

УДК 543.42:541.64

*В. И. Криничный***ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ  
МЕТОДОМ ЭПР ВЫСОКОГО СПЕКТРАЛЬНОГО РАЗРЕШЕНИЯ  
В 2-мм ДИАПАЗОНЕ****(Обзор)**

Для исследования структуры и динамики биологических систем применяются различные методы, основанные на принципе «метки» или «зонда»: метод люминесцентных меток [1], метод ядерного  $\gamma$ -резонанса (ЯГР) [2], метод диссипации электронов на электронно-плотных группировках атомов [3]. Наиболее широко используемым в этих целях является метод спиновых меток и зондов, впервые предложенный Мак-Коннеллом более двадцати лет назад [4] и основанный на введении в биологическую систему нитроксильных радикалов [4—7]. Параметры спектров ЭПР радикалов зависят от полярности, структуры и динамики микроокружения в месте их локализации. Поэтому введение спиновых меток и зондов в различные участки ферментов, нуклеиновых кислот и мембран позволяет установить профиль полярности и подвижности исследуемых систем, изучить их топографию.

Наиболее часто такие исследования проводятся в 3-см диапазоне регистрации ЭПР. Однако в этом диапазоне длин волн спектры ЭПР органических свободных радикалов регистрируются в узком интервале значений магнитного поля. Это приводит к слабому разрешению многокомпонентных спектров ЭПР и затрудняет использование метода для установления структуры и динамики микроокружения радикала в биологических системах.

Так, по спектрам ЭПР 3-см диапазона не удается однозначно определить, обусловлены ли релаксационные изменения спектра анизотропным движением радикала в области низких частот ( $\nu \approx 10^7 \div 5 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$ ) [4] или быстрым вращением его нитроксильного фрагмента с частотой  $\nu \approx 10^9 \text{ с}^{-1}$  в ограниченном конусе [8]. Дополнительные трудности возникают при регистрации в этом диапазоне ЭПР нескольких парамагнитных центров с близкими магнитными параметрами, а также при определении микрополярности их окружения в биологических системах [6].

Таким образом, при изучении биологических систем в 3-см диапазоне регистрации возникают существенные ограничения метода ЭПР.

В некоторых случаях повышение точности метода реализуется при безмодуляционном способе записи спектров ЭПР [9]. Медленные молекулярные движения в области частот  $\nu \leq 10^7 \text{ с}^{-1}$  могут регистрироваться с использованием метода переноса СВЧ насыщения [5, 10]. Информативность спектров ЭПР может быть повышена путем дейтерозамещения протонов радикала и молекул среды, при котором снижается вклад в ширины индивидуальных компонент спектра от неразрешенной сверхтонкой структуры (СТС) этих ядер [11].

Однако более общим способом повышения точности и информативности метода является переход в миллиметровый диапазон регистрации ЭПР [5, 12—16]. В этом диапазоне значительно увеличиваются абсолютная чувствительность и спектральное разрешение при регистрации полиориентированных парамагнитных центров в модельных системах.

В настоящей работе обобщены первые результаты исследования структурных и динамических характеристик целого ряда биологических объектов (белков, ферментов, мембран, мицелл, биополимеров) методом ЭПР высокого спектрального разрешения в 2-мм диапазоне. Продемонстрирована принципиальная возможность детального изучения анизотропных сверхмедленных движений с применением метода переноса СВЧ насыщения и идентификации пероксидных радикалов в биологических системах по спектрам ЭПР 2-мм диапазона.

### ФИЗИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДА

Парамагнитные свойства органических радикалов обусловлены собственным моментом количества движения неспаренного электрона. Во внешнем магнитном поле магнитные моменты электронов могут ориентироваться вдоль или против его направления. Последующее наложение на эту электронную систему электромагнитного излучения приводит к его резонансному поглощению при выполнении условия

$$h\nu = g\beta H, \quad (1)$$

где  $h$  — постоянная Планка;  $\nu$  — частота электромагнитного излучения;  $g$  — фактор Ланде;  $\beta$  — магнетон Бора;  $H$  — напряженность внешнего магнитного поля.

Неспаренный электрон в нитроксильном радикале занимает разрыхляющую  $\pi^*$ -орбиталь, образованную  $p$ -орбиталями атомов азота и кислорода. Взаимодействие электрона с отличным от нуля спином ядра атома азота приводит к проявлению СТС в его спектре ЭПР. Молекулярные орбитали радикала жестко фиксированы и ориентированы. Это определяет тензорный характер сверхтонкого взаимодействия и его  $g$ -фактора. Оси магнитных тензоров радикала совпадают и направлены следующим образом: ось  $X$  — вдоль направления NO-связи,  $Z$  — в плоскости  $\pi$ -связи NO-фрагмента, ось  $Y$  перпендикулярна осям  $X$  и  $Z$ .

На магнитные параметры нитроксильных радикалов существенное влияние оказывают структурные и динамические свойства его микроокружения.

В биологических системах нитроксильные радикалы могут образовывать со своим микроокружением донорно-акцепторные, электростатические и другие комплексы [17]. В первом случае на лиганд посредством обобществленной водородной связи переносится около 1% спиновой плотности, что обуславливает взаимодействие неспаренного электрона с протонами лиганда. Магнитные параметры такого комплекса будут определяться донорно-акцепторными свойствами заместителей лиганда. В электростатических комплексах определяющим является взаимодействие диполей радикала и окружающих его фрагментов биосистемы; это приводит к соответствующему возмущению хюккелевских молекулярных орбиталей и кулоновских интегралов NO-фрагмента. В электростатических комплексах изменение величины  $A_{ZZ}$  тензора СТС будет зависеть от свойств фрагментов окружения [18]:

$$\delta A_{ZZ} = B \frac{\mu_L \rho_L}{M_L}, \quad (2)$$

где  $B = 22er \frac{kT\mu_R}{\beta}$  ( $e$  — заряд электрона,  $r$  — радиус NO-фрагмента,  $\beta$  — резонансный интеграл C—C-связи,  $k$  — постоянная Больцмана,  $T$  — температура,  $\mu_R$  — дипольный момент радикала);  $\rho_L$ ,  $M_L$ ,  $\mu_L$  — эффектив-

ные плотность, молекулярная масса и дипольный момент фрагментов окружения соответственно.

При образовании комплексов происходит также смещение  $n-\pi^*$ -полосы в их электронных спектрах поглощения. Это свидетельствует об изменении энергии перехода с  $n$  на  $\pi^*$ -орбиталь. Причем комплексообразование радикала с электроноакцепторным лигандом приводит к понижению  $n$ -орбитали, а с электронодонорным —  $\pi^*$ -орбитали. При этом наиболее сильно изменяется величина  $g_{xx}$   $g$ -тензора [19].

Таким образом, при увеличении полярности микроокружения нитро-сильного радикала должно происходить одновременное увеличение величины  $A_{zz}$  и уменьшение величины  $g_{xx}$  радикального комплекса [19]. Поскольку в биологических объектах радикал может взаимодействовать с фрагментами разной природы, в его спектре ЭПР может наблюдаться неоднородное уширение и даже расщепление индивидуальных компонент.

При уменьшении вязкости в биологических системах происходит размораживание молекулярных движений. Это приводит к зависящему от модели движений (броуновская диффузия, скачкообразная переориентация) усреднению компонент  $g$ - и  $A$ -тензоров введенного в систему радикала [20]. Релаксационные изменения в спектрах ЭПР хаотически ориентированных спин-меченых систем не будут проявляться для той их части, в которой радикалы ориентированы преимущественной осью вращения вдоль направления внешнего магнитного поля.

Так, для радикала с преимущественным вращением вокруг молекулярной  $X$ -оси при размораживании движения релаксационные изменения проявятся сначала для  $Y$ - и  $Z$ -компонент спектра ЭПР. При дальнейшем уменьшении вязкости в движение включается также  $X$ -компонента спектра ЭПР.

Релаксационные изменения проявляются как в сдвиге, так и в уширении индивидуальных компонент спектра ЭПР. Величина такого уширения обратно пропорциональна времени пребывания  $X$ -анизотропного радикала в соответствующей ориентации относительно направления внешнего магнитного поля [15]

$$\gamma \cdot \delta H_X \simeq 2\nu_{\perp}; \quad \gamma \cdot \delta H_Y = \gamma \cdot \delta H_Z \simeq \nu_{\parallel} + \nu_{\perp}, \quad (3)$$

где  $\gamma$  — гиромангнитное отношение;  $\delta H_i$  — уширение соответствующих компонент спектра ЭПР;  $\nu_{\parallel}$  и  $\nu_{\perp}$  — частота пребывания радикала в па-

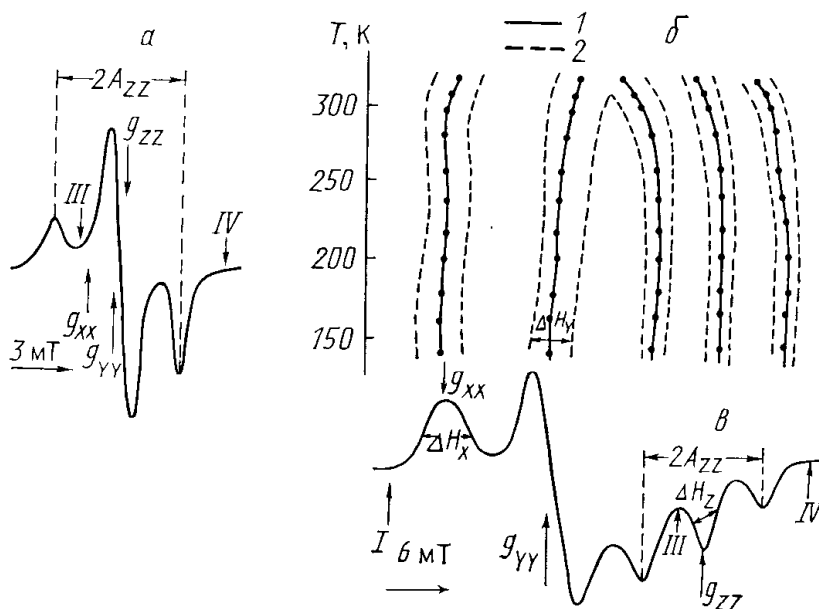


Рис. 1. Спектры ЭПР радикала I в лиофилизованном лизоциме яиц, зарегистрированные при  $T=160$  К в 3-см (а) и 2-мм (б) диапазонах ЭПР и изменение положений (1) и ширин (2) компонент 2-мм спектра ЭПР от температуры (б). I, III, IV — компоненты эталона ( $Mn^{2+}$ ). Показаны измеряемые компоненты магнитных параметров

раллельной и перпендикулярной ориентациях относительно внешнего магнитного поля соответственно.

