

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ КВЧ ДИЭЛЕКТРОМЕТРИИ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОФИЗИКЕ

В. А. Кашпур, В. Я. Малеев, О. В. Хорунжая

Институт радиофизики и электроники им. А. Я. Усикова НАН Украины
12, ул. Ак. Проскуры, Харьков, 61085, Украина
E-mail: kashpur@ire.kharkov.ua

Представлен обзор результатов, полученных в отделе биофизики ИРЭ НАНУ с помощью оригинального дифференциального диэлектromетра при решении задач молекулярной биофизики. Главное внимание уделено демонстрации возможностей метода для исследования в миллиметровом диапазоне диэлектрических параметров, характеризующих взаимодействие биомолекул разного уровня сложности с водным растворителем. Приведены результаты соответствующих измерений для большого набора мономерных и полимерных образцов нуклеиновых кислот разного типа, а также белков. Показано, что дифференциальный диэлектromетр наиболее эффективен для исследования небольших изменений во взаимодействии биомолекул с растворителем, вызванных действием внешних факторов (нагрев, ионизирующее излучение, образование комплексов с активными веществами и др.). Выяснено, что поглощение СВЧ излучения биомолекулами очень мало и не может определять биологическое действие этого излучения. Главным компонентом раствора биомолекул, взаимодействующим с СВЧ волнами, является вода в области дебаевской дисперсии. Ил. 5. Табл. 5. Библиогр.: 27 назв.

Ключевые слова: дифференциальная диэлектromетрия, миллиметровые волны, гидратация, нуклеиновые кислоты, биологически активные вещества.

В последние десятилетия резко возрос интерес к исследованиям, выполненным с помощью диэлектрической спектроскопии, что связано с разработкой и усовершенствованием методов, позволяющих получить информацию о диэлектрической проницаемости веществ – в существенно расширенном частотном диапазоне (от 10^{-6} до 10^{12} Гц). Одним из наиболее распространенных методов измерения диэлектрических свойств в широком диапазоне частот является спектроскопия во временной области (*Time domain spectroscopy*). Метод основан на Фурье-преобразовании короткого импульса, искаженного при отражении от исследуемого образца [1, 2]. Получаемые при этом данные о дисперсии диэлектрических параметров, т. е. их зависимости от частоты, очень важны, так как позволяют уточнять электродинамические модели взаимодействия электромагнитных полей с исследуемым веществом. Однако широкодиапазонные методы, как правило, характеризуются худшей точностью измерения диэлектрических параметров (2-3 %) по сравнению с резонансными и волноводными методами. Поэтому такие методы малоэффективны, в частности, при анализе небольших изменений диэлектрических характеристик биологических молекул при их взаимодействии с окружающим водным растворителем.

К настоящему времени убедительно показано, что это взаимодействие («гидратация») в большой степени определяет многие свойства биомолекул – структуру, стабильность, динамику, реакцию на воздействие внешних полей и т. д. Вода, составляющая основную часть живых организмов, не является пассивной субстанцией, на фоне которой разыгрываются процессы, обусловленные исключительно структурой биомолекул.

Взаимодействие воды со многими клеточными компонентами (нуклеиновые кислоты, белки, сахара и др.) настолько сильно, что, с одной стороны, свойства этих веществ значительно изменяются (и только в этом случае они оказываются активными), а с другой – на поверхности биомолекул образуется слой видоизмененной, так называемой связанной воды, играющей ключевую роль во многих биологических процессах [3].

Поскольку клетка или, тем более, организм являются слишком сложными объектами для изучения в них на молекулярном уровне систем биомолекула – вода, то в качестве адекватных моделей используются водные растворы. Но и в растворе изучение взаимодействия между биомолекулами и водным окружением затруднено как известной нечеткостью определения самого понятия «связанная вода» (имеется некоторый интервал величин избыточной энергии взаимодействия биомолекула – вода $\Delta E = E - E_0$ по сравнению с энергией взаимодействия вода – вода E_0), так и малой величиной эффекта. Лишь незначительная часть растворителя сильно взаимодействует с биомолекулами. Мало изучены даже такие интегральные характеристики, как количество связанной воды (степень гидратации) и величины изменения этого количества в различных процессах, хотя такие сведения позволили бы определить, например, степень открытости поверхности биополимеров для их взаимодействия с лекарствами или же оценить термодинамический выигрыш, необходимый для такого комплексообразования.

Информативность КВЧ диэлектromетрии для изучения гидратации обусловлена тем, что диэлектрическая проницаемость в мм диапазоне системы биомолекула – вода состоит из

двух составляющих, частотные спектры которых лишь слегка перекрываются. Основная компонента ε_s обусловлена релаксационными колебаниями молекулярных диполей свободной воды. При $T = 25^\circ\text{C}$ время дипольной релаксации τ составляет $0,9 \cdot 10^{-11}$ с, релаксационная длина волны $\lambda_{\text{рел}} - 16,5$ мм, а соответствующая частота $f_{\text{рел}} - 18$ ГГц [1].

Времена дипольной релаксации ансамбля молекул связанной воды различны, так как отличаются величины избыточной энергии ΔE_i для i -х центров гидратации. Однако эти времена больше 10^{-9} с, что соответствует частоте ~ 100 МГц [4]. Согласно уравнению Дебая $\varepsilon' \sim 1/(1 + \omega^2\tau^2)$. Поэтому вклад в проницаемость в мм диапазоне за счет релаксации любых диполей связанной воды на несколько порядков меньше, чем проницаемость воды, и им можно пренебречь. Еще менее подвижны макромолекулы.

