Физика низких температур, 1999, т. 25, № 10, с. 1003–1020

Низкотемпературные экспериментальные исследования в молекулярной биофизике

(Обзор)

Ю. П. Благой, Г. Г. Шеина, А. Ю. Иванов, Е. Д. Радченко, М. В. Косевич, В. С. Шелковский, О. А. Боряк, Ю. В. Рубин

Физико-технический институт низких температур им. Б. И. Веркина НАН Украины, Украина, 310164, г. Харьков, пр. Ленина, 47
E-mail: blagoi@ilt.kharkov.ua

Статья поступила в редакцию 7 апреля 1999 г.

В год юбилея академика Б. И. Веркина еще раз с уважением вспоминается его огромный вклад в создание научной биофизической школы в городе Харькове. Дан обзор развития и реализации его идей в течение прошедшего двадцатилетия в отделе молекулярной биофизики ФТИНТ НАН Украины. Приведены основные результаты изучения физико-химических свойств фрагментов биополимеров и биологически активных соединений, полученные с помощью низкотемпературных методов электронно-колебательной спектроскопии, низкотемпературной вторично-эмиссионной масс-спектрометрии, низкотемпературной люминесцентной спектроскопии.

У рік ювілею академіка Б. І. Веркіна ще раз з великою повагою згадаємо про його величезний внесок у створення наукової біофізичної школи у місті Харкові. Дано огляд розвитку та реалізації його ідей на протязі минулого двадцятиріччя у відділі молекулярної біофізики ФТІНТ НАН України. Приведено основні результати вивчення фізико-хімічних властивостей фрагментів біополімерів та біологічно активних речовин, отримані за допомогою низькотемпературних методів електронно-коливальної спектроскопії, низькотемпературної вторинно-емісійної мас-спектрометрії, низькотемпературної люмінесцентної спектроскопії.

PASC: 87.15.By, 87.15.Kg

Содержание

1. Введение 1004
2. Низкотемпературная оптическая спектроскопия высокого разрешения изомерных и конформационных переходов в нуклеотидных основаниях и аминокислотах 1005
   2.1. Ультрафиолетовые спектры поглощения и электронные переходы нуклеотидных оснований в Ar матрицах 1006
   2.2. Изучение редких прототропных таутомеров оснований нуклеиновых кислот и модельных соединений 1006
   2. 3. Межмолекулярные взаимодействия нуклеотидных оснований и их модельных соединений в матрицах 1008
   2.4. Экспериментальное определение термодинамических параметров прототропных таутомеров оснований и конформеров глицина по данным инфракрасных спектров поглощения в матрице . . . 1008
   2.5. Влияние инертных матриц и УФ облучения на колебательные спектры нуклеотидных оснований и аминокислот 1009
   2.6. Резонанс Ферми в матричных спектрах нуклеотидных оснований и аминокислот 1010
   2.7. Внутримолекулярные водородные связи и конформационное поведение нуклеозидов 1011
3. Изучение замороженных водных растворов биологически активных соединений методом низкотемпературной вторично-ионной масс-спектрометрии 1011
4. Изучение нуклеиновых кислот, их компонентов и аналогов с помощью низкотемпературной люминесцентной спектроскопии . . . 1015
Заключение 1017
Список литературы 1018

© Ю. П. Благой, Г. Г. Шеина, А. Ю. Иванов, Е. Д. Радченко, М. В. Косевич, В. С. Шелковский, О. А. Боряк, Ю. В. Рубин, 1999

1. Введение

Одним из проявлений многогранного таланта академика Бориса Иеремиевича Веркина явился его интерес к приложению физических идей, подходов и методов к изучению физики биологических молекул. Неустанная организационная работа на протяжении всей его творческой деятельности привела к созданию в Харькове научной биофизической школы, получившей признание как в бывшем Советском Союзе, так и за рубежом. В конце 60-х годов в Физико-техническом институте низких температур АН УССР было создано несколько биофизических отделов; в 1978 г. на радиофизическом факультете Харьковского государственного университета была открыта кафедра молекулярной и прикладной биофизики, которой Борис Иеремиевич заведовал в течение нескольких лет; при содействии Б. И. Веркина в 1972 г. в Харькове был создан Институт проблем криобиологии и криомедицины (ИПКиК) АН УССР. Харьков стал центром научного общения специалистов в области биофизики: отделами биофизики Института радиофизики и электроники АН УССР и ФТИНТ АН УССР было проведено семь Всесоюзных конференций «Спектроскопия биополимеров», пять школ-семинаров по биофизике нуклеиновых кислот и две школы по применению масс-спектрометрии в биологии и медицине; ИПКиК АН УССР организовано несколько международных конференций «Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины»; Б. И. Веркин входил в оргкомитеты этих научных форумов.

Под руководством Б. И. Веркина сотрудники ФТИНТ выполняли ряд академических программ по фундаментальным исследованиям в области физики биополимеров, результаты которых представлены в нескольких сотнях научных публикаций [1] и обобщены в монографиях [2–4], а также ряд важных народно-хозяйственных программ по внедрению криогенных технологий в сельское хозяйство, пищевую промышленность, медицину, по разработке медицинского и криохирургического оборудования [5,6].

Новые экспериментальные и теоретические методы физики конденсированного состояния и низких температур, разработанные ранее во ФТИНТ, по инициативе и под руководством Б. И. Веркина были применены для изучения физических свойств биомакромолекул и их компонентов. Начиная с 1969 г. в разные периоды времени отдельные проблемы биофизики исследовались под руководством ведущих специалистов в различных областях физики в ряде отделов ФТИНТ: отделе физики жидкого состояния (Ю. П. Благой), физики кристаллов биологических молекул (Б. Я. Сухаревский), туннельной спектроскопии (И. К. Янсон), межмолекулярных взаимодействий биомолекул (Л. Ф. Суходуб), теории свойств биологических макромолекул (А. М. Косевич), теории сверхпроводимости (И. О. Кулик), и продолжаются в настоящее время в отделе молекулярной биофизики (Ю. П. Благой) [4]. Для решения ряда задач были разработаны и успешно использовались новые, нетрадиционные и уникальные методы туннельной спектроскопии, температурно-зависимой полевой масс-спектрометрии, низкотемпературного кварцевого резонатора, колебательной спектроскопии молекул, изолированных в матрицах отвердевших инертных газов, люминесцентной спектроскопии. Молекулярно-биофизические исследования при непосредственном участии, непрестанном интересе и поддержке Бориса Иеремиевича позволили получить ряд новых научных результатов.

Проведены экспериментальные и теоретические исследования конформационных и фазовых переходов в полимерной ДНК. Изучено взаимодействие нативной ДНК и синтетических олигонуклеотидов с ионами тяжелых металлов. Впервые изучена теплоемкость ДНК и белков в интервале температур 4,2–400 К, рассмотрена динамика ДНК в рамках стеклообразной модели. Выполнена серия пионерских работ по изучению энергетики межмолекулярных взаимодействий азотистых оснований, моделирующих внутримолекулярные взаимодействия в ДНК и РНК, изучена гидратация оснований, выявлен вклад различных типов взаимодействий в стабилизацию структуры молекулы ДНК. Методом спектроскопии неупругого туннельного эффекта исследованы энергетические спектры азотистых оснований. Исследовано взаимодействие ДНК и ее компонентов с фармакологическими, химиотерапевтическими препаратами, красителями; установлен молекулярный механизм действия ряда противоопухолевых препаратов.

Запатентовано несколько изобретений, связанных с разработкой криохирургического оборудования и применением технологий криоизмельчения и сублимационной сушки в пищевой промышленности [1].

В последние годы научное направление, основанное Б. И. Веркиным, продолжало развиваться, причем особое внимание уделялось использованию техники низкотемпературного эксперимента. Так, был существенно усовершенствован метод матричной изоляции для исследований термически нестабильных молекул, а также разработан новый метод низкотемпературной масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами для изучения замороженных водных растворов биологически активных соединений. Основным результатам, полученным с помощью перечисленных выше биофизических методов исследования, и посвящен данный обзор.

2. Низкотемпературная оптическая спектроскопия высокого разрешения изомерных и конформационных переходов в нуклеотидных основаниях и аминокислотах

Применение современных методов низкотемпературного эксперимента, нетрадиционных для молекулярно-биологических исследований, позволяет получить новые данные о биологических объектах. Многие важные вопросы хранения и копирования генетической информации связаны с изомерией простейших фрагментов биополимеров в различном молекулярном окружении. Среди большого разнообразия физических методов, используемых для изучения молекулярной изомерии, наиболее эффективными являются спектроскопические. Во многих случаях единственной возможностью

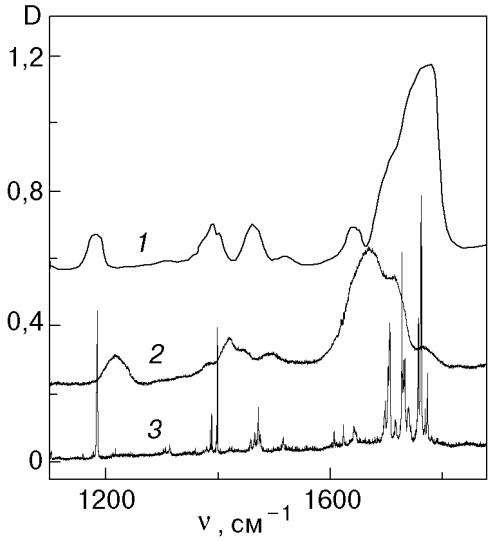

Рис. 1. ИК фурье-спектры урацила в различных агрегатных состояниях: *1* — газовая фаза, $T = 570$ К [14]; *2* — аморфная пленка урацила, $T = 12$ К; *3* — Ar матрица, при молярном соотношении M = 1:1000, $T = 12$ К. *D* — оптическая плотность, ν — волновое число.

