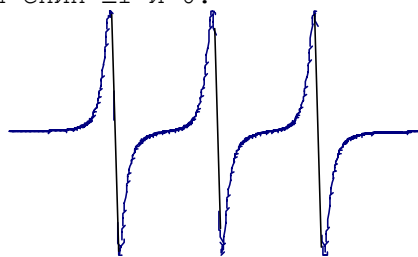
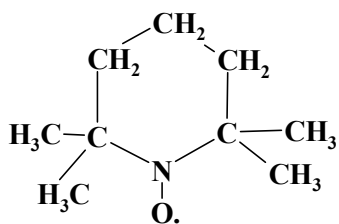


Метод спиновых меток и зондов

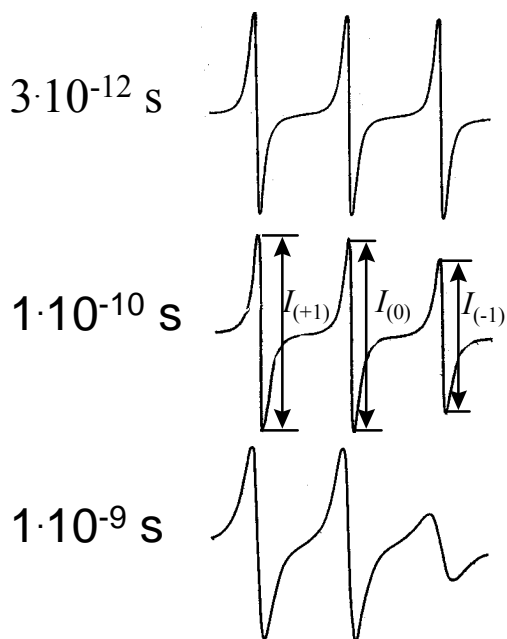
Важным этапом в развитии применения метода ЭПР в биологических исследованиях стал синтез стабильных свободных радикалов. Среди таких радикалов наибольшую популярность получили нитроксильные радикалы.

Стабильность нитроксильных радикалов обусловлена пространственным экранированием группы $N-O\cdot$, имеющей неспаренный электрон, четырьмя метильными группами, препятствующими протеканию реакции с участием свободной валентности. Однако, такая экранировка не является абсолютной и реакция восстановления свободной валентности все-таки может происходить. Аскорбиновая кислота, например, является хорошим восстановителем нитроксильных радикалов.

Спектр ЭПР нитроксильных радикалов состоит, в простейшем случае, из трех линий равной интенсивности, благодаря взаимодействию неспаренного электрона с ядром атома азота, имеющим целочисленный спин ± 1 и 0.



Спиновый зонд ТЕМПО и его сигнал ЭПР



Если нитроксильный радикал находится в водном растворе, то его вращение является изотропным и достаточно быстрым, что приводит к усреднению анизотропии спектра ЭПР.

При уменьшении скорости вращения проявляются анизотропные взаимодействия, которые приводят к уширению линий и соответственно изменению амплитуд компонент спектра, а затем и к сдвигу крайних компонент.

Рис.11. Спектр ЭПР ТЕМПО при разных τ_c .
Время вращательной корреляции τ_c указано слева от спектров.

Для описания движения радикала используют понятие время корреляции (τ_c). Это время равно времени поворота нитроксильного радикала на угол 90° . Для времен корреляции, находящихся в диапазоне от $5 \cdot 10^{-11}$ до 10^{-9} с, используют формулу

$$\tau_c = 6,65 \cdot \Delta H_{+1} \left(\sqrt{\frac{I_{+1}}{I_{-1}}} - 1 \right) \cdot 10^{-10} \text{ сек}, \quad (5.35)$$