Вторая компонента диэлектрической проницаемости раствора биомолекул ε_∞ определяется внутримолекулярными процессами поляризации в свободной и в связанной воде, а также в макромолекулах; ее характерные частоты принадлежат оптической области. Величина ε_∞ мала (~ 4 в КВЧ диапазоне) и практически неизменна при обычных физиологических процессах. Отсюда следует, что проницаемость водного раствора в мм диапазоне будет меньше проницаемости растворителя на величину $\Delta\varepsilon_s$. Измерив эту разность и зная величины ε_∞ , а также объем биомолекул v , мы можем рассчитать количество связанной воды w (граммов воды на 1 г растворенного вещества) или его изменение [5, 6]. При малых концентрациях для вычислений справедливо простое линейное уравнение (1), где k – коэффициент пропорциональности, зависящий от формы биомолекулы; c – концентрация:

$$\Delta\varepsilon_s = kc \left[\varepsilon_s - \varepsilon_\infty \right] (v + w). \quad (1)$$

Поскольку мм диапазон является частью области дисперсии свободной воды, то для определения ε_s образца необходимо измерить действительную ε' и мнимую ε'' части комплексной диэлектрической проницаемости (КДП), а затем воспользоваться уравнением Дебая, которое точно описывает дисперсионные свойства воды

$$\varepsilon_s = \varepsilon' + \frac{\varepsilon''^2}{\varepsilon' - \varepsilon_\infty}. \quad (2)$$

Таким образом, четко определяя на молекулярном уровне «связанную воду» как такую, у которой дипольной релаксации соответствуют

частоты гораздо меньше частот мм волн (в общем случае она является ансамблем с несколько отличающимися энергиями взаимодействия), мы можем с помощью КВЧ измерений определить всё количество связанной воды.

Целью настоящей публикации является обзор результатов, полученных в отделе биофизики ИРЭ при исследовании взаимодействия с растворителем таких веществ, как нуклеиновые кислоты, компоненты и аналоги нуклеиновых кислот, белки. Большая часть приводимых данных была ранее опубликована. Мы хотим показать, какую информацию о состоянии воды в биологических образцах можно получить с помощью измерений в КВЧ области. Особенно большое внимание обращено на возможности дифференциального метода при изучении малых изменений гидратации, вызванных внешними факторами и происходящих одновременно со структурными превращениями в биомолекулах.

1. Экспериментальный метод. При определении степени гидратации биомолекул большие трудности вызывает малая величина разностей диэлектрических проницаемостей растворителя и раствора биомолекул. Наиболее адекватным методом измерения проницаемости жидкостей с большими потерями, к которым относятся водные растворы биомолекул, является, по-видимому, метод переменной толщины. С его помощью Грант и Шек определяли КДП воды при $\lambda = 8,6$ мм [7]. Использовалась ячейка, в которой длина пути, проходимого сигналом в жидкости, могла изменяться. При этом толщина слоя выбиралась такой, что ее изменение в процессе измерения не влияло на величину отражения от образца (эффективно бесконечный слой). Метод основан на определении с помощью волноводного моста изменения поглощения α и фазы β сигнала, прошедшего через исследуемый образец при изменении его длины. Затем из измеренных величин авторы находили значения КДП. В температурном интервале $1-60^\circ\text{C}$ были определены параметры дебаевской дисперсии воды: ε_∞ и $\lambda_{\text{рел}}$. Точность метода – выше 1 % как для ε' , так и для ε'' .

Взяв в качестве прототипа диэлектрометр Гранта и Шека, мы разработали дифференциальный метод, обеспечивающий нахождение разностей диэлектрических параметров в мм диапазоне с высокой точностью – до 0,1 % от значений самих параметров [8]. Основной элемент устройства – ячейка – состоит из двух последовательно расположенных кювет переменной толщины, в одной из которых находится контрольный образец (с известной проницаемостью), а в другой – исследуемый (рис. 1). Соединяет обе кюветы подвижный волновод – «челнок». При перемеще-

нии челнока общая длина рабочего слоя сохраняется, но меняются толщины слоев в каждой из кювет. Поэтому изменение амплитуды и фазы выходного сигнала является однозначной функцией разности КДП контрольного и исследуемого образцов. Разности $\Delta\alpha$ и $\Delta\beta$ определяются с помощью волноводного моста. Все измерения в мм диапазоне проводились на длине волны $\lambda = 7,6$ мм.

Значения ε' и ε'' легко вычисляются при помощи известных соотношений

$$\varepsilon' = \lambda / \lambda_{кр} + \frac{1}{2\pi} \sqrt{\beta^2 - \alpha^2}; \quad (3)$$

$$\varepsilon'' = 2 \frac{1}{2\pi} \alpha\beta, \quad (4)$$

где $\lambda_{кр}$ – критическая длина волны в волноводе.

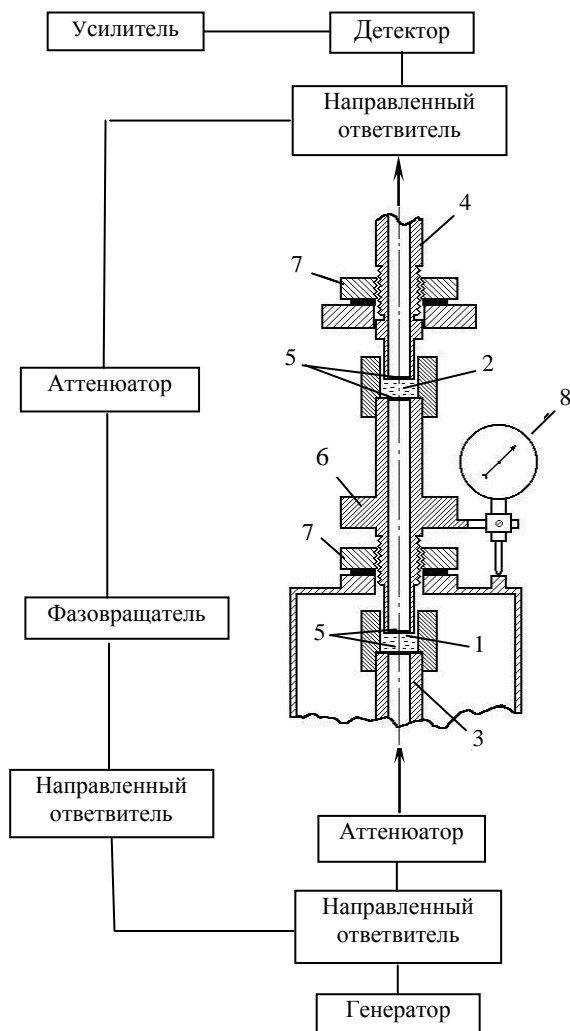


Рис. 1. Блок-схема дифференциального диэлектриметра: 1, 2 – кюветы для раствора и растворителя; 3, 4 – входной и выходной волноводы; 5 – диэлектрические пластинки; 6 – «челнок»; 7 – микровинт; 8 – индикатор

При определении $\Delta\varepsilon''$ образцов мы учитывали вклад электропроводности σ , который измеряли с помощью моста переменного тока: $\delta\varepsilon'' = \sigma / f$, где f – частота. Величины $\Delta\alpha$, $\Delta\beta$, $\Delta\varepsilon'$, $\Delta\varepsilon''$ и $\Delta\varepsilon_s$ являются разностями между соответствующими параметрами растворителя (воды или водного солевого раствора) и исследуемого образца. Необходимые для определения $\Delta\varepsilon'$, $\Delta\varepsilon''$ и $\Delta\varepsilon_s$ значения α , β , ε' , ε'' , ε_s воды рассчитывались на основании диэлектрических параметров воды, приведенных в работе [7]. При 23 °С, что соответствовало температуре проведения эксперимента, использовались следующие значения: $\alpha = 2,835$; $\beta = 5,085$; $\varepsilon' = 17,36$; $\varepsilon'' = 28,84$; $\varepsilon_s = 78,8$.