Аналогичным образом можно определить уширения компонент спектра ЭПР радикала с другими осями преимущественного вращения.

Таким образом, для изучения тонких особенностей структуры и динамики биологических спин-меченых систем необходимо регистрировать все компоненты их магнитных параметров.

Согласно соотношению (1), спектральное разрешение компонент спектра ЭПР парамагнитных центров с анизотропным  $g$ -фактором пропорционально величине приложенного магнитного поля. Поэтому в спектре ЭПР спин-меченого лизоцима яиц, зарегистрированном в 3-см диапазоне ЭПР (рис. 1, а), наблюдается практически полное наложение канонических компонент спектра.

В 2-мм диапазоне регистрации ЭПР спектр указанной системы более информативен (рис. 1, в). В этом диапазоне происходит полное спектральное разрешение компонент  $g$ -тензора спиновой метки. Это дает возможность с высокой точностью определить все компоненты ее магнитных параметров.

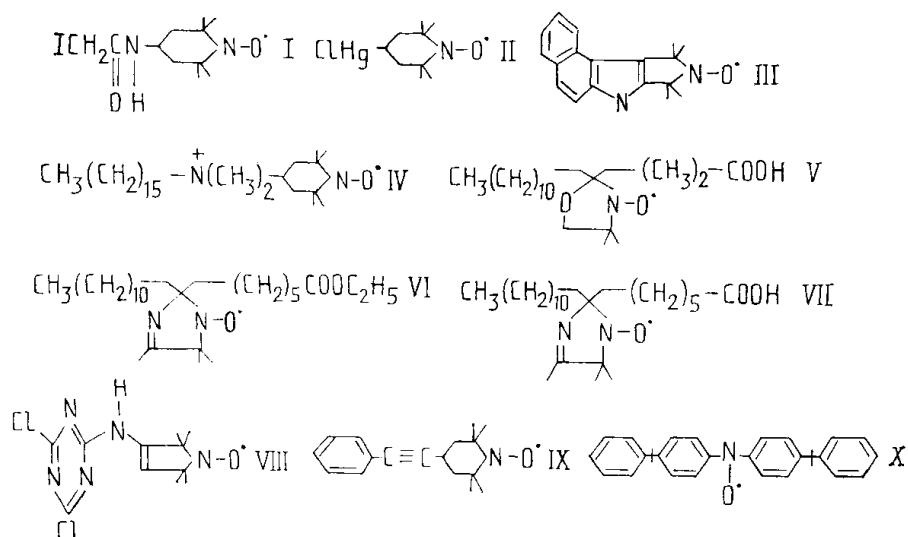
Увеличение спектрального разрешения оказывается важным также при изучении других органических радикалов, в том числе пероксирадикалов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Регистрация спектров ЭПР спин-меченых биологических систем и радикалов в различных матрицах производилась с помощью спектрометра ЭПР 2-мм диапазона со сверхпроводящим соленоидом и отражательным резонатором типа  $H_{011}$  [21]. Его абсолютная чувствительность по точечному образцу составляет  $5 \cdot 10^8$  спин/мТ и концентрационная по водному образцу  $6 \cdot 10^{13}$  спин/мТ·см<sup>3</sup>.

Калибровка  $g$ -фактора осуществлялась с использованием в качестве эталона  $Mn^{2+}$ . Поправка второго порядка к эффективному полю [22] для этого эталона в 2-мм диапазоне ЭПР составляет 65 мкТ (в 3-см диапазоне ЭПР она превышает 1 мТ) и не вносит существенной ошибки при определении магнитных параметров парамагнитных центров.

В качестве спиновых меток и зондов в работе использовались следующие нитроксильные радикалы:



Образцы представляли собой кварцевые капилляры с внешним диаметром 0,6 мм и длиной 6 мм, заполненные соответствующей спин-меченой системой.

Магнитные параметры указанных радикалов в различных биологи-

Таблица 1. Магнитные параметры нитроксильных радикалов I—X в замороженных биологических и модельных системах

Матрица	$R$	$g_{XX}$	$g_{YY}$	$g_{ZZ}$	$g_{изо}$	$A_{ZZ}$ , мТ
I						
Толуол	—	2,00953	2,00577	2,00176	2,00569	3,40
изо-Бутанол	—	2,01010				
		2,00935	2,00602	2,00197	2,00578	3,50
Этанол	—	2,00910	2,00573	2,00210	2,00564	3,58
Этанол+вода	0,25	2,00902	2,00543	2,00212	2,00552	3,60
Этанол+вода	0,50	2,00890	2,00602	2,00214	2,00569	3,65
Этанол+вода	0,66	2,00883	2,00608	2,00201	2,00564	3,70
Метанол	—	2,00860	2,00550	2,00178	2,00529	3,73
Вода+глицерин	0,92	2,00834	2,00571	2,00167	2,00524	3,77
Лизоцим	0,04	2,00946	2,00646	2,00217	2,00603	3,50
Лизоцим	0,35	2,00923	2,00617	2,00220	2,00587	3,61
Лизоцим	0,60	2,00912	2,00614	2,00214	2,00580	3,69
Лизоцим	0,80	2,00908	2,00603	2,00211	2,00574	3,74
Лизоцим	0,96	2,00902	2,00624	2,00211	2,00579	3,85
САЧ	0,04	2,00893	2,00585	2,00164	2,00547	3,60
САЧ	0,96	2,00842	2,00570	2,00170	2,00527	3,75
$\alpha$ -Химотрипсин	0,04	2,00912	2,00598	2,00210	2,00573	3,58
$\alpha$ -Химотрипсин	0,66	2,00839	2,00613	2,00219	2,00557	3,67
II						
САЧ	0,04	2,00998				
		2,00883	2,00612	2,00216	2,00570	3,64
САЧ	0,96	2,00863	2,00613	2,00215	2,00563	3,84
III						
САЧ	0,04	2,00855	2,00621	2,00214	2,00563	3,55
САЧ	0,96	2,00845	2,00614	2,00210	2,00556	3,67
IV						
Мембраны	—	2,00980	2,00642	2,00232	2,00618	3,67
V						
Мембраны	—	2,00918	2,00614	2,00230	2,00587	3,50
VI						
Этанол	—	2,01044				
		2,00984	2,00696	2,00302	2,00661	3,39
VII						
Октан	—	2,00951	2,00611	2,00215	2,00592	3,28
<i>n</i> -Пропанол	—	2,00955				
		2,00894	2,00619	2,00217	2,00597	3,29
Этанол	—	2,00901	2,00617	2,00219	2,00597	3,30
Метанол	—	2,00882	2,00626	2,00228	2,00579	3,61
Мицеллы б/белка	2,5	2,00952	2,00626	2,00226	2,00601	3,41
»	5,5	2,00946	2,00614	2,00213	2,00591	3,32
Мицеллы с белком	3	2,00954	2,00622	2,00221	2,00599	3,34
$\alpha$ -Химотрипсин	6	2,00958	2,00622	2,00231	2,00603	3,41
»	10	2,00950	2,00618	2,00215	2,00594	3,36
»	15	2,00954	2,00622	2,00220	2,00599	3,41
»	20	2,00950	2,00622	2,00239	2,00601	3,36
»	30	2,00946	2,00621	2,00222	2,00597	3,41
»	40	2,00939	2,00618	2,00217	2,00591	3,32
»	50	2,00943	2,00614	2,00217	2,00591	3,32
»	60	2,00946	2,00622	2,00226	2,00598	3,35
»	80	2,00937	2,00607	2,00210	2,00585	3,34
VIII						
Октан	—	2,00872	2,00633	2,00214	2,00573	3,43
Этанол	—	2,00865	2,00622	2,00221	2,00569	3,52
Метанол	—	2,00857	2,00617	2,00209	2,00560	3,69

Матрица	$R$	$g_{XX}$	$g_{YY}$	$g_{ZZ}$	$g_{изо}$	$A_{ZZ}$ , мТ
VIII						
Вода+глицерин	0,90	2,00840	2,00627	2,00215	2,00561	3,81
Хлопок «5595—В»	0,04	2,00842	2,00592	2,00224	2,00553	3,76
Хлопок «Ташкент-I»	0,04	2,00863	2,00622	2,00232	2,00572	3,55
Хлопок «Ташкент-I»+ +вилт	0,04	2,00840	2,00562	2,00212	2,00538	3,35
Целлюлоза (Ц)	0,04	2,00762	2,00582	2,00211	2,00518	3,37
Целлюлоза (ЦА-I)	0,04	2,00791	2,00584	2,00222	2,00532	3,57
Целлюлоза (ЦА-II)	0,04	2,00783	2,00574	2,00227	2,00528	3,49
IX						
<i>трет</i> -Бутилбензол	—	2,00979	2,00622	2,00206	2,00602	3,41
X						
<i>трет</i> -Бутилбензол	—	2,00947	2,00541	2,00217	2,00568	3,21

Примечание. Ошибки измерения компонент  $g$ - и  $A$ -тензоров составляют  $7 \cdot 10^{-5}$  и  $3 \cdot 10^{-2}$  мТ соответственно.  $R$  — относительное содержание воды (в модельных системах), степень гидратации (в мицеллах), величина относительной влажности (в других биологических системах). В случае расщепления  $X$ -компоненты спектра ЭПР при расчете величины  $g_{изо}$  учитывалась низкополевая  $X$ -компонента спектра ЭПР.