где ΔH_{+1} - ширина низкопольной компоненты спектра ЭПР, а I_{+1} и I_{-1} - амплитуды высокопольной и низкопольной линий. При более медленных движениях молекулы нитроксильного радикала ($\tau_c > 10^{-9}$ сек) время корреляции можно измерять по формуле

$$\tau_c = a(1-S)^b, \quad (5.36)$$

где a и b - параметры, зависящие от типа радикала и модели движения, а

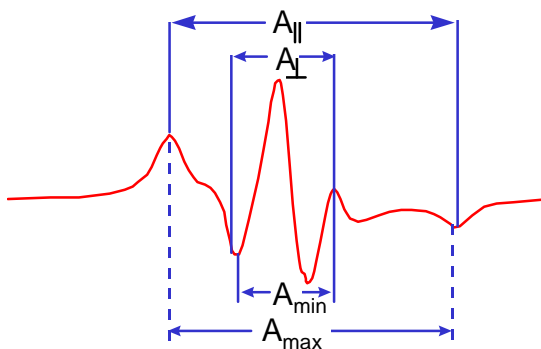
$$S = \frac{A'_{zz}}{A_{zz}} = \frac{H_{-1} - H_{+1}}{H_{-1\max} - H_{+1\max}} \quad (5.37)$$

$2A_{zz}$ и $2A'_{zz}$ - расстояние между высокопольной и низкопольной компонентами спектра ЭПР в данном спектре ($2A_{zz}$) и при предельно большом времени корреляции ($2A'_{zz}$), а H_{-1} , H_{+1} , $H_{-1\max}$ и $H_{+1\max}$ - значения напряженности магнитного поля, соответствующие этим компонентам спектра. Время корреляции нитроксильного радикала непосредственно связано с вязкостью среды. Используя уравнение Стокса-Эйнштейна можно определить значение вязкости в соответствующей макроскопической системе

$$\eta = \tau \frac{3kT}{4\pi R^3}, \text{ где} \quad (5.38)$$

R - эффективный радиус нитроксильного радикала. Из уравнения (5.38) видно, что используя нитроксильный радикал в качестве зонда, можно определить вязкость среды, в которой находится радикал. В биологических исследованиях этот прием широко используется для измерения вязкости биологических мембран.

Вышеописанные рассуждения поведения зонда и изменения спектра ЭПР справедливы для изотропного вращения спинового зонда в гомогенной среде, какой, например, является вода или раствор глицерина. Однако, если характер вращения зонда изменится, например будет преобладать вращение вокруг одной из осей спинового зонда, то изменится и спектр ЭПР. Изменение характера вращения спинового зонда может произойти, если зонд является фрагментом другой молекулы, например, жирной кислоты находящейся в мембране.



химическая формула и спектр ЭПР 5-доксилстеарата (Рис.12)

Если спиновый зонд присоединен к 5 атому молекулы стеариновой кислоты, находящейся в мембране, его вращение будет происходить преимущественно вокруг длинной оси молекулы жирной кислоты, т.е. появится анизотропия вращения. Это естественно отразится на спектре ЭПР. Для описания анизотропии вращения спинового зонда используют параметр упорядоченности (S), который равен

$$S = \frac{A'_{\parallel} - A'_{\perp}}{A_{zz} - \frac{A_{xx} + A_{yy}}{2}}, \quad (5.39)$$

где A'_{\parallel} и A'_{\perp} - параметры, указанные на рис. 12. Параметр упорядоченности равен 1, если вращение зонда происходит вокруг нормали к мембране. При разжижении мембраны конус вращения будет расширяться, и значение параметра упорядоченности (S) будет приближаться к нулю. Таким образом, параметр упорядоченности изменяется от 0 до 1, с увеличением вязкости и структурированности мембраны. С этим свойством жирнокислотных спиновых зондов и связано их использование как датчиков для измерения вязкости и упорядоченности структуры мембран.

Естественным следствием использования спиновых зондов, содержащих жирную кислоту, является возможность измерения параметра упорядоченности на разных расстояниях от поверхности мембраны, т.н. профиля упорядоченности или профиля вязкости. Подобные измерения представляются возможными при

использовании набора однородных спиновых зондов, которые содержат нитроксильный фрагмент на разном расстоянии от карбоксильной группы. Например, на сегодняшний день широко используются спиновые зонды с нитроксильным радикалом у 5, 7, 12 и 16 атома углерода стеариновой кислоты. Набор этих соединений позволяет измерять S параметр на расстоянии 3,5, 5, 8,5 и 10,5 ангстрем от поверхности мембраны.