Относительная погрешность определения разностей $\Delta\alpha$ и $\Delta\beta$ составляет несколько процентов, что соответствует абсолютным погрешностям $\pm 0,005$ (дБ/мм), $\pm 0,0003$ (рад/мм); $\pm 0,005$; $\pm 0,01$ и $\pm 0,03$ для величин $\Delta\alpha$, $\Delta\beta$, $\Delta\varepsilon'$, $\Delta\varepsilon''$ и $\Delta\varepsilon_s$ соответственно. Для нуклеиновых кислот степень гидратации обычно выражали числом n молекул воды на нуклеотидное звено: $n = wM / 18$, где M – молекулярный вес нуклеотида (~ 327). Погрешность δn при использованных концентрациях составляет ± 1 .

Для изучения гидратации возможно и использование см диапазона, но измерения в мм диапазоне имеют ряд преимуществ: а) отсутствие коротковолновых участков дисперсии даже для сравнительно коротких молекул растворенных веществ; б) меньшее влияние электропроводности σ многих образцов на величину ε'' , так как вклад проводимости $\delta\varepsilon''$ в ε'' обратно пропорционален частоте: $\delta\varepsilon'' \sim \sigma / f$; в) необходимость гораздо меньшего количества исследуемого вещества.

2. Компоненты нуклеиновых кислот.

Как известно, основным повторяющимся звеном нуклеиновых кислот является нуклеотид. Он состоит из сахара (рибоза в РНК и дезоксирибоза в ДНК), соединенного с одного конца с каким-то одним из четырех азотистых гетероциклических оснований, а с другого – с фосфатной группой H_3PO_4 . Нами изучались: а) нуклеозиды аденозин, уридин и цитидин, состоящие из рибозы и оснований аденина, урацила и цитозина соответственно; б) нуклеозид дезокситимидин, состоящий из дезоксирибозы и основания тимина; в) нуклеотиды АМФ, дТМФ, УМФ, ЦМФ и ГМФ, состоящие из фосфатной группы и нуклеозидов аденозина, дезокситимидина, уридина, цитидина и гуанозина

(основание гуанин, связанный с рибозой) соответственно. Пример нуклеотида приведен на рис. 2.

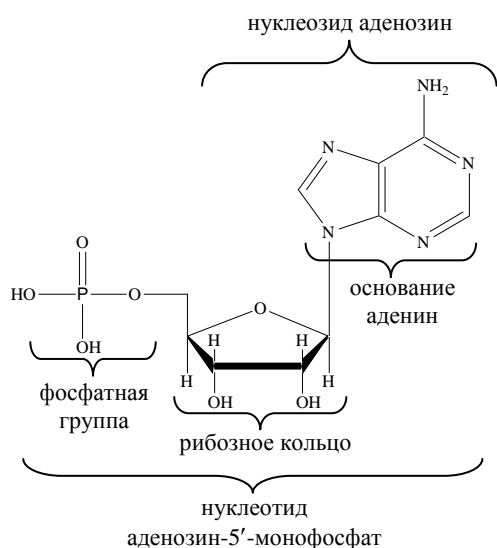


Рис. 2. Структурная формула АМФ

На рис. 3 представлены результаты изучения нуклеотидов и нуклеозидов.

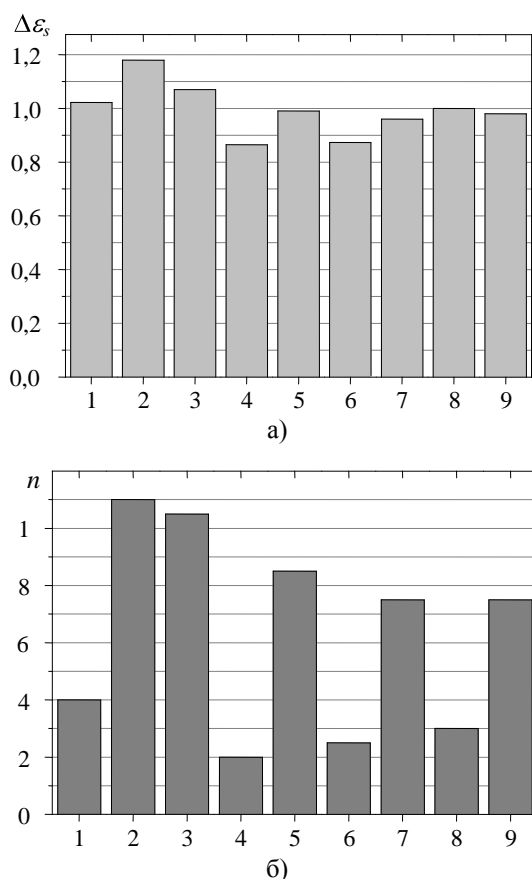


Рис. 3. Диэлектрическая проницаемость (а) и гидратация (б) нуклеозидов и нуклеотидов: 1 – аденозин; 2 – АМФ; 3 – ГМФ; 4 – итидин; 5 – ЦМФ; 6 – уридин; 7 – УМФ; 8 – дезокситимидин; 9 – дТМФ

Значения удельного объема v определены с помощью денситометра. Концентрация c составляла 1 %. В этих и в последующих измерениях $k=1,58$. Это значение является средним значением коэффициентов, определенных теоретически для двух крайних случаев – шара и цилиндра [5]. Оно соответствует также величине, найденной путем численного решения для некоторых реальных биомолекул [9]. Так как центральная частота дисперсии нуклеозидов составляет $5 \cdot 10^8$ Гц, то вклад в КДП на частоте измерения в $4 \cdot 10^{10}$ Гц за счет дипольной релаксации этих биомолекул является пренебрежимо малым, и его можно не учитывать. Сделанный вывод еще более справедлив для нуклеотидов, имеющих область дипольной дисперсии при еще более низких частотах (вследствие большей молекулярной массы).