зарегистрировать изомеры изолированных молекул является спектроскопия низкотемпературной матричной изоляции. Работы с применением этого метода, начатые в биофизическом отделе института в 1981 г. [7–10], развивались параллельно с исследованиями в европейских и американских научных центрах [11–13], что способствовало созданию нового направления в спектроскопии матричной изоляции — низкотемпературной спектроскопии изолированных биоорганических молекул.

Метод низкотемпературной спектроскопии молекул в условиях матричной изоляции получил широкое распространение благодаря ряду уникальных преимуществ перед стандартными спектроскопическими методами. Он основан на замораживании газовой фазы исследуемых молекул в жесткой инертной среде (матрице), в результате чего происходит значительное сужение ширины спектральных полос за счет ослабления межмолекулярных взаимодействий и отсутствия вращательного уширения. Данное явление хорошо иллюстрируют инфракрасные спектры поглощения урацила, полученные в газовой фазе [14], аморфной пленке и матрице Ar (рис. 1). Высокое разрешение спектров в матрицах дает возможность выделения почти вырожденных спектральных полос, полностью перекрывающихся в других агрегатных состояниях. Значительным преимуществом спектроскопии матричной изоляции по сравнению с газофазной спектроскопией является большая чувствительность и меньшие температуры испарения исследуемых термонестабильных биоорганических веществ. Необходимое количество вещества достигается благодаря его длительному накоплению в матрице. Матрица при низкой температуре работает как ловушка, сохраняющая различные изомеры испаряемых соединений. Эффективность этой ловушки зависит от высоты барьеров между энергетическими состояниями изомеров и температуры матрицы. Поэтому для исследования низкобарьерных конформационных изомеров требуются температуры ниже 10 К.

Для реализации современных возможностей метода были разработаны две универсальные установки: одна на базе модернизированного ИК спектрофотометра «Specord-IR75» и УФ спектрофотометра «Hitachi-M65», другая на базе вакуумируемого фурье-спектрометра «ФС-01». В отличие от широко применяемых в мировой практике микрорефрижераторов замкнутого цикла, понижающих температуру только до 10 К,

нами для охлаждения многопозиционных держателей оптических подложек использованы гелиевые криостаты разработки ОКТБ ФТИНТ им. Б. И. Веркина НАНУ, позволяющие снижать температуру подложек до 3 К и в одном цикле охлаждения получать несколько матричных образцов.

В наших экспериментах помимо традиционных Ar, Kr, Xe применялись также Ne матрицы, требующие температур ниже 5 К. Получаемые матричные образцы прозрачны в широком спектральном диапазоне от вакуумного ультрафиолета (УФ) до дальней инфракрасной (ИК) области. Важным узлом установок, разработанных авторами, являются низкотемпературные дифференциальные кварцевые микровесы (КМВ) чувствительностью 10^{-9} г/Гц, измеряющие скорости конденсации компонентов образца и, таким образом, позволяющие с высокой точностью получать заданные концентрации веществ в матрицах. Была проведена прямая калибровка чувствительности КМВ при температуре 5 К [15], что позволило провести эксперименты по измерению абсолютных интенсивностей полос поглощения в инфракрасных спектрах изолированных оснований и аминокислот [15,16].

2.1 Ультрафиолетовые спектры поглощения и электронные переходы нуклеотидных оснований в Ar матрицах

Традиционные методы УФ спектроскопии трудно использовать для решения ряда задач молекулярной биофизики. Поэтому нами была использована низкотемпературная методика, позволяющая проводить прямое наблюдение

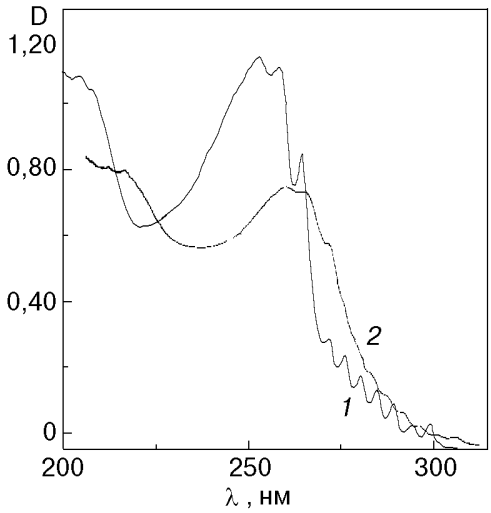

Рис. 2. Электронно-колебательные спектры цитозина в Ar матрице $T = 12$ К, кривая *1* — M = 1:500, кривая *2* — M = 1:50.

электронных переходов, отвечающих за перенос заряда в комплексах нуклеотидных оснований. При взаимодействии оснований с сильным электроноакцептором наблюдались специфические широкие полосы поглощения, максимумы которых линейно связаны со значением потенциала ионизации нуклеотидных оснований [17,18]. Экспериментальное доказательство образования пуриновыми и пиримидиновыми основаниями комплексов с переносом заряда может быть использовано для рассмотрения возможности переноса заряда в стопках оснований ДНК и интеркалирующих биологически активных соединений.

Длинноволновая полоса спектра поглощения пленки цитозина при 77 К значительно отличается от таковой для цитозина в растворе. Изучение электронных полос поглощения пиримидиновых нуклеотидных оснований в условиях слабого межмолекулярного взаимодействия в инертных матрицах при низких температурах показало, что электронные спектры поглощения цитозина, 1-метилцитозина, изоцитозина, 2-окси- и 2-амино-пиримидина, урацила, тимина в аргоновых матрицах имеют длинноволновые широкие полосы поглощения с выраженной колебательной структурой [8] (рис. 2, кривая *1*).

Полученные значения низкочастотных вибронных полос соответствуют 0–0 электронному переходу исследуемых соединений. Теоретические расчеты электронных спектров нуклеотидных оснований, имеющиеся в литературе, корректно могут быть сопоставлены только со значением электронных переходов в инертных матрицах. При увеличении концентрации вещества в матрице происходит уширение вибронных полос, их сглаживание и исчезновение колебательной структуры (рис. 2, кривая *2*). Отличительной особенностью электронных спектров пиримидиновых оснований в аргоновых матрицах является четкое проявление $n\pi^*$ полос поглощения с хорошо развитой колебательной структурой (рис. 2, кривая *1*, $\nu_{00} \simeq 300$ нм). Эти полосы связаны с переходами при возбуждении n-электронов гетероциклического азота на π^* уровни пиримидинового кольца. При образовании водородных связей в гомоассоциатах (рис. 2, кривая *2*) интенсивность $n\pi^*$ полос снижается, размывается колебательная структура и происходит их сдвиг в коротковолновую область спектра. Однако идентификация изомеров нуклеотидных оснований по спектрам

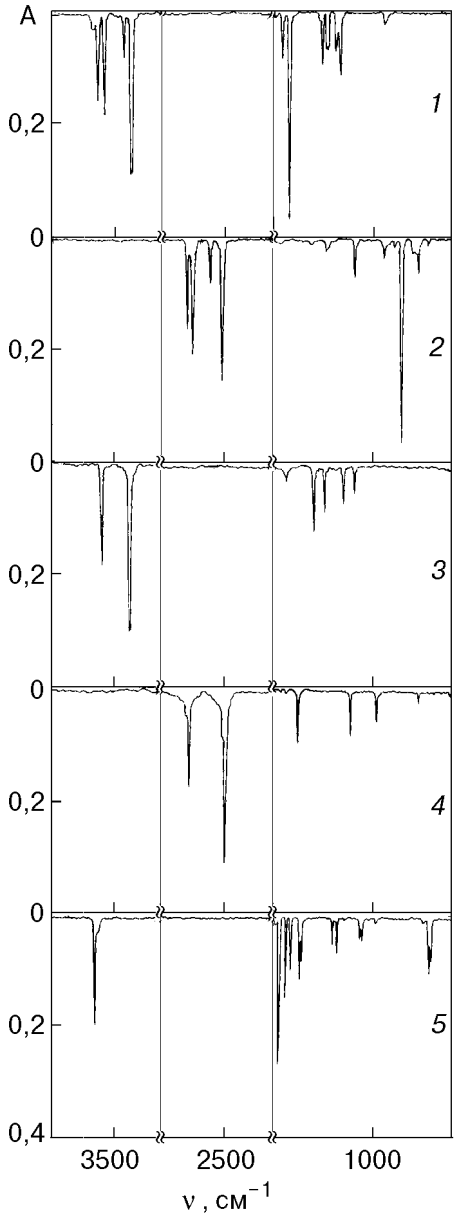

Рис. 3. ИК спектры пропускания таутомеров цитозина (*1*), дейтероцитозина (*2*), 1-метил-цитозина (3), 1-метил-дейтероцитозина (*4*) и 2-оксипиримидина (*5*) в Ar матрицах. *A* — пропускание.

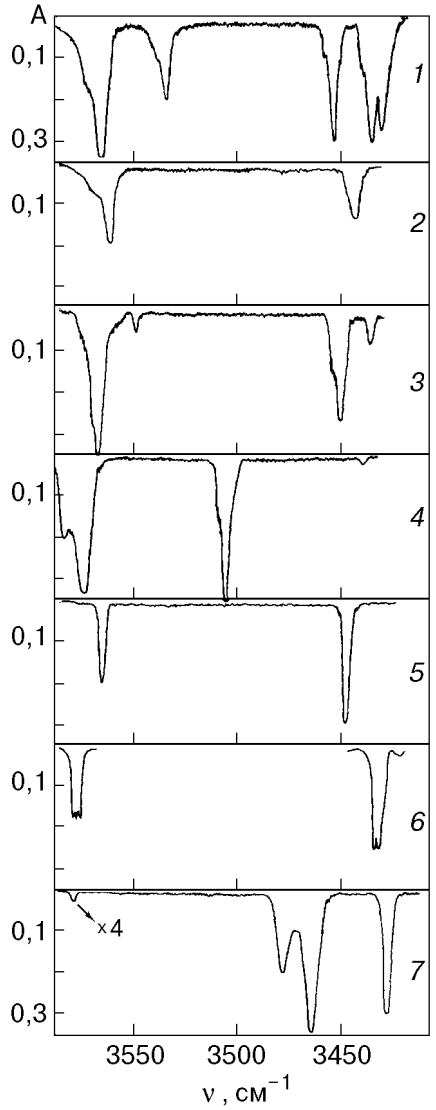

Рис. 4. ИК спектры пропускания таутомеров 9-метилгуанина (*1*), N_2,9-триметилгуанина (*2*), изоцитозина (*3*), N_2-метилизоцитозина (*4*), 2-аминопиримидина (*5*), 4-оксопиримидина (*6*) и гипоксантина (*7*) в Ar матрицах.