Как было показано выше, спектры ЭПР спиновых зондов сильно отличаются друг от друга, в зависимости от того находится ли спиновый зонд в вязком или невязком окружении. Например в воде и в мембране. Это свойство спиновых зондов было использовано для создания нового класса спиновых зондов, позволяющих измерять поверхностный потенциал мембраны. Для измерения поверхностного потенциала мембраны измеряют коэффициент распределения вода/мембрана нейтрального и заряженного зондов. Поскольку заряженный зонд взаимодействует с зарядами, расположенными на поверхности мембраны, то его коэффициент распределения будет отличаться от коэффициента распределения нейтрального зонда. Отношение коэффициентов распределения служит мерой поверхностного потенциала изучаемой мембраны. Эту величину можно пронормировать, измерив коэффициенты распределения спиновых зондов в мембранах, имеющих самый высокий положительный и отрицательный потенциалы. Спектры ЭПР спиновых зондов, используемых для измерения поверхностного потенциала приведены ниже.

химические формулы и спектры ЭПР заряженного спинового зондов (Рис.13).

Еще одним важным применением метода спинового зонда служит измерение pH. Казалось бы, что измерение pH достаточно легко и точно можно проводить с помощью pH-электродов, однако очень трудно если не невозможно измерить pH внутри лизосомы или фагоцитирующего лейкоцита. Для этих целей и применяют pH-чувствительные спиновые зонды. В основе метода pH-чувствительных зондов лежит их способность зонда давать отличные друг от друга спектры ЭПР в протонированной и депротонированной формах. Таким образом, в зависимости от рК спинового зонда, существует узкий диапазон pH в котором и происходит его протонирование и соответствующее изменение спектра ЭПР зонда. Имея небольшой набор pH-чувствительных спиновых зондов, можно достаточно точно и надежно измерять pH внутри клетки. Химические формулы pH-чувствительных спиновых зондов приведены ниже.

химические формулы и спектры ЭПР pH-чувствительного спинового зонда (Рис.14).

Используя спиновые зонды, специфически взаимодействующие с сульфгидрильными группами, можно легко определять концентрацию "SH-групп в различных белках. Схема взаимодействия спинового зонда с сульфгидрильными группами приведена на следующем рисунке.

схема взаимодействия спинового зонда с SH-группами (Рис.15)

Все о чем до сих пор говорилось в разделе о практическом применении нитроксильных радикалов касалось метода спиновых зондов. Однако не менее перспективным является и метод спиновых меток. В основе метода спиновых меток лежит тот же принцип изменения спектра ЭПР нитроксильного радикала в зависимости от скорости и изотропности его вращения. Отличием же метода является тот факт, что спиновая метка ковалентно связывается с другой более или менее крупной молекулой или макромолекулой.

Одним из первых и удачных применений метода спиновой метки было измерение количества и доступности SH-групп белков. Химическая формула и спектр ЭПР спиновой метки, взаимодействующей с сульфгидрильными группами, в свободном состоянии и после присоединения к белку приведены на следующем рисунке.

химические формулы и спектры ЭПР спиновой метки для SH-групп (Рис.16).

Из рисунка можно видеть, что спектры ЭПР спиновой метки в свободном и связанном состоянии сильно отличаются, что связано с различием в скорости и направлении вращения. Естественно, что связанная спиновая метка имеет значительно более низкую скорость вращения, чем в свободном виде. Более того, количество связанных спиновых меток и соответственно интенсивность сигнала ЭПР пропорциональны количеству прореагировавших со спиновой меткой сульфгидрильных групп. Подвижность спиновой метки, прикрепленной к белку может изменяться и в том случае, если белок обладает ферментативной активностью. При взаимодействии фермента с субстратом, подвижность спиновой метки, находящейся вблизи активного центра фермента может существенно измениться.