ческих и модельных системах, определенные по спектрам ЭПР при температурах, при которых все движения в них были заморожены, приведены в табл. 1.

### СТРУКТУРА МИКРООКРУЖЕНИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПОДВИЖНОСТЬ НИТРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Как было показано выше, наиболее чувствительными параметрами к изменению полярности и структуры микроокружения радикалов являются величины  $g_{XX}$  и  $A_{ZZ}$ . Поэтому для определения свойств микроокружения радикалов в биологических и модельных системах была использована корреляционная зависимость этих величин.

**Лизоцим яиц.** В работе [23] изучались препараты лизоцима яиц, модифицированные спиновой меткой 1 по группе гист-15 по методике, изложенной в [24].

Спектр ЭПР лиофилизованного замороженного образца характеризуется значительным неоднородным уширением индивидуальных компонент, которое частично снимается при насыщении его водой (рис. 1, *в*). Этот факт свидетельствует о взаимодействии метки с гидроксильными фрагментами белка разной структуры.

На рис. 2 представлены магнитные параметры радикала I в замороженных органических растворителях разной полярности и в лизоциме с величиной относительной влажности 0,04—0,96. Из рисунка видно, что увеличение полярности микроокружения радикала I в модельных системах приводит к монотонному уменьшению величины  $g_{XX}$  и увеличению величины  $A_{ZZ}$ . Это однозначно свидетельствует об образовании в этих системах  $n$ - $\sigma$ -радикального комплекса с молекулами окружения [17]. Такой же комплекс образует радикал в лизоциме. Различный ход корреляционной зависимости  $g_{XX}$ — $A_{ZZ}$  в модельных системах и в лизоциме с разной величиной относительной влажности позволяет сделать вывод об изменении конформации радикального цикла в последнем случае под действием белкового окружения. Близость магнитных параметров замороженных лиофилизованного спин-меченого лизоцима

и раствора радикала в *n*-бутаноле указывает на сходство полярности и структуры микроокружения радикального фрагмента в этих системах.

В спектрах ЭПР спин-меченых образцов лизоцима с величиной относительной влажности менее 0,8 в интервале температур 130—320 К не были отмечены релаксационные изменения формы линии. Это может свидетельствовать о жесткой фиксации радикального фрагмента близко расположенными водородсодержащими группами в этих образцах.

Нагревание насыщенного водой образца приводит к заметному об-

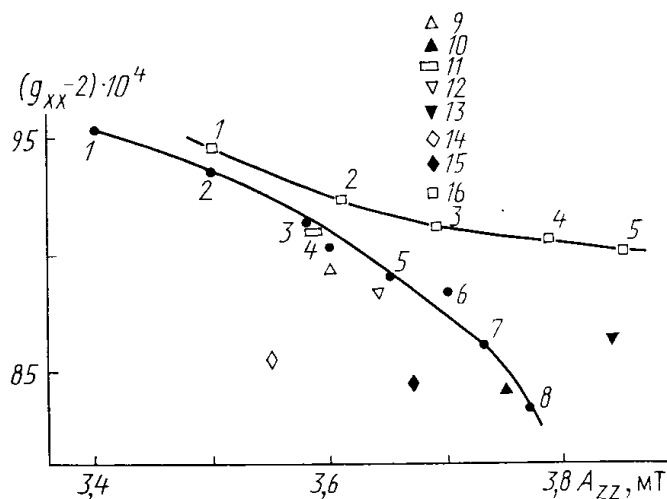


Рис. 2. Корреляционная зависимость  $g_{xx} - A_{zz}$  для радикала I в замороженных ( $T = 140$  К) толуоле (1), изобутаноле (2), этаноле (3), водно-этанольной матрице с относительным содержанием воды 0,25 (4), 0,50 (5), 0,66 (6), метаноле (7), водно-глицериновой матрице (8), лизоциме яиц (16) с величиной относительной влажности 0,04 (1), 0,35 (2), 0,60 (3), 0,80 (4), 0,96 (5), сывороточном альбумине человека с величиной относительной влажности 0,04 (9), 0,96 (10),  $\alpha$ -химотрипсине с величиной относительной влажности 0,04 (11), для радикалов II (12, 13) и III (14, 15) в сывороточном альбумине человека с величиной относительной влажности 0,04 и 0,96 соответственно

ратимому уширению и сдвигу по полю индивидуальных компонент его спектра ЭПР (рис. 1, б). В интервале температур 130—200 К наблюдается сужение X-компоненты спектра ЭПР, что можно, по-видимому, объяснить усреднением неразрешенной СТС протонов радикала и фрагментов белка. Этот факт свидетельствует о влиянии увлажнения на молекулярные движения в образце даже при  $T < 200$  К. При  $T > 250$  К X-компонента спектра ЭПР смещается в слабые поля (рис. 1, б). Это не может быть объяснено размораживанием молекулярных движений. Поскольку такой эффект в лиофилизированном образце отсутствовал, он может быть отнесен за счет ослабления водородной связи NO-фрагмента с окружающими радикал молекулами воды при нагревании.

Релаксационные изменения остальных компонент спектра ЭПР насыщенного водой образца регистрируются с  $T = 260$  К и описываются в рамках анизотропной вращательной диффузии. Начиная с этой температуры, по-видимому, происходит ослабление связи NO-фрагмента радикала с поверхностными группами белка и последующая гидратация радикала и белковых групп. Молекулы воды, таким образом, играют роль специфического пластификатора подвижности белковой глобулы и радикала.

Как было показано выше, при анизотропном вращении радикала компоненты его спектра ЭПР будут различным образом уширяться и сдвигаться по полю. В спектре ЭПР спин-меченого лизоцима с величиной относительной влажности 0,96 при нагревании наиболее сильно уширяться Y-компонента, что свидетельствует о слабо выраженной анизотропии вращения радикала вокруг Z-оси в этом образце. Теоретические расчеты [23] подтвердили это предположение.

Нитроксильный фрагмент метки расположен в 1,1 нм от NH-группы гис-15 и в 1,0—1,1 нм от протонов фе-3, вал-92 и изо-88 [25]. Это соответствует вытянутой конформации метки и локализации ее нитроксильного фрагмента в районе впадины, образованной указанными гидрофобными группами. Подвижность нитроксильного фрагмента вплоть до  $T=305$  К остается низкой с  $\tau_c \geq 5 \cdot 10^{-8}$  с ( $\tau_{\perp} \geq 1,1 \cdot 10^{-7}$  с,  $\tau_{\parallel} \geq 2,2 \cdot 10^{-8}$  с) и реализуется, по-видимому, вокруг C—NH- и —CH<sub>2</sub>CO-связей. Движение ограничивается взаимодействием радикала с белковыми группами, возможно, с молекулами «вязкой» воды вблизи поверхности белка и отражает эффективную микровязкость водно-белковой матрицы в данном районе. Коэффициент эффективной локальной вязкости в гидрофобном кармане лизоцима, рассчитанный при  $T=300$  К по формуле Стокса—Эйнштейна, составил  $\eta \simeq 60$  Па·с.

**Сывороточный альбумин человека.** В работе [26] изучался образец сывороточного альбумина человека (САЧ), меченый по SH-группе радикалами I и II, а также с введенным зондом III по методике, изложенной в [27].

На рис. 2 приведены магнитные параметры САЧ, модифицированного радикалами I—III, с величиной относительной влажности 0,04 и 0,96. Из рисунка видно, что магнитные параметры САЧ с метками I и II и величиной относительной влажности 0,04 попадают на корреляционную зависимость  $g_{xx}—A_{zz}$  для модельных систем. Это может свидетельствовать о возникновении в САЧ  $n—\sigma$ -радикального комплекса с молекулами окружения, а также о близких структуре и полярности микроокружения в месте локализации этих меток в лиофилизованном САЧ и в замороженной этанольной системе.

При насыщении белка водой радикальный фрагмент метки I сольватируется ее молекулами аналогично тому, как он сольватируется в водно-глицериновой смеси. Такая доступность радикального фрагмента водному окружению в САЧ характерна и для других радикалов. Однако характер взаимодействия нитроксильных фрагментов разных по структуре радикалов в насыщенном водой САЧ отличается (см. рис. 2).

Спектр ЭПР САЧ, модифицированного меткой II, содержит расщепленную X-компоненту, что указывает на существование в этой системе различных радикальных комплексов.

**Липосомные мембраны.** В реализации важных биохимических и биофизических процессов, в которых участвуют бислоиные мембраны, исключительно важную роль играют их конформационные и молекулярно-динамические свойства.

В работе [28] проведено сравнение молекулярной подвижности введенных в липосомы зондов IV и V, а также зонда VI в этанольной матрице.

Спектры ЭПР липосомных мембран с введенными зондами при  $T=180$  К по форме мало отличаются от спектра ЭПР замороженной модельной системы. В последней при  $T \leq 160$  К зарегистрировано расщепление X-компоненты спектра ЭПР, которое можно объяснить, по-видимому, наличием в ней различных радикальных комплексов.

При нагревании в спектрах ЭПР модифицированных липосомных мембран наблюдаются релаксационные изменения формы линий. Изменение ширины и положения по полю индивидуальных компонент спектров ЭПР изученных систем от температуры приведено на рис. 3.