поглощения в УФ области затруднительна. Поэтому было необходимо использовать колебательные характеристики молекул, на основании которых можно расшифровать структуру одиночных молекул и их изомеров.

2.2. Изучение редких прототропных таутомеров оснований нуклеиновых кислот и модельных соединений

Молекулярный механизм нарушения точности копирования генетической информации таутомерными переходами был предложен Уотсоном и Криком еще в 1953 г. [19]. Однако экспериментально редкие таутомеры нуклеотидных оснований не удавалось наблюдать, хотя наличие в молекулах карбонильных и амино-групп, а также гетероциклического азота обусловливают возможность образования таутомеров. Были получены колебательные спектры высокого разрешения канонических оснований нуклеиновых кислот и более 20 модельных соединений [7,9,10,20–29]. Оказалось, что в изолированном состоянии некоторые из нуклеотидных оснований существуют в виде двух структур, находящихся в термодинамическом равновесии — традиционной кето-аминной и впервые обнаруженной экспериментально амино-енольной [7,10,20]. Благодаря высокому

разрешению спектроскопии матричной изоляции и характеристичности колебательных полос протонодонорных групп таутомерия однозначно определяется уже на уровне феноменологического функционально-группового анализа с помощью ИК спектров вспомогательных соединений. Какой из протонов участвует в таутомерном переходе, легко определить при его замене на метильную группу в 1-метилцитозине (рис. 3) [20]. При этом исчезают пики как OH-, так и N_1H-колебаний ($\nu = 3468$ см$^{-1}$). Оставшиеся две полосы принадлежат колебаниям NH_2-группы, частоты которых совпадают с частотами соответствующих пиков 2-аминопиримидина. Подобный анализ (рис. 4) и соответствующий расчет колебательных спектров позволили обнаружить редкие енольные таутомеры 9-метилгуанина [22], изоцитозина [26], гипоксантина [23,26]. По интенсивностям спектральных полос были получены константы кето-енольного равновесия для изученных молекул (таблица). Показано, что специфическим свойством существовать в двух таутомерных формах обладают гуанин и гипоксантин. Переход этих молекул в енольную форму может, по-видимому, обусловливать образование «неправильных пар» в ДНК и вызывать нарушения генетического кода.

Таблица

Термодинамические параметры кето-енольного равновесия нуклеотидных оснований. K_{eq} — константа равновесия при температуре испарения T_{ev}; ΔH — разностная энтальпия; ΔS — разностная энтропия

Соединение	T_{ev}, К	K_{eq}	ΔH кДж/моль	ΔS Дж/моль·К
Цитозин	473	0,5	—	—
Изоцитозин	458	0,16	6,3	−1,5
2-оксипиримидин	393	0,033	10,5	−1,65
9-метил-гуанин	540	0,74	—	—
Гипоксантин	553	32,2	− 13,0	5,4

2.3. Межмолекулярные взаимодействия нуклеотидных оснований и их модельных соединений в матрицах

Спектроскопия матричной изоляции имеет большие возможности для исследования спектральных характеристик гомоассоциатов и особенно водородносвязанных комплексов. В автокомплексах цитозина, 1-метилцитозина, урацила четко проявляются широкие полосы водородносвязанных колебаний малой пиковой интенсивности [27]. Исследование спектральных характеристик модельных молекул в аргоновых матрицах в широком диапазоне концентраций (1:1000–1:60) и температур (12–30 К) позволило получить количественные данные о составе мультимеров в матрицах [30]. Показано, что в диапазоне концентраций 1:500–1:100 водородносвязанные комплексы фенолов в Ar матрице представлены в основном димерами. При отжиге матриц Ar с примесными молекулами геометрических размеров типа бензола и нафталина в интервале температур 25–30 К доминирует ориентационная диффузия примесных молекул, а трансляционная диффузия отсутствует. Полученные в работах [31,32] количественные экспериментальные данные об ассоциации молекул в матрицах позволили изучить механизм связывания пиримидиновых димеров. Было показано, что в матрице Ar при образовании димеров пиримидина и 2-оксипиримидина основной вклад в связывание вносят парные вандерваальсовы взаимодействия и при этом образуются стопочные стэкинг-структуры ассоциатов. В то же время окси-производные бензола образуют в матрицах преимущественно водородносвязанные димеры с ориентацией бензольных колец в одной плоскости. Экспериментально обнаруженная особенность образования пиримидиновыми основаниями стэкинг-димеров в матрицах коррелирует со стопочной структурой пиримидиновых и пуриновых оснований в молекуле ДНК.

2.4. Экспериментальное определение термодинамических параметров прототропных таутомеров оснований и конформеров глицина по данным инфракрасных спектров поглощения в матрице

Большой практический интерес представляет экспериментальное определение констант равновесия, разностных энтальпий и энтропий изомеров в изолированном состоянии, о которых ранее имелись только данные квантовохимических расчетов. Подобные экспериментальные и теоретические исследования широко распространены для легколетучих термостабильных соединений, однако до сих пор не проводились для биоорганических молекул. Для решения данной задачи был усовершенствован метод матричной изоляции и выполнены измерения для термонестабильных пиримидиновых и пуриновых оснований и аминокислот. Температурную зависимость константы таутомерного равновесия газовой фазы, которое точно фиксируется в

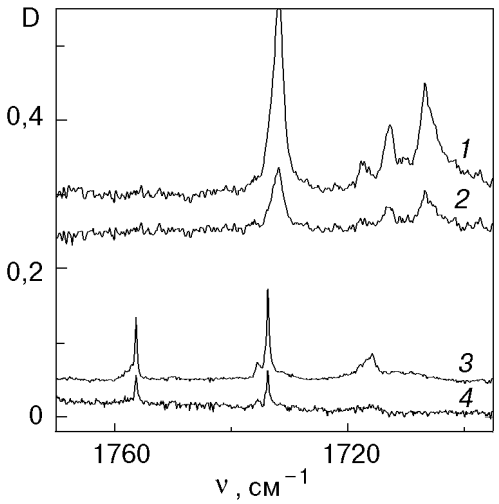

Рис. 5. Влияние температуры испарения на заселенность таутомеров изоцитозина и 2-оксипиримидина: *1* — ИК фурье-спектр изоцитозина в Ar матрице (T = 12 K, M = 1:1000) при температуре испарения T_{ev} = 378 K. *2* — разностный спектр, T_{ev} = 458 K; *3* — 2-оксипиримидин в Ne матрице (5 K, M = 1:800), T_{ev} = 315 K; *4* — разностный спектр, T_{ev} = 380 K.

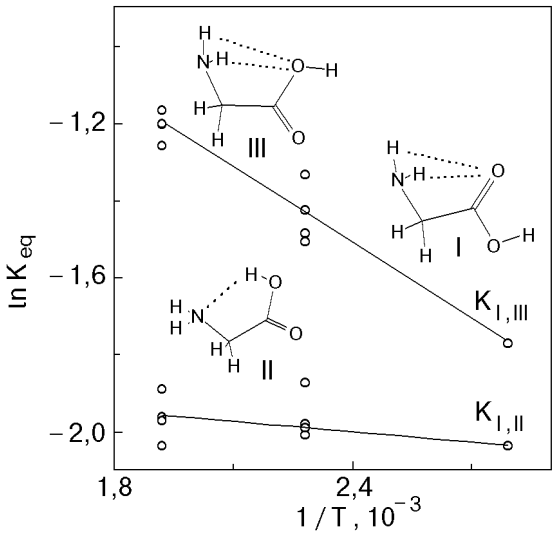

Рис. 6. Зависимость констант равновесия конформеров глицина II и III от температуры.

низкотемпературной матрице, можно получить варьированием температуры испарения. Расширение диапазона варьирования температуры (ΔT = 80–120°C) было достигнуто использованием ячеек Кнудсена разной эффективности [16]. Для определения температурного хода константы равновесия все матричные спектры приводились к равной интенсивности полос одного из таутомеров и по отношению интенсивностей полос второго таутомера измерялся сдвиг равновесия. Как показано на рис. 5, с повышением температуры испарения увеличивается интенсивность валентного колебания C=O, следовательно, растет заселенность менее стабильных кето-форм 2-оксипиримидина и изоцитозина. Образование таутомеров в ячейке Кнудсена происходит при разрыве межмолекулярных водородных связей, сопровождающемся переносом протона между молекулами. Для переноса протона в изолированной молекуле и аналогичного перераспределения заселенности таутомеров использовалось облучение матричного образца коротковолновым ультрафиолетовым излучением (λ < 240 нм), что позволило определить отношение коэффициентов молярного поглощения для полос валентных OH-NH-колебаний и, следовательно, константы кето-енольного равновесия K_{eq} при температуре испарения T_{ev} (таблица). На основании этих данных были получены разностные энтальпии ΔH и энтропии ΔS таутомеров 2-оксипиримидина, изоцитозина [33] и гипоксантина (таблица).