Хотя наши измерения позволяют непосредственно оценить лишь суммарную гидратацию, но сравнение полученных данных позволяет получить более детальную картину:

- декременты $\Delta\epsilon'$, $\Delta\epsilon''$, $\Delta\epsilon_s$ для нуклеотидов заметно больше, чем для нуклеозидов. При этом их величины для пуринов (АМФ и ГМФ) гораздо выше, чем для пиримидинов (ЦМФ, УМФ и дТМФ). Эффект соответствует большему числу n связанных молекул воды с одной биомолекулой. Для первых гидратация составляет 11 молекул воды, а для вторых – лишь 8;

- вычисления, сделанные на основе полученных значений $\Delta\epsilon'$ и $\Delta\epsilon''$, показывают, что нуклеотиды связывают 7-11 молекул воды, в то время как нуклеозиды только 2-3. Следовательно, вокруг фосфатных групп должно быть не менее четырех молекул воды;

- основания связывают 1-2 водные молекулы в случае АМФ и ГМФ и 4 молекулы в случае ЦМФ, УМФ и дТМФ. Очевидно, что сахарное кольцо связывает лишь одну молекулу воды.

Особенно эффективным оказывается выявление центров связывания воды при сопоставлении КВЧ данных с результатами некоторых других исследований. Так, ИК спектроскопия не позволяет выявить молекулы связанной воды, но фиксирует те атомные группы, полосы которых проявляют наибольшие изменения по частоте и интенсивности. Сравнение с ИК спектрами нуклеотидов, полученными в отделе биофизики ИРЭ, позволило нам сделать вывод [10], что наиболее вероятными гидратно-активными центрами в случае АМФ и дТМФ являются фосфатная группа, С=О группа рибозы и группы С=N (аденин) и С2=О2 и С4=О4 (тимин).

3. Нуклеиновые кислоты. Результаты диэлектрических измерений различных нуклеиновых кислот представлены в табл. 1. Для натриевой

соли ДНК (фирма *Serva*) измерения КДП показали, что при $c = 0,6\%$ величина $\Delta\varepsilon_s$ заметно больше, чем этот же параметр для эквимолярной смеси нуклеотидов ($\Delta\varepsilon_s = 1,3$). Вычисления по уравнению (1) показывают, что с каждым нуклеотидом ДНК связано до 18 молекул воды, что согласуется с данными ИК спектроскопии и рентгеноструктурного анализа. Это значение в два раза больше того, которое соответствует в среднем отдельному нуклеотиду – 9 молекул, как это следует из рис. 3. Таким образом, образование структуры ДНК из нуклеотидов происходит одновременно с двукратным увеличением числа связанных молекул воды.

Таблица 1
Диэлектрические свойства и гидратация нуклеиновых кислот

Вещество	$c, \%$	$\Delta\varepsilon'$	$\Delta\varepsilon''$	$\Delta\varepsilon_s$	n
NaДНК	0,65	0,12	0,38	1,19	18
LiДНК	0,61	0,08	0,28	0,90	12
tРНК	1,23	0,16	0,56	1,81	12

КВЧ измерения помогают понять причину различных свойств двух солей ДНК: NaДНК и LiДНК [11]. Оптические спектры указывают на разное количество воды, контактирующей с этими двумя видами ДНК. Однако поскольку такие спектры регистрируются в специфических условиях влажной пленки, то возникает вопрос: не могут ли эти различия быть обусловлены структурой пленки, а не особенностями ДНК? Результаты диэлектromетрии показывают, что для величин $\Delta\varepsilon'$ и $\Delta\varepsilon''$ характерны существенные отличия. Особенно показательно, что для NaДНК $\Delta\varepsilon_s = 1,6$. Это намного больше, чем для LiДНК ($\Delta\varepsilon_s = 1,2$). Эффект указывает на гораздо меньшее количество связанной воды в последнем случае. Действительно, расчет по уравнению (1) свидетельствует, что только 12 молекул воды связаны с молекулой LiДНК. Поэтому следует предположить существование различных структур в водном окружении двух солей ДНК. По-видимому, ионы Li^+ обладают большим сродством к гидратно-активным центрам.

В случае транспортной РНК с каждым нуклеотидом оказались связанными 12 молекул воды, что также гораздо больше средней гидратации свободного нуклеотида [12]. Однако возрастание степени гидратации в этом случае явно меньше по сравнению с NaДНК. Поскольку главное отличие ДНК от tРНК заключается в том, что для последней только часть нуклеотидов (~ 55 %) находится в спиральной конформации, можно заключить, что именно появление жесткой спирали в нуклеиновых кислотах приводит к усилению взаимодействия с водой.

Подобным образом Умехара с сотрудниками [13] для изучения различных типов ДНК применил вариант метода временной спектроскопии. Прибор использовался в диапазоне $10^4 - 10^{10}$ Гц при $T = 20^\circ\text{C}$. Авторы зафиксировали при 100 МГц релаксационный пик, который был отнесен ими к колебаниям молекул связанной воды. Были также выполнены количественные оценки степени гидратации. Расчеты показали, что на один нуклеотид ДНК в *B* форме приходится 19 молекул связанной воды. В то же время гидратация *A* формы составляет 13, а *Z* формы – 9 молекул воды на нуклеотид.

В связи с изучением диэлектрических свойств ДНК следует остановиться на вопросе поглощения этой молекулой электромагнитных волн СВЧ диапазона. В 80-е гг. XX века появились статьи, в которых сообщалось о том, что в ДНК наблюдается гигантское поглощение (до 400 раз большее, чем у воды) [14]. Такой эффект мог бы оказаться решающим в решении проблемы нетепловых эффектов в биообъектах. В то же время другие работы не подтверждали наличия заметного поглощения, однако точность этих экспериментов была недостаточна.