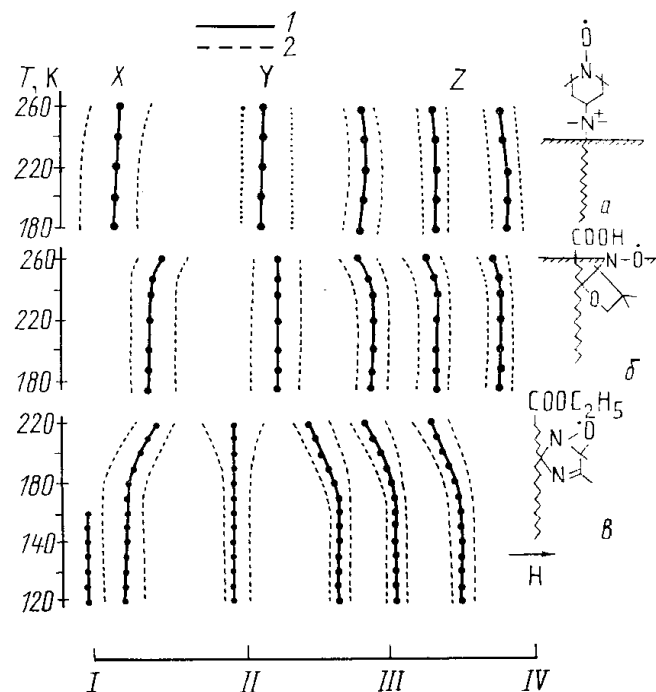
Из рисунка видно, что для радикала VI в этанольной матрице при  $T > 150$  К характерно изотропное вращение. Иной характер изменения формы линий наблюдается для мембранных систем (рис. 3, а, б). Основные отличия от модельной системы (не считая сдвига в область более высоких температур и меньшей глубины регистрируемых изменений) состоят в том, что в их спектрах ЭПР наблюдается смещение по полю X- и Z-компонент с повышением температуры при весьма незначительном уширении. Такие отличия могут быть объяснены слабо выраженным



анизотропным вращением радикалов вокруг своей Y-оси либо некоторой компенсацией уширения эффектом сужения линий за счет уменьшения вклада в их ширину неразрешенной СТС окружающих протонов. Оценка времени корреляции вращения зондов в липосомных мембранах была проведена в рамках модели броуновской диффузии и составила  $\tau_c \approx 10^{-7}$  с при  $T = 260$  К.

Релаксационные изменения в спектрах ЭПР зонда IV в мембранах регистрируются при  $T \geq 200$  К. Аналогичные изменения в спектрах ЭПР зонда V в мембранах проявляются при более высоких температурах ( $T \geq 240$  К), однако они демонстрируют более резкую температурную зависимость. Эти различия можно объяснить в предположении, что положительно заряженный нитроксильный фрагмент зонда IV локализуется

Рис. 3. Изменение положений (1) и ширины (2) компонент спектров ЭПР радикалов IV (а), V (б) в липосомных мембранах и VI (в) в этаноле от температуры. I—IV — положения компонент  $Mn^{2+}$



в поверхностных, доступных воде полярных участках липосомной мембраны [28], в то время как NO-фрагмент зонда V расположен в ее липидной части [29].

Наблюдаемые изменения формы линии носят сложный характер и для их описания, по-видимому, недостаточно одного параметра — времени корреляции. На качественном уровне, однако, можно сделать вывод, что частота вращения зондов в мембранах при  $T = 260$  К не превышает  $\nu \approx 10^7$  с $^{-1}$ , а характер зависимости этих движений от температуры в основном определяется ближайшим окружением зонда. Так, для зонда IV, локализованного в поверхностных слоях мембраны, увеличение подвижности при  $T > 200$  К связано, по-видимому, с плавлением поверхностной воды. Активный фрагмент зонда V находится в сравнительно более жесткой, примыкающей к поверхностным слоям, липидной части мембраны, поэтому размораживание его молекулярной подвижности происходит с большим температурным коэффициентом.

Сравнение магнитных параметров, модифицированных зондом V мембран и модельных систем с близкими по структуре радикалами, позволило сделать предположение о близости структуры и полярности микроокружения зонда V в липосомных мембранах и зонда VII в замороженной метанольной матрице.

**Обращенные мицеллы.** Растворы поверхностно-активных веществ (ПАВ) в органических растворителях рассматриваются как перспективные системы для осуществления различных биохимических процессов [30]. Благодаря полярному ядру обращенные мицеллы приобретают способность к солюбилизации различных ионов, полярных веществ, в том числе молекул воды. Каталитическая активность заключенного в их внутреннюю полость белка существенно зависит от полярности и структуры белкового окружения. Поэтому для изучения систем обращенные

мицеллы — белок широко используется метод спиновых меток и зондов [6, 31, 32].

Ниже приведены результаты исследования полярности микроокружения и динамические свойства парамагнитного зонда VII в оболочке обращенных мицелл диизооктилсульфосукцината натрия в октане, содержащих солюбилизированный белок  $\alpha$ -химотрипсин, а также метки I в этом белке в двухмиллиметровом диапазоне регистрации ЭПР [33].

Из сравнения магнитных параметров мицеллярных и модельных си-

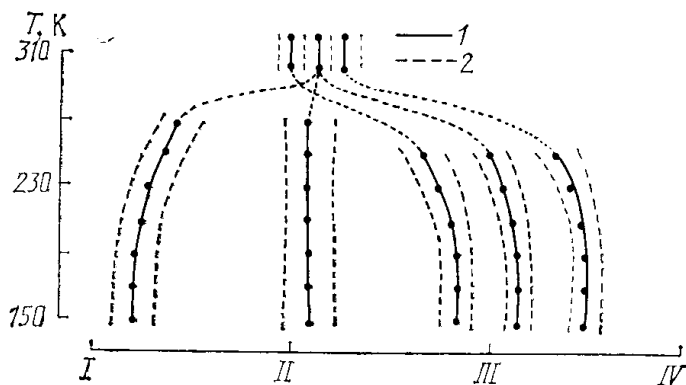


Рис. 4. Изменение положений (1) и ширины (2) компонент спектра ЭПР радикала VII в обращенных мицеллах с белком  $\alpha$ -химотрипсин от температуры. I—IV — положение компонент эталона  $Mn^{2+}$

стем (см. табл. 1) видно, что зонд VII в оболочке мицелл имеет практически неполярное окружение, а его магнитные параметры слабо зависят от степени гидратации,  $R = [H_2O]/[ПАВ]$ . Следовательно, радикальный фрагмент локализуется в гидрофобной зоне оболочки мицелл и не вступает в непосредственный контакт с молекулами воды внутри ее. Незначительные изменения магнитных параметров зонда при изменении состава системы мицеллы—белок могут быть объяснены влиянием степени гидратации на размеры и общее состояние мицеллярной оболочки. Полученные данные не подтверждают вывод, сделанный в работе [31], в которой аномально низкие величины  $A_{zz}$  зонда VII в гидратированных мицеллах объясняются несколькими местами его локализации.

При повышении температуры выше 200 К компоненты спектров ЭПР изученных систем уширяются и сдвигаются по полю вследствие размораживания молекулярных движений (рис. 4). При  $T=260$  К происходит полное слияние компонент спектров ЭПР в широкий (2 мТ) синглет, соответствующий радикалам с временем корреляции  $\tau_{c1} \approx 10^{-8}$  с. На этот синглет накладывается практически изотропный триплет, соответствующий более расторможенным радикалам,  $\tau_{c2} \approx 10^{-10}$  с (рис. 4). Это указывает на то, что около 4% зондов находятся вне липидного слоя, имеют при этом большую подвижность и вступают в контакт с солюбилизированными во внутренней полости мицелл молекулами воды. Различие  $g$ -факторов радикалов с разной частотой вращения указывает на изменение конформации микроокружения зонда при выходе его из оболочки во внутреннюю полость мицелл и варьировании степени гидратации.

Сопоставление экспериментально полученных и теоретически рассчитанных спектров ЭПР показало, что добавление в мицеллярную систему белка приводит к более чем двукратному уменьшению энергии активации вращения зонда [33]. Это свидетельствует об ужесточении структуры мицелл при таком переходе. Обратный эффект наблюдается при увеличении степени гидратации системы мицеллы—белок.

Магнитные параметры модифицированного меткой I по группе метионина-192 в районе активного центра  $\alpha$ -химотрипсина с величиной относительной влажности 0,04 попадают на корреляционную зависимость  $g_{xx}—A_{zz}$  для модельных систем (рис. 2). Как и в случае с САЧ, это может свидетельствовать о близости структуры и полярности мик-

роокружения этой метки в  $\alpha$ -химотрипсине и в замороженной этанольной матрице.

В спектре ЭПР лиофилизованного спин-меченого  $\alpha$ -химотрипсина вплоть до  $T=300$  К не было отмечено релаксационных изменений формы линии из-за жесткой фиксации радикального фрагмента его микроокружением. В интервале температур 220—260 К  $X$ -компонента спектра ЭПР обратимо смещается в сильные поля, по-видимому, из-за изменения конформации микроокружения радикала.

Выше 300 К компоненты спектра ЭПР спин-меченого  $\alpha$ -химотрипсина заметно уширяются и сдвигаются к центру тяжести спектра. Вычисленные по спектрам ЭПР время корреляции, энергия активации вращения радикала и эффективная вязкость в месте его локализации при  $T=310$  К составили соответственно  $1,8 \cdot 10^{-7}$  с,  $80 \pm 8$  кДж/моль и 22 Па·с. Движения радикала значительно растормаживаются при помещении спин-меченого  $\alpha$ -химотрипсина в мицеллу со степенью гидратации 6 ( $\tau_c \approx 5,5 \cdot 10^{-11}$  с) [31].