Аминокислоты в кристаллическом состоянии и растворах существуют в виде полярной цвиттерионной структуры, однако переходят в конформационно-подвижную нейтральную молекулярную форму в газовой фазе [34,35]. В этом случае метод матричной изоляции позволил получить колебательные спектры аминокислот алифатического ряда [16,36–42] и зарегистрировать низко-барьерный конформер глицина III [29] (рис. 6). Конформеры глицина I, II (рис. 6) с внутримолекулярной водородной связью были впервые экспериментально обнаружены методами микроволновой спектроскопии [35], однако низкая термостабильность глицина и малая чувствительность газофазной спектроскопии не позволяли исследовать термодинамические характеристики конформеров. Для варьирования температуры молекулярного пучка глицина кроме ячеек Кнудсена разной эффективности [16] был использован метод «hot nozzle» [43], который позволяет увеличить верхний порог температуры молекулярного пучка благодаря малому времени нахождения молекул в горячей зоне. Ранее этот метод применялся только для легколетучих молекул, находящихся при комнатной температуре в газовой фазе. Для повышения температуры молекулярного пучка глицина был использован теплообменник, который устанавливался между испарительной ячейкой и низкотемпературной зеркальной подложкой. Вантгоффовские зависимости констант конформационного равновесия $K_{I,II}$ и $K_{I,III}$ от температуры приведены на рис. 6. На основании

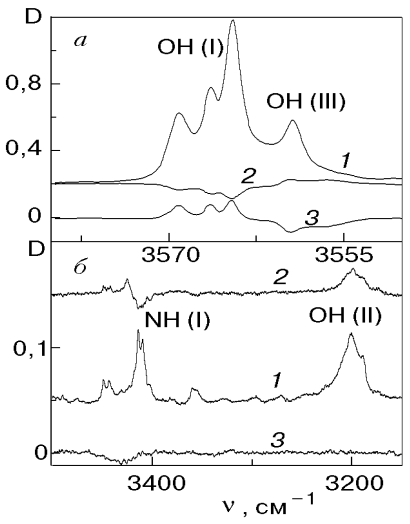

Рис. 7. ИК фурье-спектр глицина в Ar матрице, (T = 12 К, M = 1:500) в области валентных OH-колебаний (*а*) и валентных NH_2-колебаний (*б*). *1* — до УФ облучения образца; *2* — разностный спектр после облучения; *3* — разностный спектр после отжига облученного образца при 20 К.

этих данных определены величины $\Delta H_{I,II}$ = 0,8 и $\Delta H_{I,III}$ = 5,5 кДж/моль, а также $\Delta S_{I,II}$ = − 14,7, $\Delta S_{I,III}$ = 0,12 Дж/(моль·К) [16]. Значительную величину $\Delta S_{I,II}$ можно обьяснить существенным вкладом низкочастотного торсионного колебания вокруг C–C связи в колебательную энтропию конформера I. Это коррелирует с экспериментальными данными [16,39,41], которые показывают, что величина барьера вращения вокруг этой связи значительно выше у конформера II вследствие сильной внутримолекулярной водородной связи N–HO. Значительное отличие колебательных энтропий

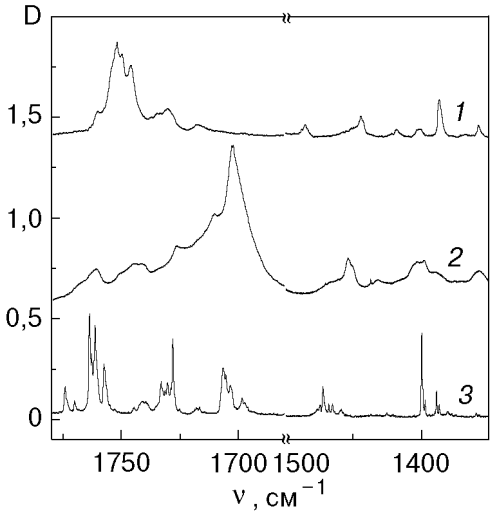

Рис. 8. Уширение полос в ИК фурье-спектрах неплоских молекул в Ar матрицах (T = 12 К, M = 1:1000): *1* — уридин; *2* — 5,6-дигидроурацил, *3* — урацил.

между конформерами I и II характерно и для остальных аминокислот алифатического ряда.

2.5. Влияние инертных матриц и УФ облучения на колебательные спектры нуклеотидных оснований и аминокислот

Несмотря на относительно слабое взаимодействие между инертной матрицей и изолированной молекулой, очень часто число полос в колебательных спектрах изолированных многоатомных молекул превышает число колебательных степеней свободы. При этом отдельные спектральные полосы превращаются в группы близко расположенных пиков (мультиплеты). Для разделения изомерного и матричного расщепления полос необходима дополнительная информация, которую можно получить, сдвинув равновесие изомеров температурой испарения или УФ облучением матрицы. Быстрая релаксация энергии возбуждения и матричная клетка препятствуют разрушению молекулы, поглотившей УФ квант, а локальный отжиг матричной клетки способствует повороту отдельных молекулярных групп. Как показано на рис. 7, после УФ облучения глицина, изолированного в Ar матрице, возрастает интенсивность полос валентных колебаний низкозаселенных конформеров II и III, но уменьшается интенсивность полос основного конформера I [40].

Расщепление полос примесных молекул в матрице в основном связано с конформациями матричной клетки. Увеличение числа конформаций, зависящее от геометрии примесной молекулы, приводит к уширению спектральных полос. Полученная большая база данных по спектрам биоорганических молекул показывает, что наибольшее сужение спектральных полос (до 0,2– 0,3 см$^{-1}$) достигается для плоских нуклеотидных оснований типа урацила [15], 2-оксипиримидина [33] или гипоксантина [26]. Этот эффект связан с встраиванием плоских молекул в плоскости матричной решетки [15] и, следовательно, уменьшением конформационной неупорядоченности матричной клетки примесной молекулы. В случае неплоских молекул (5,6-дигидроурацил, нуклеозиды, сахара) набор конформаций матричных клеток настолько велик, что полосы уширяются до 3–10 см$^{-1}$ (рис. 8).

2.6. Резонанс Ферми в матричных спектрах нуклеотидных оснований и аминокислот

Эффект расщепления полос внутримолекулярных колебаний (резонанс

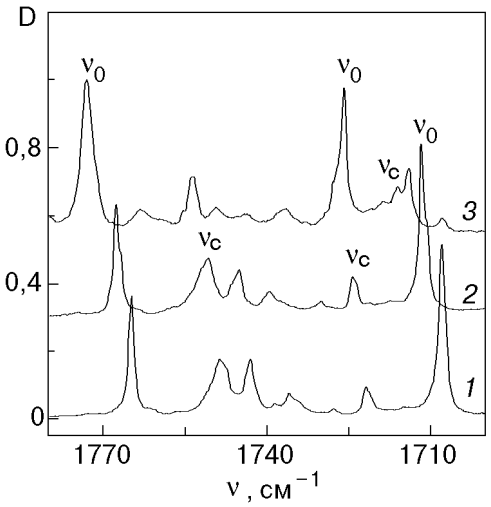

Рис. 9. Сдвиги частот и резонанс Ферми в области валентных C=O колебаний тимина в различных матрицах: *1* — Kr (T = 12 K, M = 1:1000), *2* — Ar (T = 12 K, M = 1:1000), *3* — Ne (T = 5 K, M = 1:800).

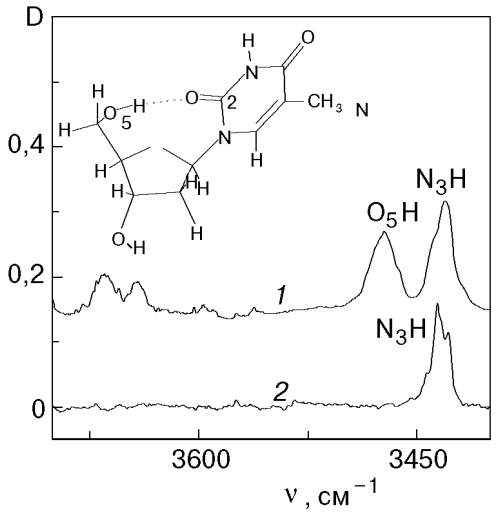

Рис. 10 ИК фурье-спектры нуклеозида (тимидин) (*1*) и его аналога *1*-метилтимина (*2*) в матрице Ar (T = 12 K, M = 1:1000).

Ферми), вызванный снятием случайного вырождения, часто наблюдается в колебательных спектрах многоатомных молекул [44]. Можно выделить спектральные области, в которых проявление резонансных расщеплений наиболее вероятно. Как правило, расщепление валентных C–H колебаний наблюдается для всех молекул с метильными и метиленовыми группами, так как первый обертон деформационного колебания C–H связи по частоте близок к валентному симметричному колебанию той же связи [44]. В матричных спектрах аминокислот и оснований данный эффект наблюдается в интервале 2800–3100 см$^{-1}$, однако наиболее интересно его проявление в области валентных C=O колебаний (1700–1800 см$^{-1}$), имеющей важное значение для изучения изомерии. Во всех изученных нами нуклеотидных основаниях было обнаружено расщепление полос валентных C=O колебаний, вызванное резонансом Ферми (рис. 5,9). Существенного изменения резонансного расщепления можно достичь при переходе от Ar или Kr к Ne матрице. Этот эффект обусловлен заметными сдвигами частот валентных колебаний, которые могут отличаться по величине и направлению от сдвигов частот обертонов или комбинационных колебаний [15]. Как показано на рис. 9, происходит реверсия основной и комбинационной полос C_4O тимина при переходе от Ar и Kr к Ne матрице. Это позволяет использовать набор матриц Kr, Ar, Ne для идентификации резонансных дублетов.

2.7. Внутримолекулярные водородные связи и конформационное поведение нуклеозидов

Такие важные классы биомолекул, как сахара и нуклеозиды значительно труднее перевести без термодеструкции в газовую фазу по сравнению с нуклеотидными основаниями и аминокислотами. Поэтому ранее в условиях слабых межмолекулярных взаимодействий эти классы молекул не изучались. Для их изучения была увеличена эффективность системы испарения и получены инфракрасные спектры поглощения изолированных в матрицах сахаров — глюкозы, рибозы, 2-дезоксирибозы и нуклеозидов — тимидина, уридина [45], аденозина. Было показано, что в изолированном состоянии сахара находятся в циклической форме и наблюдается равновесие экваториальных и аксиальных конформаций, стабилизированных внутримолекулярными водородными связями между соседними OH-группами. Как правило, нуклеозиды тимидин и уридин в кристаллическом состоянии находятся в анти-конформации, однако в изолированном состоянии было зафиксировано син-/анти-конформационное равновесие [45]. Син-конформации уридина и тимидина стабилизированы внутримолекулярной водородной связью между гидроксиметильной группой рибозы O_5H и C_2O группой пиримидинового кольца (рис. 10). В отличие от урацила и тимина, аденозин в матрице и кристаллическом состоянии находится в анти-конформации.