Аналогичный прием, заключающийся в торможении вращения нитроксильного радикала, может быть использован и при изучении связывания спин-меченых субстратов ферментов или иных биологически важных соединений с макромолекулами или мембранами. В этом случае изменение спектра ЭПР произойдет только тогда, когда изучаемый субстрат прочно связан с ферментом или встроен в мембрану.

В настоящее время существует множество методических приемов, позволяющих изучать топографию белковой глобулы с использованием спиновых меток. Наиболее распространенными являются следующие. 1) "Спиновая метка-парамагнитный ион металла". Поскольку многие ионы металлов переменной валентности являются парамагнетиками и кроме того могут находиться в активном центре фермента, то взаимодействие с ионом спиновой метки, прикрепленной, например, к остатку цистеина или гистидина белковой глобулы, будет приводить к уширению спектра ЭПР в результате диполь-дипольного взаимодействия парамагнетиков. 2) " Спиновая метка-Спиновая метка". Аналогичный эффект могут вызвать две спиновые метки, находящиеся в непосредственной близости друг к другу, если они прикреплены к соответствующим группам белка. В этом случае, если при ферментативном акте произойдет изменение расстояния между этими метками, то это будет легко увидеть на спектре ЭПР. 3) " Спиновый зонд-Спиновая метка". Определить расстояние от поверхности белковой глобулы до места локализации спиновой метки возможно, если к белку, содержащему спиновую метку добавить спиновый зонд, который не проникает между витками α -спирали белка. В этом случае взаимодействие между спиновой меткой и спиновым зондом приведет к изменению спектра ЭПР.

в) метод спиновых ловушек.

Появление нитроксильных радикалов оказалось решающим событием в решении проблемы обнаружения и исследования свободных радикалов, образующихся в живых системах. Обнаружение радикалов оказалось возможным благодаря появлению метода спиновых ловушек. Суть метода заключается в том, что некоторое соединение, не являющееся нитроксильным радикалом, но имеющее структуру близкую к нитроксильному радикалу (спиновая ловушка), взаимодействует со свободным, короткоживущим радикалом и превращается в долгоживущий нитроксильный радикал (спиновый аддукт), спектр ЭПР

которого, уникален для данного радикала или семейства радикалов. Схема реакции спиновой ловушки С-фенил-N-трет-бутил нитрона с гидроксильным радикалом представлена на рисунке.

химическая формула и схема реакции ФБН и ОН радикала (Рис.17)

По химической природе спиновые ловушки можно отнести к двум основным классам - это нитроны и нитрозосоединения. С-фенил-N-трет-бутил нитрон (ФБН), как следует из названия относится к нитронам. Еще одной популярной спиновой ловушкой является 5,5-диметил-пирролин-1-оксил (ДМПО), которая также относится к нитронам. Из нитрозосоединений следует упомянуть нитрозобензол, нитрозодурол трет-нитрозобутан. Химические формулы и схемы реакций приведены на рисунке ниже.

химические формулы ДМПО, НБ, НД и ТНБ и спектры их СА (Рис.18)

Приведенные спиновые ловушки отличаются между собой по скорости реакции с радикалами, стабильности образующихся спиновых аддуктов и величине различий в спектре спиновых аддуктов для различных радикалов. Сегодня уже существуют банки данных, содержащие параметры спектра ЭПР спиновых аддуктов, которые позволяют однозначно идентифицировать и определить концентрацию свободного радикала по спектру ЭПР его спинового аддукта.

Рекомендуемая литература.

1. Дж. Вертц и Дж. Болтон Теория и практические приложения метода ЭПР. Мир, Москва, 1975.
2. Современные методы биофизических исследований. Практикум по биофизике. Под редакцией А.Б. Рубина. Высшая школа, Москва, 1988.
3. Метод спиновых Меток. Теория и применение. Под редакцией Л. Берлинера. Мир, Москва, 1979.
4. Кузнецов А.Н. Метод спинового зонда. Наука, Москва, 1976.
5. Зубарев В.Е. Метод спиновых ловушек. Издательство МГУ, Москва, 1984.