Полученные данные указывают на кооперативное влияние воды и биоглобулы на структуру мицеллы, микроокружение и подвижность зонда, удаленного от поверхности раздела фаз, и метки, локализованной в районе активного центра  $\alpha$ -химотрипсина.

**Хлопковые волокна и целлюлоза.** Для установления механизма биохимических превращений, протекающих в волокнах хлопчатника и целлюлозе, необходима информация о структурно-динамических свойствах этих природных биополимеров. С этой целью широкое применение находит ЭПР спектроскопия [34, 35]. Однако, как и в предыдущих случаях, недостаточное спектральное разрешение в 3-см диапазоне ЭПР не позволяет установить достаточно полную картину о процессах, происходящих в этих системах.

Метод ЭПР высокого спектрального разрешения был применен для изучения различных параметров модифицированных волокон хлопчатника [36] и микрокристаллической целлюлозы [37].

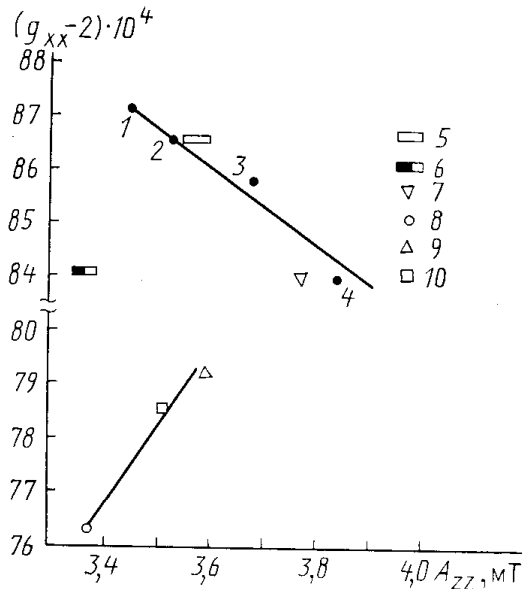
Исследованы хлопковые волокна, полученные из растений сортов 5595-В и «Ташкент-1», а также микрокристаллическая целлюлоза (Ц), аморфизованная давлением  $2 \cdot 10^9$  Па между наковальнями Бриджмена со сдвигом 10 и  $400^\circ$  (ЦА-I и ЦА-II соответственно). Модификация волокон хлопчатника и целлюлозы радикалом VIII проводилась по методике, описанной в [38]. Образцы Ц и ЦА-I облучались  $\text{Co}^{60}$ -источником дозой 10 МРад на воздухе при  $T=290$  К.

Спектры ЭПР лиофилизованных спин-меченых систем при  $T=160$  К характеризуются значительным уширением индивидуальных компонент, обусловленным взаимодействием нитроксильного фрагмента с окружающими его гидроксильными группами белка.

На рис. 5 представлены магнитные параметры  $g_{xx}$  и  $A_{zz}$  радикала VIII в спин-меченых волокнах хлопчатника, в целлюлозе, а также в некоторых органических растворителях ( $T=160$  К). Тот факт, что магнитные параметры образцов 5595-В и «Ташкент-1» попадают на корреляционную зависимость  $g_{xx}-A_{zz}$  для модельных систем, делает логичным предположение об идентичности структуры и полярности микроокружения радикала VIII в образце «Ташкент-1» и в этаноле, в образце 5595-В и в водно-глицериновой смеси. Иная картина наблюдается для спин-меченых образцов «Ташкент-1», зараженных вилом, и целлюлозы. Их магнитные параметры выпадают из общей корреляционной зависимости. Это может быть объяснено конформационными искажениями радикального цикла и его микроокружения в этих биополимерах.

При нагревании волокон хлопчатника 5595-В и Ц было зарегистрировано монотонное смещение  $X$ -компоненты их спектров ЭПР в слабые поля (рис. 6). Как и в случае лизоцима, это, по-видимому, вызвано ослаблением водородной связи радикального фрагмента с микроокружением при повышении температуры.

Начиная с температуры 315 К, в спектре ЭПР образца 5595-В проявляется триплет с  $g=2,00610$  и  $a=1,52$  мТ (рис. 6, а). Это может свидетельствовать о наличии в хлопковых волокнах аморфных областей, в которых метка имеет большую подвижность,  $\tau_c \approx 2,2 \cdot 10^{-10}$  с ( $T=335$  К). Оценка доли радикалов в аморфной фазе (около 2%) согласуется с ранее полученной в 3-см диапазоне регистрации ЭПР [34]. Различие изотропных  $g$ -факторов метки, находящейся в кристаллической и аморфной фазах образца ( $g_{изо_1} = 2,00553$  и  $g_{изо_2} = 2,00610$  соответственно),



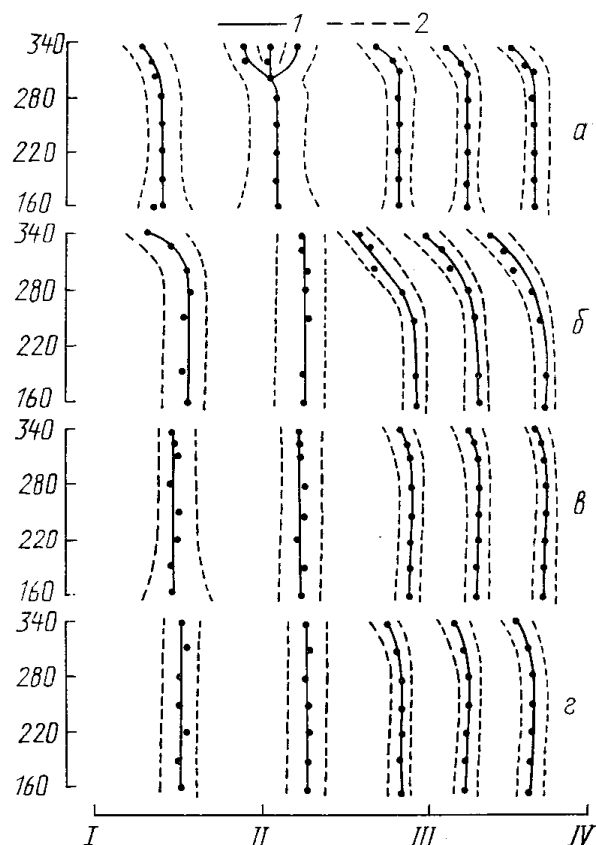
согласуется со сдвигом  $X$ -компоненты спектра ЭПР при повышении температуры в слабые поля и указывает на то, что в аморфных областях хлопковых волокон 5595-В размораживание молекулярной подвижности сопровождается ослаблением водородной связи радикала со своим микроокружением.

Рис. 5. Корреляционная зависимость  $g_{xx}-A_{zz}$  радикала VIII в замороженных ( $T=150$  К) октано (1), этаноле (2), метаноле (3), водно-глицериновой матрице (4), хлопковых волокнах «Ташкент-1» (5), «Ташкент-1»+вилт (6), 5595-В (7), целлюлозных образцах Ц (8), ЦА-I (9), ЦА-II (10) с величиной относительной влажности 0,04

В целлюлозе существования разных фаз отмечено не было.

Нагревание спин-меченого образца 5595-В до 335 К приводит к сдвигу  $Z$ -компоненты его спектра ЭПР на 0,7 мТ и ее уширению на 0,08 мТ (рис. 6, а). Такое слабое уширение линии при ее заметном сдвиге не согласуется с моделями изотропного броуновского вращения и скачков на большие углы [34, 39]. Этот эффект может быть объяснен либо компенсационным сужением линии за счет снятия неоднородного уширения, обусловленного ослаблением водородной связи в радикальном комплексе, либо наличием в системе быстрых либрационных колебаний радикального фрагмента [40] с частотой  $\nu \approx 10^9$  с $^{-1}$  и амплитудой  $10 \pm 3^\circ$  ( $T=335$  К) около выделенной  $X$ -оси радикала.

Рис. 6. Изменение положений (1) и ширины (2) компонент спектров ЭПР радикала VIII в хлопковых волокнах 5595-В (а) и целлюлозных образцах Ц (б), ЦА-I (в) и ЦА-II (г) от температуры. I—IV — компоненты эталона  $Mn^{2+}$



Анализ релаксационных изменений в спектрах ЭПР образцов целлюлозы (рис. 6, б—г) и соответствующих изменений теоретически рассчитанных спектров ЭПР [41] позволяет сделать вывод о реализации в изученных системах броуновского движения метки VIII с осью преимущественного вращения, лежащей в XZ-плоскости молекулярной системы координат. Аморфизация исходного образца приводит к затормаживанию движения метки в ЦА-I и ЦА-II (рис. 6, в, г). Интересным оказался факт частичного восстановления эластичности микроокру-

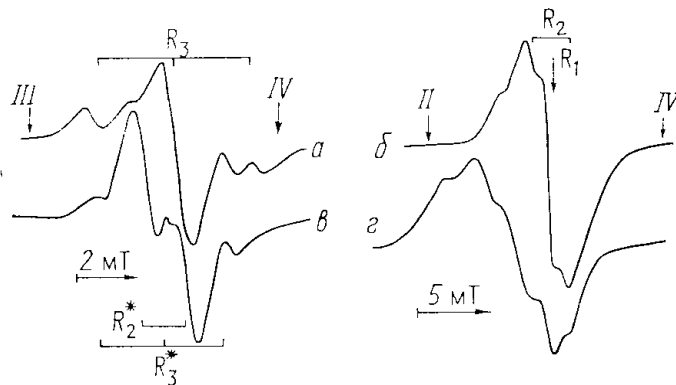


Рис. 7. Спектры ЭПР  $\gamma$ -облученных дозой 10 МРад целлюлозных образцов Ц (а, б) и ЦА-II (в, г), зарегистрированные при  $T=290$  К в 3-см (а, в) и 2-мм (б, г) диапазонах ЭПР. II—IV — компоненты эталона  $Mn^{2+}$

жения метки при бóльшей степени аморфизации образца (рис. 6, г). Энергия активации вращения радикала VIII в образцах Ц, ЦА-I, ЦА-II составила 18,4; 43,6 и 29,6 кДж/моль соответственно.