Представленные результаты показывают перспективность применения в биофизике низких температур для количественных измерений

спектральных и термодинамических характеристик термонестабильных биоорганических молекул. В частности, с помощью метода низкотемпературной матричной изоляции установлено, что:

— изолированные пуриновые и пиримидиновые нуклеотидные основания и их производные существуют в виде двух таутомерных структур, находящихся в термодинамическом равновесии — кето-аминной и амино-енольной формах;

— основой молекулярного механизма таутомерных переходов в нуклеотидных основаниях является синхронный перенос протона в системе межмолекулярных водородных связей ассоциатов;

для основных конформеров алифатических аминокислот характерно значительное отличие колебательных энтропий, обусловленное влиянием внутримолекулярных водородных связей на жесткость структуры конформеров.

3. Изучение замороженных водных растворов биологически активных соединений методом низкотемпературной вторично-ионной масс-спектрометрии

Появление в начале 70-х годов мягкоионизационных масс-спектрометрических методик открыло возможности для анализа труднолетучих, термически нестабильных биомолекул и изучения их невалентных взаимодействий. Стремительный прогресс экспериментальной масс-спектрометрической техники в течение последнего десятилетия и своеобразная «конверсия» методов, применявшихся ранее в ядерной физике, сняли практически все ограничения по молекулярному весу и агрегатному состоянию исследуемых веществ и сделали возможным перевод в газовую фазу макромолекул биополимеров. Столь бурное и успешное развитие масс-спектрометрических методик было вызвано все возрастающей общественной заинтересованностью в научных исследованиях в области здравоохранения, медицины, фармакологии и экологии. Масс-спектрометрия в настоящее время успешно применяется во всех этих областях [46–49].

Отмеченная «конверсия» не затронула, однако, низкотемпературные вторично-эмиссионные методики, которые применялись в основном в физико-химических исследованиях для получения больших кластеров легколетучих соединений [50, 51]. С 1992 года во ФТИНТ НАН Украины началась разработка экспериментальной техники и методики низкотемпературной вторично-ионной масс-спектрометрии (ВИМС) и ее варианта с бомбардировкой быстрыми атомами (ББА), предназначенных для изучения объектов и явлений, представляющих интерес для криобиофизики, криомедицины, криобиологии и экологии [51–63]. В основе этих методов лежит выбивание с поверхности конденсированного образца вторичных ионов под воздействием высокоэнергетичного пучка первичных ионов (ВИМС) или нейтральных атомов (ББА) [64–67]. Анализ массы и распределения распыляемых ионов дает прямую информацию о химическом составе образца и возможных межмолекулярных взаимодействиях его компонентов, а также дополнительную информацию о его физико-химических свойствах. Для проведения низкотемпературных исследований был сконструирован специализированный вторично-эмиссионный источник ионов с криогенным блоком для термостатирования образца [52]. Подложка с образцом, замороженным вне прибора или непосредственно в источнике ионов, располагается в соответствующей выемке криогенного блока; температура регистрируется с помощью термосопротивления, расположенного внутри подложки; автоматизированное управление системой термостабилизации позволяет поддерживать фиксированную температуру образца, проводить его охлаждение или отогрев в выбранном режиме.

Следует отметить, что в немногочисленных ранних физико-химических низкотемпературных исследованиях индивидуальных веществ отсутствовали адекватные модели, которые позволили бы объяснить механизмы образования кластерных ионов, структуру масс-спектров и ее зависимость от температуры [68].

Новизна предлагаемого низкотемпературного масс-спектрометрического метода состоит в разработке подходов к изучению многокомпонентных водных растворов. Одним из основных достижений, позволивших существенно продвинуть низкотемпературные вторично-эмиссионные исследования, явилась разработка модели для интерпретации низкотемпературных ББА масс-спектров [51,53,55,56,59]. Существенным моментом этого подхода является учет гетерогенной структуры конденсированного образца, формирующейся при замораживании растворов, и установление корреляций между фазовыми диаграммами для исследуемых систем

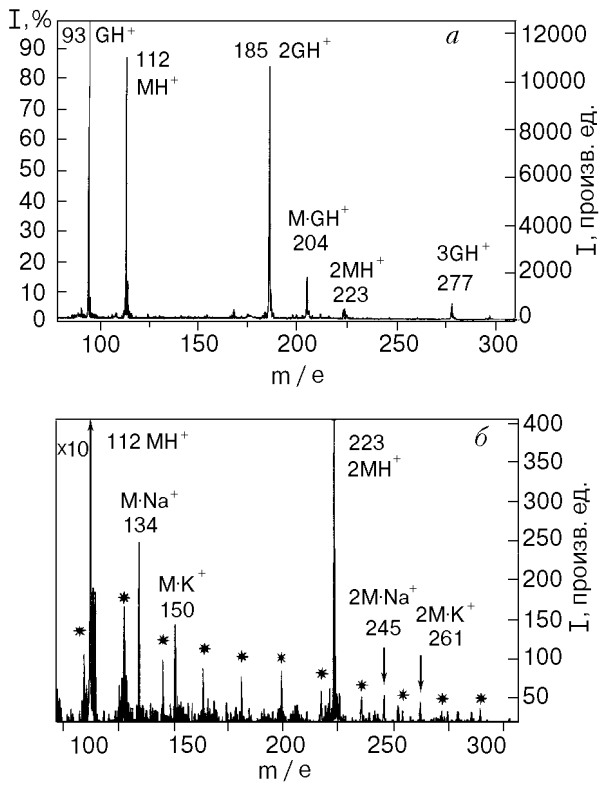

Рис. 11. Низкотемпературные масс-спектры ББА замороженных растворов цитозина ($C = 10^{-3}$ М) в присутствии следовых количеств ($C = 10^{-5}$ М) ионов щелочных металлов: в криопротекторе глицерине, $T = 220$ К, М — цитозин, G — глицерин (*а*); в деионизированной воде, $T = 210$ К; * — кластерная серия воды $(H_2O)_n \cdot H^+$ (*б*).

и характером их низкотемпературных масс-спектров.

Анализ литературных данных по исследованию структуры замороженных водных растворов методом электронной криомикроскопии [67,69,70] позволил установить, что геометрические размеры структурных элементов поверхности замороженного образца (кристаллитов, зерен, эвтектических каналов), варьирующиеся в среднем от 10^{-4} до 10^{-6} м, на несколько порядков превышают диаметр зоны, возбуждаемой ударом одной бомбардирующей частицы в условиях ББА/ВИМС, который составляет $\sim 10^{-8}$ м [64, 65]. Важным следствием такого соотношения является то, что каждая индивидуальная частица выбивает ионы из поверхностного домена определенного химического состава и интегральный спектр представляет собой суперпозицию спектров, соответствующих индивидуальным компонентам системы. Данное наблюдение позволило прояснить некоторые аспекты образования кластерных ионов [53–58]. В частности, в случае полного фазового разделения индивидуальных веществ в спектре будут присутствовать только гомоассоциаты, а появление в спектре смешанных (гетеро-) кластеров свидетельствует либо об образовании в системе нового соединения (например, кристаллогидрата), либо о наличии гомогенных аморфизованных участков, или о плавлении эвтектической фазы [59,63].

Обнаруженные закономерности были успешно применены для интерпретации низкотемпературных масс-спектров ББА [53–63]. Впервые были получены низкотемпературные масс-спектры и их температурные зависимости в интервале 77–273 К большой серии охлажденных и замороженных растворов органических и неорганических соединений в воде и органических растворителях: водных растворов солей щелочных и двухвалентных металлов [56,57,63,71], выполняющих важные биологические функции в живом организме и входящих в состав некоторых криозащитных смесей; водных растворов кислот [72], представляющих интерес в экологических исследованиях и позволяющих выявить влияние pH исходного раствора на характер масс-спектров; водных растворов криопротекторов, в том числе спиртов [53,58,63]; растворов азотистых оснований нуклеиновых кислот в воде и криопротекторах с добавлением солей металлов [54,55,71]; растворов аминокислот в спиртах [73].

При изучении физико-химических свойств перечисленных систем были получены следующие основные результаты.

Обнаружены характерные различия в низкотемпературных масс-спектрах ББА растворов азотистых оснований нуклеиновых кислот в воде и криопротекторах, отражающие свойства этих двух типов систем при замораживании (рис. 11) [54,55]. В случае водного раствора при охлаждении происходит фазовое разделение, формируются кристаллы воды, а растворенные вещества оказываются вытесненными в межкристаллитные пространства. При этом наблюдаются два негативных для нормального функционирования биомолекул эффекта: с одной стороны, органические молекулы теряют свою гидратную оболочку, а с другой, контакты между молекулами в межкристаллитных каналах приводят к усилению связывания органических молекул с ионами металлов. Эти эффекты находят отражение в характере масс-спектров. В спектре (рис. 11,*б*) наряду с серией кластеров воды $(H_2O)_n \cdot H^+$, распыляемых из кристаллов льда, и протонированного молекулярного иона

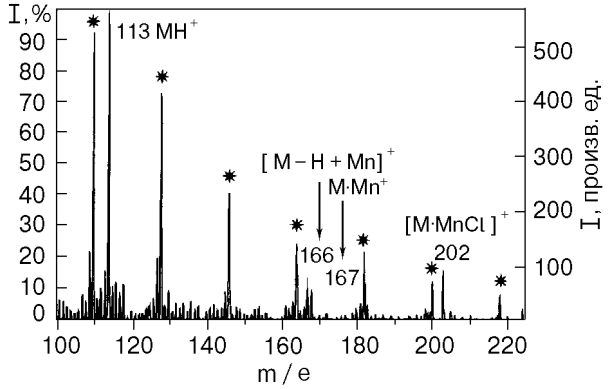

Рис. 12. Низкотемпературные масс-спектры ББА замороженного водно-солевого раствора азотистого основания урацила и $MnCl_2$ в эквимолярных концентрациях (10^{-3} М), T = 190 К, М — молекула основания.