Поэтому, используя метод переменной толщины, мы изучили ряд образцов ДНК. Объектами являлись как высокополимерные макромолекулы, так и фрагменты, полученные расщеплением ДНК с помощью облучения ультразвуком и расщепления с использованием фермента дезоксирибонуклеазы I. Изучались образцы ДНК, выделенные из эритроцитов цыплят и из *E. coli*. Разновидности ДНК, условия дезинтеграции и частотный диапазон были выбраны такими, чтобы фрагменты оказались идентичными тем, в которых Эдвардс с соавторами наблюдали сильное поглощение [14]. Проверка, проведенная с помощью гель-электрофореза, показала, что длины свыше 50 % фрагментов соответствовали требуемому интервалу длин.

Исследования поглощения выполнялись в см области диаграммы длин волн [15], их результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2
Поглощение растворов нативной и разрушенной ДНК

$f, \text{ГГц}$	P_{H1}	P_{Y3}	$P_{\Phi1}$	$P_{\Phi2}$	P_{H2}	$P_{\Phi3}$
8,81	0,990	0,980	1,01	1,01	1,015	0,995
9,41	0,985	1,000	1,00	1,01	1,985	0,985
9,81	0,990	1,000	1,00	1,01	1,985	1,000
10,08	-	-	0,99	1,01	1,000	1,005
10,24	0,995	0,990	-	-	-	1,005
10,90	0,990	0,985	-	-	-	1,000
11,26	0,990	0,990	-	-	-	1,005

Все данные являются средними 5-10 измерений относительных коэффициентов поглощения $P = P_s / P_o$, где P_s является коэффициентом поглощения образца, а P_o – растворителя. Видно, что относительный коэффициент поглощения раствора нативной ДНК из эритроцитов ($P_{н1}$) и коэффициент поглощения той же ДНК, но фрагментированной ультразвуком ($P_{у3}$), практически не отличаются от единицы (концентрация 0,5 %). То же можно сказать и о средних значениях коэффициентов $P_{ф1}$ и $P_{ф2}$ для растворов ДНК из эритроцитов, но фрагментированной дезоксирибонуклеазой (концентрация ДНК составляла 0,2 % и 0,6 % соответственно). В случае раствора ДНК из *E. coli* (концентрация 0,5 %) коэффициенты поглощения для образцов как нативной ($P_{н2}$), так и фрагментированной ($P_{ф3}$) ДНК практически не отличаются от единицы. Изучение зависимости поглощения ДНК от времени действия дезоксирибонуклеазы показало, что какие-либо изменения поглощения и в этом случае отсутствуют. Таким образом, мы не смогли обнаружить резонансного поглощения в ДНК. Что касается частотно независимого эффекта порядка 1 %, то он объясняется вышеупомянутым явлением гидратации. Наш вывод был подтвержден в работе [16].

4. Воздействие внешних факторов на биомолекулы. Применение дифференциального диэлектromетрического метода позволило исследовать в ряде случаев изменения состояния водного окружения, произошедшие в результате воздействия внешних факторов.

Влияние рН. Мы исследовали изменения КДП в зависимости от рН вещества, родственного ДНК – полицитидиловой кислоты (поли Ц), состоящей из повторяющегося нуклеотида ЦМФ. Известно, что поли Ц при нейтральных рН представляет собой упорядоченную одноцепочечную спиральную структуру [17]. В области $3,7 < \text{pH} < 5,5$ поли Ц образует спиральный двухцепочечный комплекс, в котором к каждой паре оснований присоединяется протон. При рН 3,5 вследствие присоединения второго протона происходит разделение комплекса на две неупорядоченные нуклеотидные цепочки. Целью нашей работы было проследить за изменениями гидратации при указанных процессах [18]. Так как для получения низких значений рН в раствор необходимо добавлять большое количество HCl, то при расчетах количества связанной воды мы учитывали влияние ионов H^+ и Cl [19] на диэлектрическую проницаемость.

Результаты, представленные в табл. 3, показывают, что при рН 8 поли Ц имеет ту же степень гидратации, что и соответствующий мононуклеотид.

Таблица 3

Диэлектрические параметры и гидратация поли Ц при различных рН

Параметры	рН 8 $c = 1,18 \%$	рН 4,5 $c = 0,97 \%$	рН 3,3 $c = 1,30 \%$
$\Delta \epsilon'$	0,08	0,10	0,04
$\Delta \epsilon''$	0,26	0,21	0,22
σ/f	0,12	0,17	0,32
$\Delta \epsilon_s$	1,34	1,26	2,16
n	7-8	8-9	11

Понижение кислотности сопровождается увеличением диэлектрического декремента и, следовательно, количества связанной воды. При рН 4,5, когда сформирована двойная спираль, гидратация слегка увеличена – на одну молекулу воды. При рН 3,3 общая гидратация нуклеотида и иона H^+ составляет 11. Учитывая, что степень гидратации иона H^+ составляет 11 молекул воды и что с поли Ц при этом рН связано 65 % протонов H^+ , мы можем прийти к выводу, что с нуклеотидом связано 5 молекул воды. Итак, разрушение упорядоченного комплекса, существовавшего при более высоких рН, приводит к разрушению гидратной оболочки и, следовательно, к снижению энергии стабилизации спиральной структуры, в которую энергия взаимодействия между макромолекулой и связанной водой вносит большой вклад [20].

Изменение степени гидратации при структурном переходе, обусловленном варьированием рН, было нами также обнаружено при измерениях КДП сывороточного альбумина [21]. Увеличение количества связанной воды в 1,5 раза соответствовало рассчитанному увеличению поверхности белка.

Влияние температуры. Другим примером изучения с помощью КВЧ диэлектromетрии влияния внешнего воздействия на биомолекулы является исследование изменений гидратации, сопровождающих температурные превращения. Цель та же – выяснение вклада водного окружения в общую энергию стабилизации белковой структуры.

В связи с этим в отделе биофизики ИРЭ были выполнены два параллельных эксперимента: калориметрическое определение теплоемкости при различных концентрациях и температурах и нахождение гидратации белка в тех же условиях при использовании КВЧ диэлектromетрии [22, 23].

На рис. 4 показана зависимость декремента $\Delta \epsilon_s$ от температуры при концентрации сывороточного альбумина 16,7 %. Видно, что возрастание температуры от 20 до 50 °С вызывает уменьшение декремента на 25 %, что соответствует уменьшению степени гидратации от 0,17 при 20 °С до 0,1 г воды на 1 г белка при 50 °С, т. е. на 0,07 г воды на 1 г белка.