Полученные данные показывают, что движение радикала определяется в основном формой «найденной» им в целлюлозе полости и глубиной ее обработки, которая, по-видимому, приводит к уменьшению размеров этой полости и изменению конформации отдельных звеньев биополимера.

Для подтверждения этого предположения были исследованы  $\gamma$ -облученные образцы Ц и ЦА-II в 3-см и 2-мм диапазонах ЭПР.

На рис. 7 представлены спектры ЭПР указанных образцов, зарегистрированные при  $T=290$  К в этих диапазонах регистрации ЭПР. Сопоставление спектров ЭПР  $\gamma$ -облученного исходного образца Ц (рис. 7, а, б) позволяет сделать заключение о стабилизации в нем по крайней мере трех парамагнитных центров с различными магнитными параметрами:  $R_1$  — синглет с  $g_1=2,00281$ ,  $R_2$  — дублет с  $g_2=2,00295$  и  $a_2=2,9$  мТ,  $R_3$  — триплет с  $g_3=2,00442$  и  $a_3=2,7$  мТ. Такая интерпретация в основном совпадает с предложенной в работе [35], в которой приводятся результаты математического моделирования спектра ЭПР этого образца, зарегистрированного в 3-см диапазоне ЭПР. Наличие линии  $R_1$  можно отнести к остаточному лигнину [35]. Образование центров  $R_2$  и  $R_3$  может быть объяснено процессом дегидрирования глюкопиранозного цикла макромолекулы в положениях  $C_1$  и  $C_4$  соответственно. В ЦА-II при облучении, кроме перечисленных, возникают по крайней мере еще два парамагнитных центра (рис. 7, в, г):  $R_2^*$  — дублет с  $g_2^*=2,00505$  и  $a_2^*=1,5$  мТ,  $R_3^*$  — триплет с  $g_3^*=2,00532$  и  $a_3^*=2,2$  мТ. Образование этих центров в ЦА-II может быть объяснено дегидрированием глюкопиранозного цикла отличной от исходной конформации в положениях  $C_1$  и  $C_4$  соответственно.

Полученные данные дают возможность обсудить вопрос об особенностях образования радикальных комплексов в изученных системах.

Важную роль в комплексообразовании радикалов с окружением играет его структура. Шестичленные радикалы в отличие от пятичленных, имеющих плоский радикальный цикл, характеризуются креслообраз-

ной формой радикального цикла. Это отличие обуславливает большую доступность для партнеров их  $n$ -орбиталей и, следовательно, большую энергию водородной связи с микроокружением. Действительно, средний наклон корреляционных зависимостей  $g_{xx}-A_{zz}$  шестичленных (I, II) и пятичленных (III, VII, VIII) радикалов в биологических и модельных системах составляет  $2,3 \cdot 10^{-3} \text{ мТ}^{-1}$  и  $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ мТ}^{-1}$  соответственно. Это различие указывает на большее смещение спиновой плотности к атому

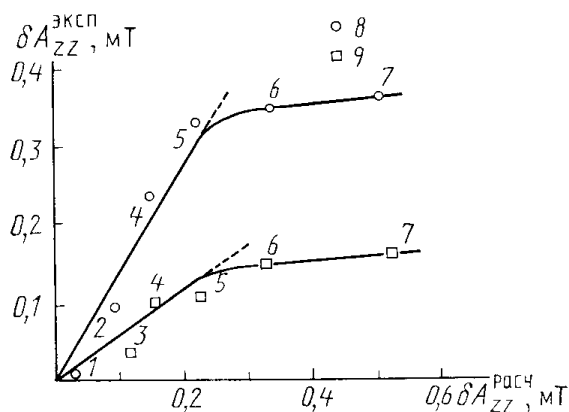


Рис. 8. Корреляционные зависимости  $\delta A_{ZZ}^{\text{эксп}} - \delta A_{ZZ}^{\text{расч}}$  для радикалов I (8) и VII (9) в замороженных ( $T=140 \text{ К}$ ) толуоле (1), изопропанолe (2),  $n$ -пропанолe (3), этанолe (4), метанолe (5), водно-этанольной матрице (3:1) (6), водно-глицериновой матрице (7)

азота при комплексообразовании шестичленных радикалов с микроокружением [17].

В биологических системах возможно образование различных типов радикальных комплексов. На рис. 8 представлены экспериментально полученные и рассчитанные по формуле (2) величины  $\delta A_{ZZ}$  шестичленного I и пятичленного VII радикалов в модельных системах. Из рисунка видно, что линейная зависимость между величинами  $\delta A_{ZZ}^{\text{эксп}}$  и  $\delta A_{ZZ}^{\text{расч}}$  для обоих радикалов сохраняется при полярности микроокружения, не превышающей 1,7 D. Этот факт указывает на существование в системах неконкурирующих электростатических и донорно-акцепторных радикальных комплексов. А разный наклон зависимостей свидетельствует о большей чувствительности шестичленных радикалов к полярности и структуре микроокружения.

Таким образом, в биологических и модельных системах магнитные параметры радикала определяются соотношением между образующимися комплексами, а также эффективной полярностью и структурой его микроокружения.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ АНИЗОТРОПНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВРАЩЕНИЙ МЕТОДОМ ЭПР 2-мм ДИАПАЗОНА С ПЕРЕНОСОМ СВЧ НАСЫЩЕНИЯ

ЭПР спектроскопия с переносом СВЧ насыщения (ЭПР ПН) существенно расширяет рамки применения метода спиновых меток и зондов в исследовании молекулярной динамики в биологических и модельных системах с временами корреляции  $\tau_c \approx 10^{-3} \div 10^{-7} \text{ с}$  [5, 42]. Однако при регистрации спектров ЭПР ПН в 3-см и 8-мм диапазонах возникают принципиальные трудности определения параметров анизотропного вращения радикалов, а также разделения эффектов движения и магнитной релаксации парамагнитных центров [31, 38, 43, 44].

В работах [45, 46] показана принципиальная возможность изучения сверхмедленных анизотропных молекулярных движений радикалов методом ЭПР ПН в 2-мм диапазоне регистрации ЭПР.

Спектры ЭПР ПН регистрируются, как известно, в условиях СВЧ насыщения и адиабатически быстрого прохождения системы спиновых пакетов. В этих условиях изменение времени спин-решеточной релаксации  $T_1$  и (или) размораживание вращения радикала вокруг выделен-

ной оси для части спиновых пакетов может приводить к нарушению условия адиабатичности [47]

$$\frac{dH}{dt} \ll \gamma H_1^2 \quad (4)$$

(здесь  $dH/dt$  — скорость изменения магнитного поля;  $\gamma$  — гиромагнитное отношение;  $H_1$  — магнитная составляющая СВЧ колебаний в месте расположения образца) и вследствие этого к снятию СВЧ насыщения.

Так, при вращении радикала вокруг молекулярной X-оси относительные амплитуды других компонент спектра ЭПР ПН уменьшаются. При этом форма спектра ЭПР ПН не будет одинаковым образом отражать изменение величины магнитной релаксации  $T_1$  и времени корреляции вращения радикала  $\tau_c$ .

Наиболее чувствительными к сверхмедленным анизотропным вращениям спиновых меток и зондов являются квадратурные составляющие первой гармоники сигнала дисперсии и второй гармоники сигнала поглощения [5, 44].

Спектры ЭПР и ЭПР ПН растворов радикалов IX и X в третбутилбензоле регистрировались в температурном интервале 90—300 К. Эти радикалы характеризуются ярко выраженным анизотропным вращением в модельных системах вокруг X- и Y-осей соответственно.

При температурах  $T \geq 180$  К движение радикалов анизотропно и происходит с временем корреляции  $\tau_c \leq 10^{-7}$  с. Экстраполяция в область  $T = 160$  К дала оценку времени корреляции их вращения  $\tau_c \approx 5 \cdot 10^{-7}$  с. При  $T < 170$  К форма сигналов первой гармоники синфазной составляющей поглощения практически не менялась. В то же время при этих температурах отмечается заметное изменение формы спектров ЭПР ПН радикалов.

Теоретические расчеты [46] показали, что отношение интенсивностей соответствующих компонент вторых гармоник квадратичной и синфазной составляющих сигнала поглощения является чувствительным лишь к времени спин-решеточной релаксации  $T_1$ ; к вращению радикала оказалось чувствительным отношение компонент его квадратурного спектра ЭПР ПН.

Отношение интенсивностей X- и Y-компонент квадратурного спектра ЭПР ПН радикала IX изменяется в интервале температур 130—170 К почти в два раза. Это свидетельствует о размораживании его вращения вокруг X-оси с временем корреляции  $\tau_c \approx 2,8 \div 4,5 \cdot 10^{-6}$  с при изменении времени спин-решеточной релаксации в 6—10 раз (рис. 9, а). В этом же температурном интервале в спектре ЭПР ПН радикала X зарегистрированы более существенные изменения (рис. 9, б). Увеличение темпера-

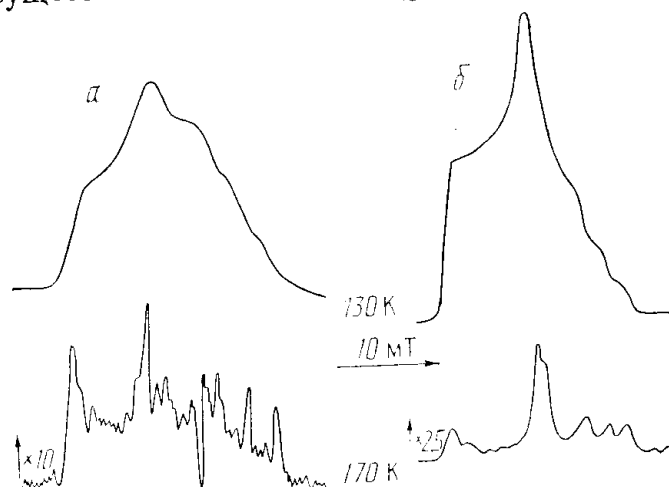


Рис. 9. Спектры ЭПР ПН (квадратурные составляющие второй гармоники сигнала поглощения) растворов радикалов IX (а) и X (б) в третбутилбензоле при температурах 130 и 170 К

туры до 170 К приводит к изменению времени корреляции его вращения в пределах  $10^{-5}$ — $10^{-7}$  с при незначительном, в 1,5—2 раза, уменьшении величины  $T_1$ .