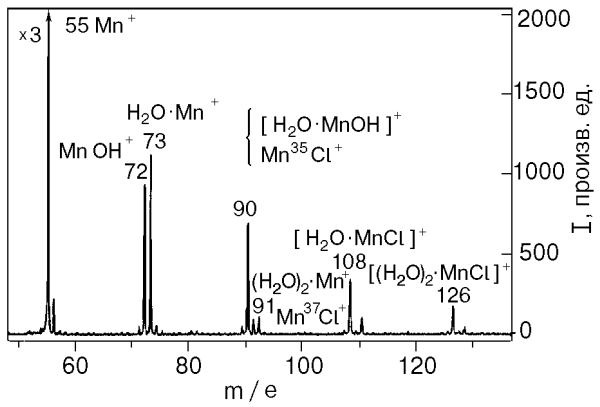

Рис. 13. Масс-спектр ББА замороженного 0,1М водного раствора соли $MnCl_2$, T = 210 К.

биомолекулы (в данном случае азотистого основания цитозина) MH^+ присутствуют ионы комплексов мономера и димера основания с ионами щелочных металлов MNa^+, MK^+, $2MNa^+$, $2MK^+$, но при этом полностью отсутствуют гидратные кластеры оснований. Количественные оценки показывают, что при молярной концентрации ионов щелочных металлов в исходном растворе на два порядка меньшей концентрации органического вещества (10^{-5} М относительно 10^{-3} М), интенсивность катионизированных пиков составляет ~ 5% от интенсивности пика молекулярного иона, т.е. практически все количество ионов металлов оказывается связанным с основаниями. В отличие от водного раствора, в низкотемпературном спектре раствора тех же веществ в криопротекторе глицерине (рис. 11,*а*) ионы, соответствующие щелочным металлам или их комплексам с основаниями, отсутствуют, тогда как присутствуют сольватные кластеры основания и его димера с глицерином MGH^+, $2MGH^+$. Эти особенности спектра характеризуют криопротекторные свойства глицерина, который при охлаждении затвердевает аморфно. При этом сохраняется гомогенное распределение веществ, характерное для раствора, комплексы оснований с ионами щелочных металлов практически отсутствуют вследствие крайне низкой константы связывания [3], однако сохраняются водородные связи молекул растворенного вещества с растворителем. Таким образом, данный метод является перспективным в дальнейших исследованиях повреждающих факторов при замораживании растворов биомолекул и оценки эффективности различных криопротекторов в широком интервале температур.

При изучении связывания ионов двухвалентных металлов с основаниями нуклеиновых кислот было обнаружено определенное сходство типов связывания в растворах при комнатной температуре и в замороженном состоянии [71]. На рис. 12 в качестве примера показан спектр водного раствора основания урацила с добавлением соли $MnCl_2$. Как и в вышеописанном случае (см. рис. 11,*б*), в спектре присутствует серия кластеров воды, протонированного молекулярного иона основания и его кластеров с ионом двухвалентного металла. Однако наряду с простой ассоциацией $M{\cdot}Mn^+$ наблюдается связывание посредством вытеснения протона из молекулы основания $[M - H + Mn]^+$, а также присоединения кластера иона металла с противоином $[M{\cdot}MnCl]^+$. Данные результаты показывают, что продукты взаимодействия типа $(M - H^+ + Mn^{2+})$, зарегистрированные ранее в водных растворах [3], сохраняются и при замораживании системы.

Обнаружен эффект фиксирования фазы продуктов гидролиза при неравновесном замораживании водных растворов хлоридов двухвалентных металлов, который может вызывать негативные последствия при отогреве биоматериала, замороженного в водно-солевых растворах. На рис. 13 приведен низкотемпературный масс-спектр замороженного водного раствора соли $MnCl_2$ [71]. При замораживании данной системы в соответствии с ее фазовой диаграммой в равновесных условиях должна образовываться фаза кристаллогидрата, которой в масс-спектре соответствуют ионы Mn^+, $(H_2O)_n{\cdot}Mn^+$, $(H_2O)_n{\cdot}MnCl^+$. Появление в спектре как данной, так и ряда других солей, ионов $MnOH^+$ и $[(H_2O)_n{\cdot}MnOH]^+$ было объяснено выделением из раствора фазы кристаллогидрата продукта гидролиза — основной соли — при сравнительно высоких скоростях замораживания,

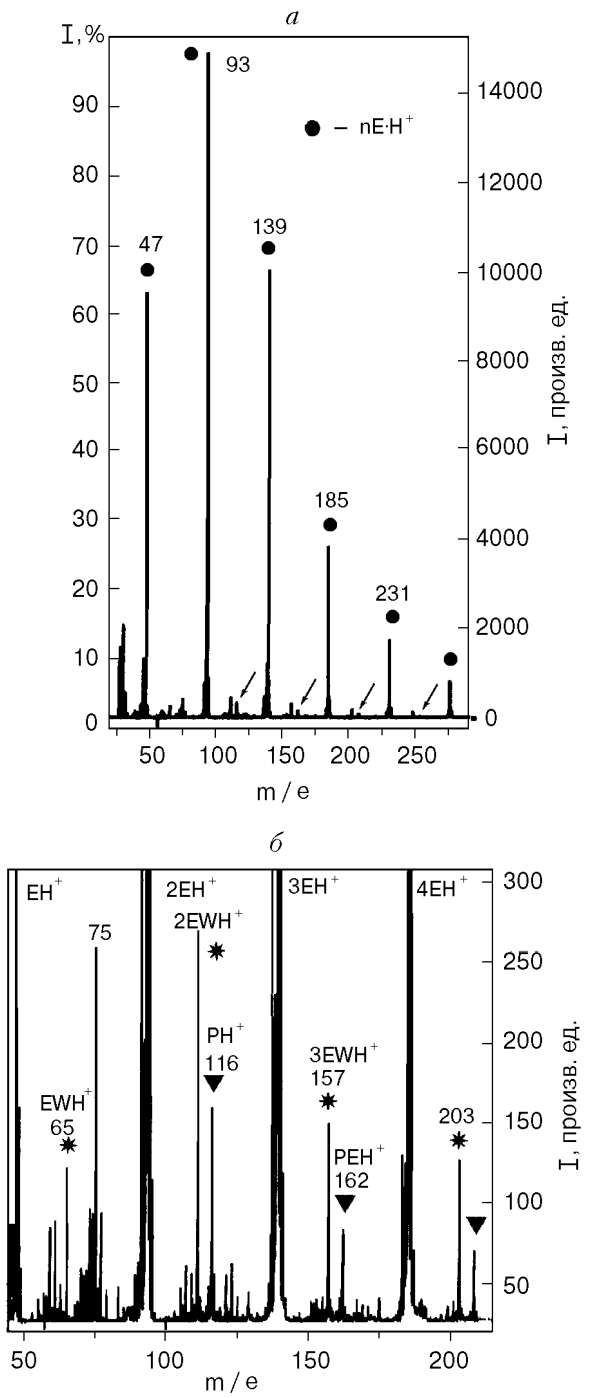

Рис. 14. Низкотемпературный масс-спектр раствора аминокислоты пролина в этаноле, полученный из жидкой фазы при температуре 150 К (полный спектр (*а*); фрагмент спектра (*б*)). Все ионы находятся в протонированной форме; P, E и W обозначают входящие в кластерные ионы молекулы пролина, этанола и воды соответственно.

применяемых при криоконсервировании. В случае водных растворов хлоридов щелочных металлов, для которых явление гидролиза не характерно, подобный эффект не наблюдался [56,57].

При изучении органических растворителей, обладающих криопротекторными свойствами, например, спиртов и их водных растворов, была установлена корреляция между фазовыми переходами в образце и характеристическими изменениями в масс-спектрах [53,58–63]. Определен температурный интервал (140–165 К), в котором одноатомный спирт этанол может находиться в жидком состоянии в условиях низкого давления (10^{-5}–10^{-7} Па) в масс-спектрометрической установке [60,62], что делает возможным масс-спектрометрическое исследование состава жидкого раствора при низких температурах [73]. На рис. 14 показан масс-спектр раствора аминокислоты пролина в этаноле при температуре 150 К. Наряду с интенсивными водородносвязанными протонированными кластерами этанола в спектре присутствует протонированный молекулярный ион пролина и его кластеры с молекулами спирта. Подобные спектры позволяют качественно оценить состав жидкой эвтектики как последней части раствора, остающейся в жидком состоянии перед полным затвердеванием образца при охлаждении [73].

Был изучен ряд эффектов, связанных с гидратацией органических и неорганических соединений. Впервые получены и интерпретированы вторично-эмиссионные масс-спектры кристаллогидратов солей и кислот при низких температурах [56,63,72]. Зарегистрировано распыление гидратных кластеров из водных растворов первичных спиртов, отражающее наличие стабильных гидратов в жидкой фазе при низких температурах [58,61,63]. Получение гидратных кластеров из образцов олигомеров полиоксиметиленов является первым случаем масс-спектрометрического наблюдения наличия сильносвязанной воды (т.е. воды, не вымораживающейся в кристаллы льда, но остающейся связанной с органической молекулой при замораживании) в твердой фазе [58,63].

Отметим, что метод вторично-эмиссионной масс-спектрометрии может также найти применение в экологических исследованиях и при моделировании процессов в верхних слоях атмосферы, в которые вовлекаются кристаллы льда с адсорбированными на их поверхности органическими и неорганическими соединениями природного и антропогенного происхождения [72].