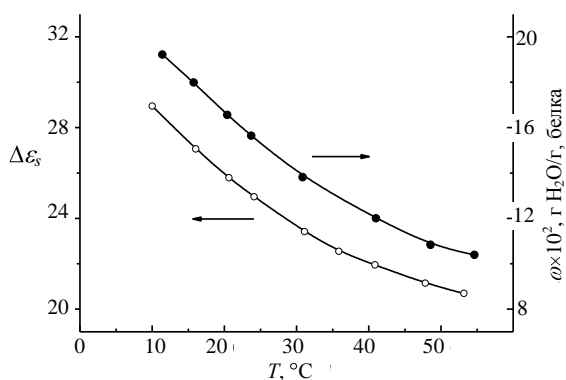


Рис. 4. Температурная зависимость декремента $\Delta\epsilon_s$ и гидратации ω альбумина при концентрации 16,7 %

С другой стороны, согласно тепловым измерениям теплоемкость в тех же условиях возрастает на $\Delta C_p = 0,015 \text{ Дж/г} \cdot \text{К}$ (от 3,705 до 3,720 Дж/г·К).

Из этих данных может быть рассчитана теплоемкость связанной воды $C_{св}$ на поверхности белка. Действительно, так как в ИК спектре альбумина нет изменений, которые указывали бы на образование новых связей, можно полагать, что обнаруженное увеличение теплоемкости раствора может быть вызвано только переходом части воды из связанного состояния в свободное.

Таким образом, частичная дегидратация белка, обнаруживаемая с помощью диэлектromетрии и происходящая в процессе нагревания, дает (вследствие разницы теплоемкостей свободной и связанной воды) вклад в энергетику структурного перехода.

Влияние радиации. КВЧ диэлектromетрия позволяет также получить данные о состоянии гидратной оболочки ДНК при воздействии ионизирующего излучения. Эти сведения необходимы, поскольку ДНК является самой важной мишенью в процессе облучения. Учитывая тесную связь между гидратацией и структурой, можно предполагать, что радиационные эффекты зависят от состояния гидратной оболочки. Известно, что свободные радикалы, атакующие ДНК, возникают в слоях связанной и свободной воды с различной интенсивностью, так что радиационные повреждения зависят от степени гидратации [24]. В случае влажных образцов выяснено также, что величина воздействия в большой мере зависит от толщины гидратного слоя и от близости молекул растворителя к ДНК. Однако информация об индуцированных радиацией изменениях параметров водного окружения, столь важного для функционирования биообъектов, отсутствует.

В табл. 4 приведены данные, полученные нами при измерениях КДП контрольного и облученных растворов NaДНК_k [25]. Концентрация ДНК составляла 0,75 %, температура – +20 °С.

Видно, что количество связанной воды на нуклеотид n уменьшается на 4 (~ 20 %) для ДНК, облученной в дозе 370 Гр ($n = 14$), по сравнению со степенью гидратации нативной ДНК, определенной нами в 18 молекул воды на нуклеотид. Этот эффект обусловлен, очевидно, нарушениями структуры водного хребта, происходящими вследствие радиационной модификации ДНК. Особо важную роль, как мы полагаем, играют искажения параметров двойной спирали, возникающие при радиационном поражении дезоксирибозила. В этом случае структура гидратной оболочки ДНК, очевидно, также должна заметно измениться. В частности, как показывает анализ, нарушаются условия формирования водных мостиков, стабилизирующих конформацию ДНК.

Таблица 4

Результаты диэлектрических измерений облученной ДНК

Вещество	$\Delta\epsilon'$	$\Delta\epsilon''$	$\Delta\epsilon_s$	n
NaДНК_k	0,14	0,44	1,37	18
ДНК (19 Гр)	0,13	0,44	1,40	18
ДНК (370 Гр)	0,11	0,37	1,18	14
ДНК (ЧАЭС)	0,09	0,31	1,00	13

Изменения комплексной диэлектрической проницаемости в мм диапазоне обнаружены и при изучении влияния слабого постоянного облучения в зоне ЧАЭС на состояние ДНК из печени крыс ($c = 0,65 \%$) [26]. Найдено уменьшение степени гидратации, которое свидетельствует об уменьшении структурирующего влияния на водное окружение для ДНК (ЧАЭС) по сравнению с контрольной NaДНК_k .

Из данных табл. 4 следует, что значения $\Delta\epsilon'$, $\Delta\epsilon''$ и $\Delta\epsilon_s$ для ДНК из печени облученных крыс заметно меньше, чем для нативной ДНК. Это справедливо и для величин $\Delta\epsilon'$, $\Delta\epsilon''$ и $\Delta\epsilon_s$. Расчет показывает, что гидратация ДНК, выделенной из печени облученных животных, составляет только 13 молекул воды на нуклеотид (для контрольной – 18). Обнаруженный эффект коррелирует с полученными нами ИК спектрами [26], на которых видно, что дегидратация сопровождается существенными послерадиационными нарушениями состояния атомных группировок оснований и сахарофосфатной цепи ДНК. Таким образом, частичное разрушение гидратной оболочки усиливает деструкцию ДНК. Можно допустить вклад в наблюдаемые эффекты и биохимических процессов, вызванных радиацией.

5. КВЧ диэлектрические свойства комплекса ДНК – БАВ. Биологически активные вещества (БАВ) способны как разрушать структуру ДНК (например, у болезнетворных микроор-

ганизмов), так и служить лекарствами. Очевидна необходимость выяснения условий, при которых был бы возможен синтез БАВ, обладающих требуемыми свойствами.

Конкурируя с водными молекулами, молекулы БАВ при контакте с ДНК значительно изменяют число молекул растворителя, доступных для нуклеиновой кислоты. Изменение количества связанной воды может быть основным параметром, вызывающим большое отрицательное изменение теплоемкости, которое обеспечивает формирование устойчивого комплекса ДНК – БАВ. Поэтому определение изменений гидратации позволяет выяснить степень стабильности комплекса.

Мы исследовали несколько веществ, образующих комплексы с ДНК. Приведем результаты изучения диэлектрических свойств комплекса ДНК с кофеином (рис. 5). Измерения водного раствора комплекса выполняли при соотношении числа нуклеотидов ДНК к числу молекул кофеина (P/D), равном 1,5:1; облучение образцов проводили в дозе 800 Гр [27].