Таким образом, наиболее сильные изменения спектра ЭПР ПН радикала IX обусловлены уменьшением величины спин-решеточной релаксации  $T_1$ , а радикала X — размораживанием сверхмедленного вращения вокруг его длинной оси. Если спин-решеточная релаксация определяется высокочастотными ограниченными по амплитуде движениями радикала, то вращательная подвижность характеризуется более медленными движениями с достаточно большой угловой амплитудой. Различия в динамике радикалов IX и X отражают, по-видимому, специфику их взаимодействия с окружением. ЭПР ПН 2-мм диапазона, следовательно, существенно расширяет возможности метода в исследовании анизотропных сверхмедленных молекулярных движений в различных биологических системах.

### ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАРАМАГНИТНЫХ ЦЕНТРОВ ПО СПЕКТРАМ ЭПР 2-мм ДИАПАЗОНА

ЭПР спектроскопия широко используется для изучения метаболических и радиационно-иницированных реакций в биологических системах [48]. Структурно-конформационные и динамические свойства модифицированных систем, а также протекающие в них биохимические реакции могут быть определены из анализа природы и характеристик стабилизированных парамагнитных центров.

В биологических системах первичными радикалами являются, как правило, центры с локализацией неспаренного электрона на атомах углерода и серы. В первом случае  $g$ -фактор парамагнитного центра обычно мало отличается от  $g$ -фактора свободного электрона. Сверхтонкое взаимодействие неспаренного электрона с ближайшими протонами и другими ядрами с ненулевым спином легко анализируется по спектрам ЭПР в широком диапазоне регистрации [48, 49]. Локализация неспаренного электрона на атоме серы обуславливает значительное отклонение  $g$ -фактора такого центра от чисто спинового, его тензорный характер. Магнитные параметры в этом случае также легко определяются из спектров ЭПР стандартных диапазонов [50].

Довольно часто в биологических системах в качестве промежуточных и конечных продуктов образуются пероксидные радикалы (ПР) ROO. В них неспаренный электрон локализован в основном на O—O-фрагменте [51]. Это обуславливает отсутствие в спектрах ЭПР ПР разрешенной СТС, близость их  $g$ -факторов, что значительно затрудняет идентификацию этих центров по спектрам ЭПР 3-см диапазона.

В работе [52] показано, что на сдвиг  $g$ -фактора ПР существенно влияют донорно-акцепторные свойства его заместителей. Основной вклад в величину этого сдвига вносит  $n-\pi^*$ -электронная конфигурация. Она же определяет величину  $g_{xx}$  и в меньшей степени величину  $g_{yy}$  ПР. Из этого следует, что идентификация ПР по их магнитным параметрам возможна при регистрации всех компонент их спектров ЭПР. Однако низкое спектральное разрешение в 3-см диапазоне ЭПР делает эту задачу трудновыполнимой.

Как и в случае нитроксильных радикалов, в 2-мм диапазоне ЭПР разрешаются все компоненты спектра ЭПР ПР [53]. Кроме того, в этом диапазоне возможна одновременная регистрация парамагнитных центров разной природы, образующихся в конденсированных средах, с близкими значениями  $g$ -фактора. Для подтверждения возможности идентификации ПР по их магнитным параметрам были сопоставлены экспериментально полученные (табл. 2) и теоретически рассчитанные магнитные параметры некоторых органических ПР [54].

На рис. 10 приведены корреляционные зависимости эксперименталь-



Таблица 2. Магнитные параметры органических пероксидных радикалов в модельных системах

Радикал	Матрица	$g_{XX}$	$g_{YY}$	$g_{ZZ}$	$g_{iso}$
$\text{HO}\cdot$	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$	2,0329	2,00806	2,00331	2,01478
$(\text{CF}_3(\text{CF}_2)_x)_2\text{CFOO}\cdot$	Собственная	2,0381	2,00742	2,00231	2,01596
$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_x\text{CF}_2\text{OO}\cdot$	»	2,0396	2,00770	2,00277	2,01670
$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{OO}\cdot$	»	2,0340			
		2,0306	2,00815	2,00279	2,01498
$(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{COO}\cdot$	$(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{CCl}$	2,0310	2,01445	2,00290	2,01612
$(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{CHOO}\cdot$	Собственная	2,0346	2,00792	2,00212	2,01488
$\text{Br}(\text{C}_6\text{H}_4)\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OO}\cdot$	»	2,0328			
		2,0228	2,00792	2,00236	2,01436
$(\text{C}_6\text{H}_5)\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OO}\cdot$	»	2,0334			
		2,0302	2,00824	2,00253	2,01472
$(\text{CH}_3)_3\text{COO}\cdot$	»	2,0336	2,00830	2,00237	2,01476
$\text{C}_2\text{H}_5(\text{CH}_3)_2\text{COO}\cdot$	»	2,0342	2,00859	2,00267	2,01415
$\text{C}_3\text{H}_7(\text{CH}_3)_2\text{COO}\cdot$	»	2,0337	2,00801	2,00251	2,01474
$\text{C}_3\text{H}_7(\text{CH}_3)\text{HCOO}\cdot$	»	2,0340			
		2,0295	2,00823	2,00240	2,01487
$\text{C}_3\text{H}_7\text{CH}_2\text{OO}\cdot$	»	2,0336	2,00816	2,00358	2,01511
$\text{C}_2\text{H}_5\text{CH}_2\text{OO}\cdot$	<i>трет</i> -Бутилбутират	2,0349	2,00792	2,00271	2,01518
$\text{CH}_3\text{CONHCHC}_3\text{H}_7$	Собственная	2,0323	2,00802	2,00187	2,01408
$\text{CH}_3\text{CON}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OO}\cdot$	»	2,0350	2,00792	2,00180	2,01490
$\text{CH}_3\text{CON}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{C}_2\text{H}_4\text{OO}\cdot$	»	2,0351			
		2,0309	2,00780	2,00181	2,01489
$\text{CH}_3\text{CONHCHCH}_3$	»	2,0320	2,00766	2,00339	2,01435
$\text{OO}\cdot$					

Примечание. Ошибка измерения величины  $g_{XX}$  составляет  $2 \cdot 10^{-4}$ , величин  $g_{YY}$  и  $g_{ZZ}$  —  $3 \cdot 10^{-5}$ . В случае расщепления X-компоненты спектра ЭПР при вычислении величины  $g_{iso}$  учитывалась высокополевая линия. Радикалы (кроме  $(\text{CF}_3(\text{CF}_2)_x)_2\text{CFOO}\cdot$ ,  $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_x\text{CF}_2\text{OO}\cdot$ ,  $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{COO}\cdot$  и  $\text{C}_2\text{H}_5\text{CH}_2\text{OO}\cdot$ ) получены путем фотолиза соответствующего гидропероксида при 77 К. Магнитные параметры образующихся в некоторых системах алкильных радикалов [53] не приведены.

ных и теоретически рассчитанных магнитных параметров первичных и третичных ПР (для вторичных ПР расчет дает аномально низкие значения магнитных параметров и заслоненную конформацию [54]). Из рисунка видно, что магнитные параметры ПР существенно зависят от донорно-акцепторных и конформационных свойств их заместителей. Поэтому появляется возможность анализировать структуру первичных

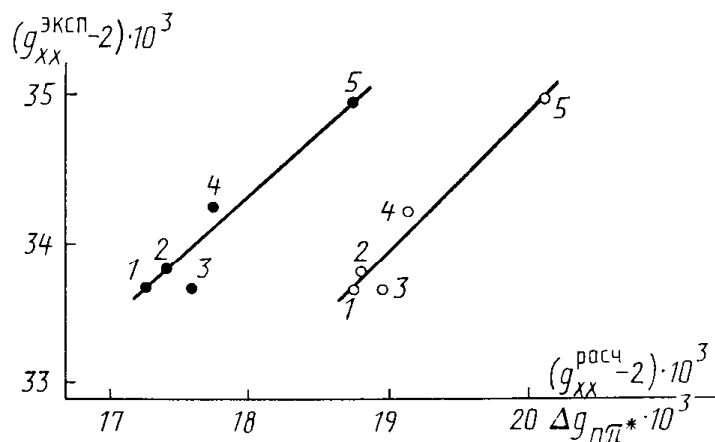


Рис. 10. Корреляционные зависимости  $g_{XX}^{\text{эксп}} - g_{XX}^{\text{расч}}$  и  $g_{XX}^{\text{эксп}} - \Delta g_{\pi\pi^*}$  для органических пероксидных радикалов  $\text{C}_3\text{H}_7\text{CH}_2\text{OO}\cdot$  (1),  $\text{C}_3\text{H}_7(\text{CH}_3)_2\text{COO}\cdot$  (2),  $(\text{CH}_3)_3\text{COO}\cdot$  (3),  $\text{C}_2\text{H}_5(\text{CH}_3)_2\text{COO}\cdot$  (4),  $\text{C}_2\text{H}_5\text{CH}_2\text{OO}\cdot$  (5).  $\Delta g_{\pi\pi^*}$  — сдвиг  $g$ -фактора за счет  $n - \pi^*$ -перехода

и третичных ПР в различных биологических системах по их спектрам ЭПР 2-мм диапазона.