Метод низкотемпературной масс-спектрометрии показал свою эффективность в

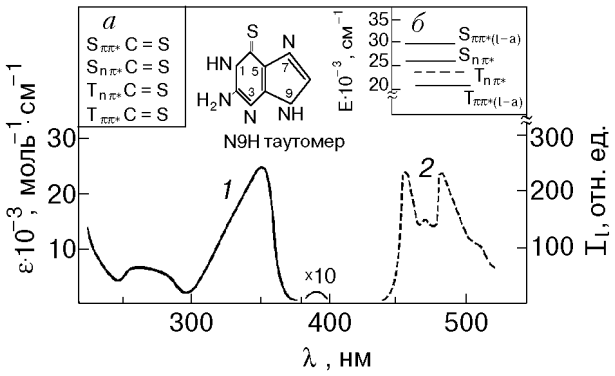

Рис. 15. Спектры УФ поглощения (*1*) и фосфоресценции (*2*) N9H таутомера 6-тиогуанина (левая ось ординат — коэффициент молекулярной экстинкции ε, правая ось ординат — интенсивность люминесценции I_l), а также локализация возбуждения в нижних электронно-возбужденных состояниях (вставка *а*) и диаграмма электронно-возбужденных состояний N9H таутомера 6-тиогуанина (вставка *б*).

изучении химического состава, фазовых переходов и влияния охлаждения на параметры межмолекулярных взаимодействий в замороженных водных растворах биологически активных соединений. К наиболее интересным результатам можно отнести:

— оценку усиления связывания ионов металлов с компонентами биополимеров вследствие повышения концентрации при охлаждении и замораживании водных растворов в сравнении с аналогичными растворами в криопротекторах;

— установление корреляций между присутствием определенных типов гидратных кластеров в масс-спектрах и наличием стабильных гидратов и сильносвязанной воды в охлажденных образцах;

— обнаружение выделения фазы, соответствующей продуктам гидролиза, при быстром замораживании растворов солей двухвалентных металлов.

Таким образом, на примере широкого круга объектов показана перспективность разработанного метода низкотемпературной масс-спектрометрии в решении ряда задач молекулярной криобиофизики, связанных с изучением процессов в охлажденных замороженных системах на молекулярном уровне.

4. Изучение нуклеиновых кислот, их компонентов и аналогов с помощью низкотемпературной люминесцентной спектроскопии

Отличительной чертой люминесценции нуклеиновых кислот и их компонентов является ее низкий квантовый выход (10^{-4}–10^{-6}) при комнатной температуре, особенно квантовый выход фосфоресценции (10^{-7}, 10^{-8}) [74]. Поэтому для исследования люминесценции нуклеиновых кислот и их компонетов широко используются низкотемпературные методики.

С целью изучения параметров люминесценции нуклеиновых кислот и их компонентов при низких температурах была создана универсальная установка, позволяющая исследовать спектры люминесценции и спектры ее возбуждения, а также поляризацию и времена затухания фосфоресценции в интервале температур 4,2–273 К [75]. Установка снабжена персональной ЭВМ, которая осуществляла автоматический контроль эксперимента (в частности, подогрев образца со скоростями от 0,5 до 50°С/мин). Для исследования растворов биополимеров были сконструированы кюветы с подогревом, позволяющие работать с водными растворами при низких температурах. Для поляризацонных исследований был сконструирован безвакуумный оптический криостат [76], способный работать как в проточном, так и в стационарном режиме.

На этой установке были проведены исследования ионных и таутомерных (изомерных) равновесий минорного основания РНК — 4-тиоурацила (4SU) и противоопухолевого препарата — 6-тиогуанина (6SG), квазичастичных возбуждений в ДНК, РНК и полиG, а также структурных и фазовых переходов в спиртах, водных растворах криопротекторов и ДНК в интервале температур 4,2–273 К. Люминесцентные исследования были дополнены исследованиями УФ абсорбционной спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма (КД), а также теоретическими расчетами на суперкомпьютерах фирмы Silicon Graphics.

В полученных низкотемпературных спектрах люминесценции с хорошо разрешенной колебательной структурой удалось обнаружить и спектрально выделить различные изомеры 6SG в полярном растворителе. Подробное изучение спектров люминесценции ионных форм 4SU и 6SG позволило построить схемы кислотно-основных и таутомерных равновесий этих соединений в полярных растворителях [77–80].

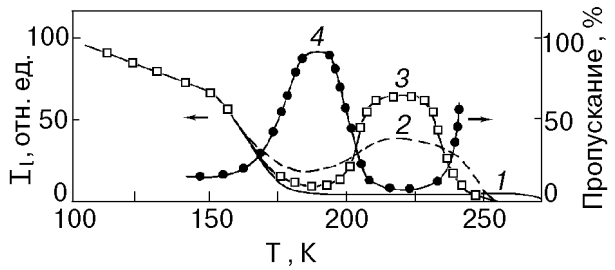

Рис. 16. Температурная зависимость свечения зонда – 6SGR в водных растворах пропандиола при различных концентрациях пропандиола, %: 15 (*1*), 40 (*2*), 55 (*3*). Прозрачность образцов с концентрацией пропандиола 55% (*4*).

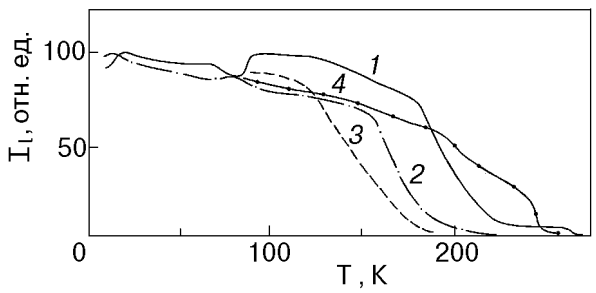

Рис. 17. Температурная зависимость излучения 6SGR, внедренного в ДНК, при различных условиях: *1* – водный раствор, *2* – 15% раствор пропандиола, *3* – 15% раствор диметилсульфоксида, *4* – температурная зависимость эмиссии 6SGR в гидратированной пленке ДНК (зонд не был внедрен в ДНК).

Изучение параметров люминесценции (соотношения интенсивности флуоресценции и фосфоресценции, поляризации, времен затухания фосфоресценции) совместно с данными УФ и КД спектроскопии дало возможность построить диаграммы электронно-возбужденных состояний 4SU и 6SG (рис. 15) [81–83] и показать существование в изученных молекулах электронных переходов, обусловленных внутримолекулярным переносом заряда. Впервые было достоверно установлено существование низкоэнергетических электронных переходов $n\pi$ типа в основаниях нуклеиновых кислот [81,82,84].

Исследование низкотемпературных спектров люминесценции ДНК, РНК, полиG и модельных систем с различным содержанием 6SG, 4SU и ионов Tb^{+3} позволило изучить процессы миграции энергии в этих полимерах, в частности, определить радиусы синглетного переноса, скорости триплетного переноса и т. д. [85–89]. Например, изучение спектров люминесценции водных растворов ДНК при 77 К со встроенным методом биосинтеза 6-тиогуанином и без него выявило значительные различия этих спектров. Спектры люминесценции ДНК с 6SG имеют интенсивное излучение в области $\lambda = 450–550$ нм, характерное для фосфоресценции 6SG. В то же время низкое содержание 6SG в ДНК (относительная концентрация 6SG в ДНК была 1:600 или 1:3000) и очень слабое поглощение 6SG в области 280 нм (длина волны возбуждения люминесценции ДНК) не позволяет объяснить наблюдаемые различия спектров простым включением 6SG в состав ДНК. Было показано, что спектр поглощения 6SG хорошо перекрывается со спектром люминесценции ДНК. Это является предпосылкой для эффективного переноса возбуждения на 6SG в составе ДНК по индуктивно-резонансному механизму. Расчет радиуса переноса синглетного возбуждения по формуле Ферстера дал величину $R_0 = 28$ Å [85].

Анализ спектров люминесценции модельных систем с различным содержанием 4SU, имитировавших тРНК, привел к выводу о миграции энергии в тРНК по индуктивно-резонансному и обменно-резонансному механизмам и позволил расшифровать спектр тРНК, в состав которой входит 4-тиоурацил [86,87]. Проведенные нами исследования фотофизических процессов в молекуле 4-тиоурацила обеспечивают широкое применение 4-тиоурацила в качестве люминесцентной метки, а также мишени для образования фотохимической связи с участием 4-тиоурацила при изучении рибосом и разнообразных белково-нуклеиновых комплексов [90,91].

Как известно, двухспиральные молекулы ДНК являются квазиодномерными структурами. Для выявления особенностей миграции энергии в низкоразмерных системах были изучены спектры низкотемпературной люминесценции и кинетика затухания фосфоресценции полигуаниловой кислоты с ионами Tb^{+3}, играющими роль ловушек электронного возбуждения [88,89]. Показано, что затухание фосфоресценции ловушки описывается неэкспоненциальной зависимостью вследствие миграции триплетного возбуждения в квазиодномерной системе, и скорость прыжка триплетного возбуждения имеет величину $\sim 2\cdot10^5$ c^{-1}.

При низкотемпературных исследованиях биополимеров был развит и усовершенствован метод фосфоресцентного зонда [82,85,88]. Подробное исследование спектроскопических свойств 6SG позволило использовать его в

качестве фосфоресцентного зонда для изучения структурных и фазовых переходов в спиртах (глицерин, пропандиол, этанол), которые используются в криобиологии как криопротекторы. 6-тиогуанин был также использован для изучения структурных переходов в водно-спиртовых растворах и растворах ДНК.

При исследовании водных растворов с различной концентрацией пропандиола найдено (рис. 16) существование структурных и фазовых переходов в этих растворах в интервале температур 150–273 К — расстеклование аморфной фазы растворов, вторичная кристаллизация, плавление кристаллической фазы. Эти исследования хорошо согласуются с калориметрическими исследованиями этих систем и неравновесными диаграммами жидкость–твердое состояние [92].

