один из наиболее важных результатов этих исследований заключается в том, что удалось выявить взаимосвязь между физическим состоянием липидов и функциональными свойствами мембран. Структурно-функциональные связи в биомембранах наиболее четко проявляются при исследовании влияния температуры на поведение меток в биомембранах. Дело в том, что при изменении температуры в мембранах происходят события, подобные хорошо известному в физике явлению фазового перехода. С повышением температуры наблюдается постепенное “разжижение” липидной матрицы мембраны, а при достижении определенного интервала температур наступает “плавление” мембраны. Это явление напоминает фазовые переходы, которые происходят, например, при плавлении льда или растапливании сливочного масла. Такое “плавление” мембраны сопровождается резким увеличением подвижности мембранных компонент и проявляется обычно в виде характерных изломов на графиках температурных зависимостей различных параметров спектров ЭПР.

В качестве примера, иллюстрирующего структурно-функциональные связи в биомембранах, рассмотрим тилакоидные мембраны хлоропластов — энергопреобразующих органелл растительной клетки. На рис. 5 показаны температурные зависимости одного из параметров спектра (расстояние между внешними пиками сигнала ЭПР — параметр ΔH_{\max} для спиновой метки, встроенной в тилакоидные мембраны хлоропластов огурца и дыни). В обоих случаях с ростом температуры величина ΔH_{\max} уменьшается. Это означает, что с ростом температуры увеличивается подвижность углеводородных цепей липидов и уменьшается степень их ориентированности в мембране. При этом наблюдаются характерные изломы на графиках температурных зависимостей при 24°C (огурец) и 35°C (дыня), которые отражают изменения физического состояния тилакоидных мембран, обусловленные переходом мембранных липидов из твердокристаллического в жидкокристаллическое состояние. Примечательно, что при этих же температурах хлоропласты огурца и дыни проявляют максимальную функциональную активность. Различие в температурах структурного перехода для мембран хлоропластов огурца и дыни, которые произрастают в разных климатических зонах, отражает тот факт, что их мембраны имеют оптимальную “жесткость” при разных температурах.

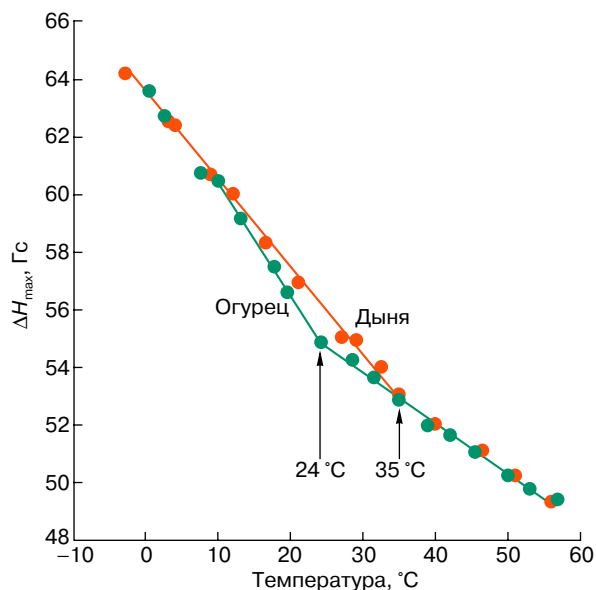


Рис. 5. Температурные зависимости параметра ΔH_{\max} спектра ЭПР спиновой метки, локализованной в липидном бислое мембран хлоропластов огурца и дыни

Можно предположить, что это обусловлено неодинаковым составом мембранных липидов. Регулируя физические свойства липидного бислоя (жесткость мембраны) с помощью специальных ферментов, которые влияют на степень насыщенности углеводородных цепей липидов, хлоропласты могут адаптироваться к изменениям температуры окружающей среды.

Приведенный пример показывает, как, пользуясь методом спиновых меток, биофизик может отличить лист огурца от листа дыни. Разумеется, на практике вряд ли кто будет дегустировать овощи и фрукты методом ЭПР. Однако использование спиновых меток позволяет проникнуть в глубь биологических мембран и выявить важные закономерности их функционирования. Другим примером такого использования спиновых меток служат опыты по изучению роли цитоплазматических мембран в сохранении целостности клеток при длительном хранении семян.

Зрелые семена высших растений, как известно, могут храниться в сухом виде, но со временем они теряют всхожесть. Проблема сохранения всхожести семян имеет важное практическое значение. Существует предположение, что одной из главных причин потери всхожести семян является нарушение целостности цитоплазматических мембран. Мембрана клетки выполняет роль барьера, отделяющего содержимое клетки от внешней среды. Поэтому если в мембранах появляются какие-либо дефекты (например, разрывы, поры), сквозь которые из набухающих клеток зародыша уходят наружу жизненно