Таким образом, ЭПР спектроскопия высокого разрешения позволяет идентифицировать образующиеся в биологических системах парамагнитные центры разной природы с близкими  $g$ -факторами и использовать стабильные ПР в качестве спиновых меток.

Из приведенных в настоящем обзоре данных видно, что ЭПР спектроскопия высокого разрешения является эффективным инструментом для решения широкого круга задач химической и биологической физики. Переход в 2-мм диапазон регистрации ЭПР обеспечивает получение качественно новой информации в таких областях, как метрология свободных радикалов, спиновые метки и зонды, молекулярная подвижность, электронная и пространственная структуры парамагнитных центров, локальные эффекты матрицы и т. д. Раздельная регистрация всех компонент анизотропных магнитных параметров парамагнитных центров разной природы упрощает и делает возможным анализ структурно-динамических характеристик различных спин-меченых объектов, в том числе биологических систем.

Таким образом, использование ЭПР спектроскопии высокого разрешения в сочетании с методами спиновых меток и зондов и переноса СВЧ насыщения предоставляет уникальную возможность анализа тонких структурных и динамических переходов в различных биологических системах.

Дальнейшее развитие ЭПР спектроскопии высокого разрешения для более детального изучения биологических систем, по-видимому, должно идти по пути использования импульсных методов с фурье-преобразованием спектров ЭПР.

Автор выражает искреннюю благодарность Г. И. Лихтенштейну за ценные критические замечания, а также Я. С. Лебедеву и О. Я. Гринбергу за обсуждение результатов.

### Summary

The data presented in the review demonstrate advantages of the EPR (2-mm range) method for more complete investigation by the method of spin labels and probes of structural, conformation and dynamic characteristics of egg lysozyme, human serum albumin, liposomic membranes, inverted micelles, cotton fibers, cellulose as well as of other spin-labeled biological systems. It is shown that combination of ESR of high spectral resolution and the transfer saturation method gives the possibility for detailed study of anisotropic super-slow molecular motions in biological objects. The opportunity for identification of peroxide radicals in biological systems by the ESR (2-mm range) spectra is shown.

### Литература

1. Конев С. В. Электронно-возбужденные состояния биополимеров. Минск, 1965.
2. Гольдманский В. И. Эффект Мессбауэра и его применение в химии. М., 1963.
3. Киселев Н. А. Электронная микроскопия биологических молекул. М., 1965.
4. Ohnishi S., Mc Connell H. M. // J. Am. Chem. Soc. 1965. V. 87, N 9. P. 2293—2298.
5. Spin Labeling. Theory and Application / Ed. L. Berliner. N. Y., 1976. V. 1; 1979. V. 2.
6. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М., 1974.
7. Лихтенштейн Г. И. Многоядерные окислительно-восстановительные ферменты. М., 1979.
8. Дудич И. В., Тимофеев В. П., Волькенштейн М. В., Мишарин А. Ю. // Молекулярная биология. 1977. Т. 11. С. 685—689.
9. Исаев-Иванов В. В., Лавров В. В., Фомичев В. Н. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 229, № 1. С. 70—72.
10. Hyde J. S., Dalton L. // Chem. Phys. Lett. 1972. V. 16, N 1. P. 568—572.
11. Hwang J. S., Mason R., Hwang L. P., Freed J. H. // J. Chem. Phys. 1975. V. 79, N 2. P. 489—511.
12. Гринберг О. Я., Дубинский А. А., Шувалов В. Ф. и др. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 230, № 4. С. 884—886.
13. Гринберг О. Я., Дубинский А. А., Лебедев Я. С. // Успехи химии. 1983. Т. 52, № 9. С. 1490—1513.

14. Гринберг О. Я., Дубинский А. А., Полуэктов О. Г., Лебедев Я. С. // Хим. физика. 1987. Т. 6, № 10. С. 1363—1372.
15. Гринберг О. Я., Дубинский А. А., Крымов В. Н. и др. // Хим. физика. 1988. Т. 7, № 8. С. 1011—1017.
16. Lusch W. B., Earle K. A., Freed J. H. // Rev. Sci. Instrum. 1988. V. 59, N 8. P. 1345—1351.
17. Бучаченко А. Л. Комплексы радикалов и молекулярного кислорода с органическими молекулами. М., 1984.
18. Reddoch A., Konishi S. // J. Chem. Phys. 1979. V. 70, N 6. P. 2121—2128.
19. Бучаченко А. Л., Вассерман А. М. Стабильные радикалы. М., 1973.
20. Любашевская Е. В., Анциферова Л. И., Лебедев Я. С. // Теоретич. и эксперимент. химия. 1987. Т. 23, № 1. С. 46—56.
21. Галкин В. А., Гринберг О. Я., Дубинский А. А. и др. // Приборы и техника эксперимента. 1977. № 4. С. 284.
22. Куска Х., Роджерс М. ЭПР комплексов переходных металлов: Пер. с англ. М., 1970.
23. Криничный В. И., Гринберг О. Я., Юданова Е. И. и др. // Биофизика. 1987. Т. 32, № 2. С. 215—220.
24. Лихтенштейн Г. И., Ахмедов Ю. Д., Иванов Л. В. // Молек. биология. 1974. Т. 8, № 1. С. 48—52.
25. Schmidt P. O., Kuntz I. D. // Biochemistry. 1984. V. 23, N 18. P. 4261—4265.
26. Криничный В. И., Гринберг О. Я., Богатыренко В. Р. и др. // Биофизика. 1985. Т. 30, № 2. С. 216—219.
27. Лихтенштейн Г. И., Богатыренко В. Р., Куликов А. В. // Биофизика. 1983. Т. 28, № 4. С. 585—589.
28. Криничный В. И., Гринберг О. Я., Юданова Е. И. и др. // Биофизика. 1987. Т. 32, № 1. С. 59—63.
29. Гриффит О., Джост П. // Метод спиновых меток. Теория и применение: Пер. с англ. М., 1979. С. 516—524.
30. Fendler J. H., Fendler E. J. Catalysis in micellar and macromolecular systems. N. Y., 1975.
31. Белоногова О. В., Лихтенштейн Г. И., Левашов А. В. и др. // Биохимия. 1983. Т. 48, № 3. С. 379—386.
32. Menger F. M., Saito G., Sanzero G. V., Dodd J. R. // J. Amer. Chem. Soc. 1975. V. 97, N 4. P. 909—911.
33. Криничный В. И.: Дис. ... канд. физ.-мат. наук. Черноголовка, 1986.
34. Юсупов И. Х., Бободжанов П. Х., Марупов Р. и др. // Высокомолек. соед. 1984. Т. (А) 26, № 2. С. 369—373.
35. Ершов Б. Г., Климентов А. С. // Успехи химии. 1984. Т. 53, № 12. С. 2056—2059.
36. Криничный В. И., Гринберг О. Я., Юсупов И. Х. и др. // Биофизика. 1986. Т. 31, № 3. С. 482—485.
37. Криничный В. И., Костина Н. В. // Междунар. конф. по нитроксильным радикалам: Тез. докл. Новосибирск, 1989. С. 63.
38. Марупов Р., Бободжанов П. Х., Юсупов И. Х. и др. // Биофизика. 1979. Т. 24, № 3. С. 519—523.
39. Полуэктов О. Г., Любашевская Е. В., Дубинский А. А. и др. // Хим. физика. 1985. Т. 4, № 12. С. 1615—1618.
40. Johnson M. E. // Biochemistry. 1978. V. 17, N 7. P. 1223—1228.
41. Анциферова Л. И., Любашевская Е. А. Атлас спектров 2-мм диапазона ЭПР нитроксильных радикалов. Черноголовка, 1986.
42. Hemminga M. A. // Chem. Phys. Lipids. 1983. V. 32, N 1. P. 323—383.
43. Robinson B. H., Dalton L. R. // J. Chem. Phys. 1980. V. 72, N 4. P. 1312—1323.
44. Johnson M. E., Lie L. // Biochemistry. 1982. V. 21, N 23. P. 4459—4463.
45. Lebedev Ya. S., Antsiferova L. I., Grinberg O. Ya. et al. // 2 nd Conf. Modern Methods of R. F. S. DDR-8804. 1985. P. 48—57.
46. Криничный В. И., Гринберг О. Я., Дубинский А. А. и др. // Биофизика. 1987. Т. 32, № 3. С. 534—535.
47. Бугай А. А. // Физика твердого тела. 1962. Т. 4, № 11. С. 3027—3034.
48. Ингрэм Д. Электронный парамагнитный резонанс в биологии: Пер. с англ. М., 1972.
49. Рот Г.-К., Келлер Ф., Шнайдер Х. Радиоспектроскопия полимеров: Пер. с нем. М., 1987.
50. Gordy W., Kurita Y. // J. Chem. Phys. 1960. V. 34, N 1. P. 282—288.
51. Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancerogens / Ed. D. C. H. McBrein, T. F. Slater. London, 1982.
52. McCain D. C., Palke W. E. // J. Magn. Reson. 1975. V. 20, N 1. P. 52—66.
53. Криничный В. И., Шувалов В. Ф., Гринберг О. Я., Лебедев Я. С. // Хим. физика. 1983. № 5. С. 621—627.
54. Дмитрук А. Ф., Холоимова Л. И., Криничный В. И. и др. // Хим. физика. 1986. Т. 5, № 4. С. 479—483.

Отделение Института химической физики АН СССР,  
п/о Черноголовка Московской обл.

Поступила 22.05.89.