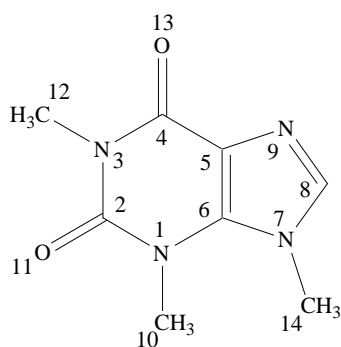


Рис. 5. Структура молекулы кофеина (К)

Из табл. 5 следует, что диэлектрические параметры комплекса не являются суммами значений компонент. Так, декремент $\Delta\epsilon_s$ меньше, чем сумма декрементов ДНК и кофеина. Вычисление показало, что степень гидратации молекулы кофеина составляет до 4 молекул воды, использовавшейся ДНК – 15-16, а комплекса ДНК – кофеин – 14-15 (как в нативном, так и в облученном состоянии).

Учитывая значение P/D , следовало ожидать, что при суммировании степень гидратации будет на 3-4 молекулы больше, чем она оказалась на самом деле. Наблюдаемый эффект дегидратации может быть объяснен образованием нескольких водородных связей между ДНК и кофеином вместо связей ДНК – вода. Из структуры кофеина (рис. 5) видно, что активные группы O11, O13 и N9 способны образовывать до 3-5 водородных связей, с помощью которых кофеин оказывается связанным с нуклеиновой кислотой (скорее всего, через фосфатные группы ДНК). Соответствующее изменение энергии должно приводить к стабилизации комплекса.

Таблица 5

Диэлектрические свойства раствора комплекса ДНК – кофеин (К)

Параметры	К	ДНК	ДНК – К	ДНК – К (800 Гр)
ϵ , %	0,8	0,63	0,63+0,24	0,63+0,24
$\Delta\epsilon'$	0,13	-0,04	0,06	0,07
$\Delta\epsilon''$	0,36	0,18	0,32	0,34
$\Delta\epsilon_s$	1,05	1,09	1,24	1,27
n	4	15-16	14	15

Отсутствие послерадиационного уменьшения гидратации, т. е. сохранение водного хребта ДНК в комплексе указывает на неизменность главных элементов структуры ДНК после облучения. Такой вывод хорошо коррелирует с отсутствием изменений в целостности ДНК, как это было показано раньше с помощью электрофореза [25], т. е. имеется тесная взаимосвязь между радиационной устойчивостью и образованием стабильной гидратной оболочки, наличие которой регистрируется с помощью диэлектрических измерений.

Выводы. Таким образом, краткий обзор результатов исследований взаимодействия биомолекул разного уровня сложности с водным растворителем, выполненных с помощью дифференциального диэлектрометрического метода в мм диапазоне длин волн, показывает перспективность метода для решения многих задач молекулярной биофизики, связанных с выяснением особенностей гидратации биомолекул в зависимости от их структуры. Этот метод особенно эффективен для исследования небольших изменений во взаимодействии биомолекул с окружающим растворителем, вызванных действием внешних факторов (температура, pH, ионизирующее облучение, образование комплексов с биологически активными веществами и др.). С его помощью выяснено также, что поглощение излучения мм и см диапазонов длин волн биологическими молекулами очень мало и поэтому не может быть основным физическим механизмом, определяющим биологическое действие этого излучения. Главным компонентом раствора биомолекул, взаимодействующим с КВЧ волнами, является вода в области дебаевской дисперсии.

Дальнейшее развитие метода предполагает возможность получения диэлектрических параметров в расширенном диапазоне частот с сохранением высокой точности измерения коэффициента поглощения и фазового сдвига.

1. Grant E. H., Sheppard R. J., South G. P. Dielectric Behaviour of Biological Molecules in Solutions. – Oxford, 1978. – 238 p.
2. Feldman Y., Andrianov A., Polygalov E. et al. Time domain dielectric spectroscopy: An advanced measuring system // Rev. Sci. Instr. – 1996. – 67, No. 9. – P. 3208-3216.
3. Малеев В. Я., Семенов М. А., Гасан А. И., Каптур В. А. Физические свойства системы ДНК – вода // Биофизика. – 1993. – 38, № 5. – С. 768-790.