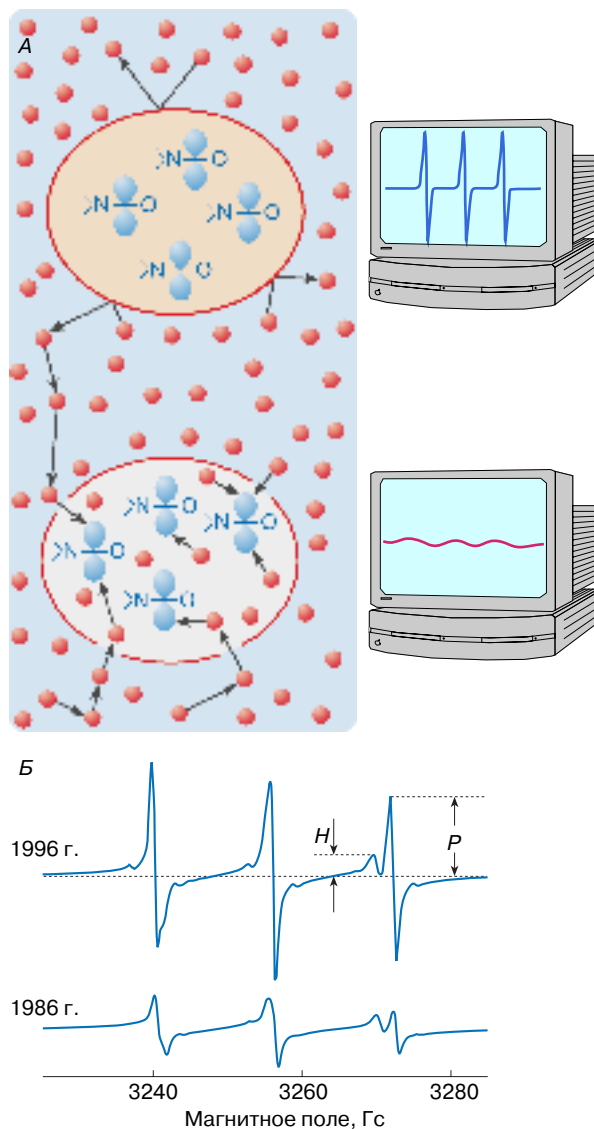


Рис. 6. А – схема опыта по проверке целостности клеточных мембран методом спиновых меток. Красные шарики символизируют парамагнитные ионы $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (феррицианид), которые не проникают внутрь целой клетки (вверху), но попадают внутрь клетки с нарушенной мембраной (внизу). Столкновения феррицианида с молекулами спиновой метки вызывают уширение спектра ЭПР; Б – спектр ЭПР спиновой метки в клетках зародыша из семян пшеницы. Химическая формула этой метки показана на рис. 1. Компоненты спектра Н и Р принадлежат молекулам метки, локализованным соответственно внутри мембраны и в цитоплазме. Разделение спектра на компоненты Р и Н обусловлено влиянием полярности среды на эффективность сверхтонкого взаимодействия. Компонента Р наблюдается в клетках зародыша из жизнеспособных семян (урожай 1996 года), но почти отсутствует в клетках старых семян (урожай 1986 года), у которых целостность мембран нарушена

важные компоненты, то семена теряют всхожесть. Как с помощью спиновых меток можно узнать о том, что в цитоплазматической мембране появились дефекты? Известно, что мембрана плохо пропускает крупные заряженные частицы, такие, например, как парамагнитные анионы красной кровяной соли $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Поэтому, чтобы узнать, не потеряла ли мембрана свои барьерные функции, можно просто проверить, задерживает ли мембрана проникающие заряженные частицы внутри клетки. Для этого обычно пользуются следующим приемом (схема опыта на рис. 6, А). Спиновую метку “загружают” внутрь клеток, а затем образец помещают в раствор, содержащий парамагнитные ионы, не проникающие внутрь клетки. Для этого чаще всего используют раствор красной кровяной соли. Парамагнитные анионы $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ при столкновении со спиновой меткой вызывают сильное уширение ее спектра ЭПР. Если цитоплазматические мембраны не разрушены, то анионы $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ не проникают внутрь клетки. В этом случае молекулы метки, находящиеся в цитоплазме, будут давать обычный неуширенный сигнал ЭПР. Однако при разрушении цитоплазматических мембран парамагнитные анионы $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ проникают внутрь клетки, вызывая исчезновение узкого сигнала ЭПР.

На рис. 6, Б показан спектр ЭПР спиновой метки ТЕМПОН в клетках зародыша семян пшеницы. Молекулы этой метки распределены между цитоплазмой и гидрофобными областями клетки (мембраны, жировые капли). Об этом свидетельствует тот факт, что в спектре ЭПР видны две компоненты — Р и Н, которые принадлежат молекулам метки, локализованным соответственно в полярной среде (цитоплазма, Р) и гидрофобной среде (Н). По мере старения семян “полярная” компонента Р уменьшается (рис. 6, Б). Это обусловлено тем, что при хранении семян нарушается целостность цитоплазматических мембран. В этом случае молекулы парамагнитного уширителя $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ могут проникать внутрь цитоплазмы, вызывая уширение компоненты Р. Таким образом, измеряя величину компоненты Р можно оценить целостность цитоплазматических мембран. Исследования показали, что потеря всхожести семян, которая происходит при их хранении, в значительной мере обусловлена нарушением целост-

ности мембран клеток зародыша. Можно думать, что существенную роль в этом играют процессы структурной реорганизации мембран, связанные с явлением фазового разделения. Суть этого явления заключается в том, что в плоскости мембраны происходит перегруппировка липидов и белков, в результате которой в определенных участках мембраны могут возникать структурные дефекты.

Итак, мы рассмотрели строение, свойства и некоторые примеры практического применения парамагнитных зондов для изучения биологических систем. Успеху метода спиновых меток способствовал синтез знаний из разных областей: физики (теория спектров ЭПР), химии (синтез спиновых меток) и биологии (наиболее интересные практические приложения метода).

ЛИТЕРАТУРА

1. Блюменфельд Л.А., Тихонов А.Н. Электронный парамагнитный резонанс // Соросовский Образовательный Журнал. 1997. № 9. с. 91–99.
2. Метод спиновых меток / Под ред. Л. Берлинера. М.: Мир, 1982.
3. Лихтенштейн Г.И. Применение спиновых меток в биологии. М.: Наука, 1972.
4. Бучаченко А.Л., Вассерман А.М. Стабильные радикалы: Электронное строение, реакционная способность и применение. М.: Химия, 1973.
5. Кузнецов А.Н. Метод спинового зонда. М.: Наука, 1976.

* * *

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.