4. *Mashimo S., Kuwabara S., Yagihara S., Higasi K.* Dielectric relaxation time and structure of bound water in biological materials // *J. Phys. Chem.* – 1987. – 91, No. 25. – P. 6337-6338.
5. *Buchanan T. J., Haggis G. H., Hasted J. B., Robinson B. G.* The dielectric estimation of protein hydration // *Proc. Roy. Soc.* – 1952. – A213, No. 1114. – P. 379-391.
6. *Кашпур В. А., Малеев В. Я., Щеголева Т. Ю.* Исследования гидратации глобулярных белков дифференциальным диэлектрометрическим методом // *Мол. биология.* – 1976. – 10, № 3. – С. 568-575.
7. *Grant E. H., Shack R.* Complex permittivity measurements at 8-6 mm wavelength over the temperature range 1-60 °C // *Br. J. Appl. Phys.* – 1967. – 18, No. 12. – P. 1807-1814.
8. *Кашпур В. А., Малеев В. Я.* Дифференциальный метод измерения в миллиметровом диапазоне длин волн диэлектрической проницаемости растворов с большими потерями // *Приборы и техн. эксперимента.* – 1971. – № 3. – С. 140-142.
9. *Горобченко О. А.* Метод вычисления коэффициентов деполаризации геометрических объемов и биологических структур произвольной формы // *Вісн. ХДУ. Біофіз. вісн.* – 2003. – № 2. – С. 92-96.
10. *Семенов М. А., Кашпур В. А., Большух Т. В., Малеев В. Я.* Исследование гидратации компонентов нуклеиновых кислот методами ИК-спектроскопии и СВЧ-диэлектротометрии // *Биополимеры и клетка.* – 1987. – 3, № 1. – С. 18-22.
11. *Семенов М. А., Кашпур В. А., Большух Т. В., Малеев В. Я.* Гидратация и стабильность В-формы Li-ДНК // *Биофизика.* – 1994. – 39, № 1. – С. 50-57.
12. *Большух Т. В., Семенов М. А., Кашпур В. А., Малеев В. Я.* Исследование гидратации и структурных переходов в транспортных РНК // *Вісн. ХДУ. Біофіз. вісн.* – 1999. – № 3(1). – С. 15-19.
13. *Umehara T., Kuwabara S., Mashimo S., Yagihara S.* Study on Hydration of B-, A-, and Z-DNA // *Biopolymers.* – 1990. – 30, No. 7-8. – P. 649-656.
14. *Edwards G. S., Davis C. C., Saffer J. D., Swicord J. D.* Resonant microwave absorption of selected DNA molecules // *Phys. Rev. Lett.* – 1984. – 53, No. 13. – P. 1284-1287.
15. *Maleev V. Ya., Kashpur V. A., Glibitsky G. M. et al.* Does DNA Absorb Microwave Energy? // *Biopolymers.* – 1987. – 26, No. 11. – P. 1965-1970.
16. *Foster K. P., Epstein B. R., Gealt M. A.* "Resonances" in the dielectric absorption of DNA? // *Biophys. J.* – 1987. – 52, No. 3. – P. 421-425.
17. *Chou C. H., Thomas G. J.* Raman Spectra Studies of Nucleic Acids // *Biopolymers.* – 1977. – 16, No. 4. – P. 768-789.
18. *Kashpur V. A., Semenov M. A., Sagaidakova N. N.* Relaxation and spectroscopic manifestations of hydration of polyribocytidylic acid // *Bioph. Bull.* – 1999. – No. 5. – P. 29-32.
19. *Ахадов Я. А.* Диэлектрические свойства бинарных растворов. – М.: Наука, 1977. – 400 с.
20. *Maleev V., Semenov M., Kashpur V., Bolbukh T. et al.* Structure and hydration of polycytidylic acid from the data of infrared spectroscopy, EHF dielectrometry and computer modeling // *J. Mol. Structure.* – 2002. – 605, No. 1. – P. 51-61.
21. *Kashpur V. A., Maleev V. Ya., Shchegoleva T. Yu.* Variation of hydration with pH for serum albumin // *Studia biophysica.* – 1975. – 48, No. 2. – P. 97-108.
22. *Глибицкий Г. М., Кашпур В. А.* Метод измерения диэлектрической проницаемости в миллиметровом диапазоне растворов биоматериалов в зависимости от температуры // *В кн.: Исследования взаимодействия электромагнитных волн миллиметрового и субмиллиметрового диапазонов с биологическими объектами.* – Киев: Наук. думка, 1989. – С. 10-14.
23. *Гасан А. И., Кашпур В. А., Малеев В. Я.* Термические перестройки и гидратация сывороточного альбумина // *Биофизика.* – 1994. – 39, № 4. – С. 588-593.
24. *Swarts S. G., Sevilla M. D., Becker D. et al.* Radiation-induced DNA damage as a function of hydration I. Release of unaltered bases // *Radiat. Res.* – 1992. – 129, No. 3. – P. 333-344.
25. *Кашпур В. А., Дубовицкая О. В., Красницкая А. А., Малеев В. Я.* КВЧ диэлектрометрический метод исследования

- γ-облученной ДНК // Радиофизика и электроника.* – Харьков: Ин-т радиофизики и электрон. НАН Украины. – 1997. – 2, № 2. – С. 153-155.
26. *Кашпур В. А., Хорунжая О. В., Малеев В. Я. и др.* КВЧ диэлектрическая проницаемость и структурные изменения ДНК из печени крыс, облученных в Чернобыльской зоне // *Радиофизика и электроника.* – Харьков: Ин-т радиофизики и электрон. НАН Украины. – 2001. – 6, № 2-3. – С. 345-349.
27. *Хорунжая О. В., Кашпур В. А., Красницкая А. А., Малеев В. Я.* Влияние гамма излучения на гидратацию и структуру комплекса ДНК-кофеин // *Вісн. ХДУ. Біофіз. вісн.* – 2005. – № 3(1). – С. 15-19.

APPLICATION OF DIFFERENTIAL METHOD OF EHF DIELECTROMETRY IN MOLECULAR BIOPHYSICS

V. A. Kashpur, V. Ya. Maleev,
O. V. Khorunzhaya

The review of results obtained in Department of Biophysics (IRE of NASU) by an original differential dielectrometer for solving the problems of molecular biophysics is presented. The main attention is given to demonstration of opportunities of the method to study in the millimeter range the dielectric parameters describing the interaction of biomolecules having different levels of complexity with the water solvent. The results of corresponding measurements for the large set of monomeric and polymeric samples of nucleic acids of different type, and also proteins are given. It is shown that the differential dielectrometer is most effective for investigation of little changes in interaction of biomolecules with the solvent caused by action of the external factors (heating, ionizing radiation, formation of complexes with active substances and so on). It is found that the absorption of microwave emission by biomolecules is very little and it cannot determine the biological action of this radiation. In the solution of biomolecules the main component interacting with microwaves is water in the Debye dispersion range.

Key words: differential dielectrometry, millimeter waves, hydration, nucleic acids, biologically active substances.

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ДИФЕРЕНЦІАЛЬНОЇ НВЧ ДІЕЛЕКТРОМЕТРІЇ В МОЛЕКУЛЯРНІЙ БІОФІЗИЦІ

В. А. Кашпур, В. Я. Малеев, О. В. Хорунжая

Подано огляд результатів, що отримані у відділі біофізики ІРЕ НАНУ за допомогою оригінального диференціального діелектрометра при рішенні задач молекулярної біофізики. Головна увага приділена демонстрації можливостей методу для дослідження в мм діапазоні діелектричних параметрів, які характеризують взаємодію біомолекул різного рівня складності з водним розчинником. Подано результати відповідних вимірів для великого набору мономерних і полімерних зразків нуклеїнових кислот різного типу, а також білків. Показано, що диференціальний діелектрометр найбільш ефективний для дослідження невеликих змін у взаємодії біомолекул з розчинником, що викликані дією зовнішніх факторів (нагрівання, іонізуюче випромінювання, утворення комплексів з активними речовинами та ін.). З'ясовано, що поглинання СВЧ випромінювання біомолекулами дуже мале і не може визначити біологічну дію цього випромінювання. Головним компонентом розчину біомолекул, що взаємодіє з НВЧ хвилями, є вода в області дебаєвської дисперсії.

Ключові слова: диференціальна діелектрометрія, міліметрові хвилі, гідратація, нуклеїнові кислоти, біологічно активні речовини.

Рукопись поступила 12 июня 2008 г.