Проведенные исследования подтвердили наличие подвижности молекул в твердых стеклах спиртов в интервале температур 4,2 – 120 К. Обнаружено также наличие структурных изменений в водных растворах пропандиола в интервале 60 – 90 К. Анализ температурных зависимостей свечения 6-тиогуанина совместно с данными калориметрии позволяет предположить образование жидко-кристаллической фазы в водных растворах пропандиола при температурах ниже 170 К [82].

Исследования водных растворов ДНК со встроенным методом биосинтеза 6-тиогуанином в интервале температур 4,2–273 К (рис. 17) показали наличие структурных изменений в растворах ДНК в интервале 75–90 К. Определено также, что расстеклование гидратной оболочки ДНК происходит в интервале 180–200 К [82,85].

Выполненные нами исследования демонстрируют широкие возможности метода люминесцентного (фосфоресцентного) зонда для исследования структурных переходов в биофизических системах.

В результате исследования низкотемпературной люминесценции нуклеиновых кислот и их компонентов получены следующие результаты:

— построены схемы кислотно-основного и таутомерного равновесия серосодержащих компонентов нуклеиновых кислот, а также их диаграммы электронно-возбужденных состояний;

— показано наличие миграции энергии в нуклеиновых кислотах, в частности в тРНК, определены радиусы и скорости переноса возбуждения, установлены механизмы миграции;

— с помощью метода низкотемпературного люминесцентного зонда определены температурные интервалы структурных изменений в водных растворах ДНК и в растворах ДНК с криопротекторами в интервале температур 4,2–273 К.

Заключение

Как видно из приведенных данных, использование низкотемпературных методик в биофизических исследованиях может иметь целью решение задач различного уровня общности. В практическом плане оно позволяет расширить представление о структуре и свойствах биологически активных молекул в широком интервале температур, что способствует более точному определению интегральных термодинамических характеристик объектов, используемых в качестве эмпирических данных в дальнейших теоретических расчетах. С другой стороны, наблюдение тонкой структуры ИК, УФ люминесцентных и масс-спектров, выявляемой при низкой температуре, дает возможность разделить эффекты, связанные со взаимодействием биомолекул с окружением, вызванные самоассоциацией либо характерные для изолированного состояния. Вычленение подобных составляющих весьма важно для решения глобальных задач биофизики, направленных на выяснение сил эволюции живой природы, механизмов узнавания на макромолекуляром уровне и определение возможных причин их дисфункции.

Комплексный экспериментальный подход, предоставляющий информацию о структуре, динамике и энергетике межмолекулярного взаимодействия, получаемую взаимодополняющими спектральными методиками, дает богатый материал для таких близких научных дисциплин, как криобиология, медицина, фармакология, экология. В настоящее время основные пионерские результаты зачастую получают на стыке научных направлений при использовании нетривиальных методов в решении рутинных задач. Крупные научные центры, к числу которых относится ФТИНТ НАН Украины и, в частности, созданный академиком Б. И. Веркиным отдел молекулярной биофизики, являются тем удачным сочетанием приборной базы, методологических разработок и развитых теоретических подходов, которое обеспечивает интеграцию междисциплинарных данных, создание самостоятельных научных школ, получивших мировое признание.

Представленные в обзоре результаты являются хорошей иллюстрацией перспективности таких исследований.

1. *ФТИНТ медицине. Аннотированный библиографический указатель трудов сотрудников ФТИНТ АН УССР* (1965–1989 г.г.), ФТИНТ АН УССР, Харьков (1989).
2. Б. И. Веркин, И. К. Янсон, Л. Ф. Суходуб, А. Б. Теплицкий, *Взаимодействия биомолекул: Новые экспериментальные подходы и методы*, Наукова думка, Киев (1985).
3. Ю. П. Благой, В. Л. Галкин, Г. О. Гладченко, С. В. Корнилова, В. А. Сорокин, А. Г. Шкорбатов, *Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах*, Наукова думка, Киев (1991).
4. Б. И. Веркин, Ю. П. Благой, А. М. Косевич, Л. Ф. Суходуб, в кн. : *Физика конденсированного состояния*, Наукова думка, Киев (1985), с. 209.
5. Б. И. Веркин, В. А. Никитин, Б. Н. Муринец-Маркевич, К. В. Григорьева, *Криохирургия в стоматологии*, Наукова думка, Киев (1984).
6. Б. И. Веркин, Б. Н. Муринец-Маркевич, А. Р. Красников, А. П. Назаренко, М. Е. Носов, В. Я. Осинов, П. Б. Крупник, в кн. : *Криогенные системы: разработки и исследования*, Наукова думка, Киев (1984), с. 3.
7. E. D. Radchenko, A. M. Plokhotnichenko, G. G. Sheina, and Yu. P. Blagoi, *Studia Biophys.* **87**, 251 (1982).
8. Г. Г. Шеина, Е. Д. Радченко, А. М. Плохотниченко, Ю. П. Благой, *Биофизика*, 27, 983 (1982).
9. Е. Д. Радченко, А. М. Плохотниченко, Г. Г. Шеина, Ю. П. Благой, *Биофизика* **28**, 559 (1983).
10. Е. Д. Радченко, А. М. Плохотниченко, Г. Г. Шеина, Ю. П. Благой, *Биофизика* **28**, 923 (1983).
11. M. Szczesniak, M. J. Nowak, H. Roskowska, K. Szczepaniak, W. B. Person, and D. Shugar, *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 5969 (1983).
12. A. J. Barnes, M. A. Stuckey, and L. Le. Gall, *Spectrochimic. Acta* **40A**, 419 (1984).
13. M. Graindourze, J. Smets, Th. Zeegers-Huyskens, and G. Maes, *J. Mol. Struct.* **222**, 345 (1990).
14. P. Colarusso, K. Zhang, B. Guo, and P. F. Bernath, *Chem. Phys. Lett.* **269**, 39 (1997).
15. A. Yu. Ivanov, A. M. Plokhotnichenko, E. D. Radchenko, G. G. Sheina, and Yu. P. Blagoi, *J. Mol. Struct.* **372**, 91 (1995).
16. A. Yu. Ivanov, G. G. Sheina, and Yu. P. Blagoi, *Spectrochimic. Acta* **55**, 219 (1999).
17. Г. Г. Шеина, Е. Д. Радченко, Ю. П. Благой, Б. И. Веркин, *ДАН СССР* **240**, 463 (1978).
18. G. G. Sheina, E. D. Radchenko, S. A. Egupov, Yu. P. Blagoi, and V. M. Orlov, *Int. J. Quant. Chem.* **16**, 387 (1979).
19. J. D. Watson and F. H. C. Crick, *Nature* **171**, 964 (1953).
20. E. D. Radchenko, N. A. Smorygo, and Yu. P. Blagoi, *J. Mol. Struct.* **116**, 387 (1984).
21. Е. Д. Радченко, А. М. Плохотниченко, Г. Г. Шеина, Ю. П. Благой, *Биофизика* **29**, 553 (1984).
22. Г. Г. Шеина, Е. Д. Радченко, Ю. П. Благой, *ДАН СССР* **282**, 1497 (1985).
23. Г. Г. Шеина, Е. Д. Радченко, С. Г. Степанян, А. Ю. Иванов, Ю. П. Благой, *Биофизика* **31**, 555 (1986).
24. Е. Д. Радченко, А. М. Плохотниченко, А. Ю. Иванов, Г. Г. Шеина, Ю. П. Благой, *Биофизика* **31**, 373 (1986).
25. S. G. Stepanian, G. G. Sheina, E. D. Radchenko, and Yu. P. Blagoi, *J. Mol. Struct.* **124**, 333 (1985).
26. G. G. Sheina, S. G. Stepanian, E. D. Radchenko, and Yu. P. Blagoi, *J. Mol. Struct.* **158**, 275 (1987).
27. Г. Г. Шеина, Е. Д. Радченко, А. М. Плохотниченко, Ю. П. Благой, *Биофизика* **33**, 741 (1988).
28. С. Г. Степанян, Г. Г. Шеина, Е. Д. Радченко, Ю. П. Благой, *ЖФХ* **63**, 3008 (1989).
29. Yu. P. Blagoi, E. D. Radchenko, S. G. Stepanian, and G. G. Sheina, *J. Mol. Struct.* **219**, 311 (1990).
30. А. М. Плохотниченко, А. Ю. Иванов, Е. Д. Радченко, Г. Г. Шеина, Ю. П. Благой, *ФНТ* **19**, 1029 (1993).
31. W. MacCarthy, A. M. Plokhotnichenko, E. D. Radchenko, J. Smets, D. M. A. Smith, S. G. Stepanian, and L. Adamowicz, *J. Phys. Chem.* **101A**, 7208 (1997).
32. W. MacCarthy, J. Smets, L. Adamowicz, A. M. Plokhotnichenko, E. D. Radchenko, G. G. Sheina, and S. G. Stepanian, *Mol. Phys.* **91**, 513 (1997).
33. G. G. Sheina, A. Yu. Ivanov, S. A. Krasnokutsky, and Yu. P. Blagoi, *Int. Conf. on Hydrogen Bond, Kiev, 10–15 May, 1998, Book of abstracts*, p. 35.
34. Y. Grenie, J. C. Lassegues, and C. G. Lagrange, *J. Chem. Phys.* **53**, 2980, (1970).
35. R. D. Suenram and F. J. Lovas, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7180, (1980)
36. Г. Г. Шеина, Е. Д. Радченко, А. Ю. Иванов,С. Г. Степанян, *ЖФХ* **62**, 985 (1988).
37. И. Д. Рева, С. Г. Степанян, Е. Д. Радченко, *Химическая физика* **12**, 966 (1993).
38. I. D. Reva, S. G. Stepanian, A. M. Plokhotnichenko, E. D. Radchenko, G. G. Sheina, and Yu. P. Blagoi, *J. Mol. Struct.* **318**, 1 (1994).
39. I. D. Reva, A. M. Plokhotnichenko, S. G. Stepanian, A. Yu. Ivanov, E. D. Radchenko, G. G. Sheina, and Yu. P. Blagoi, *Chem. Phys. Lett.* **232**, 141 (1995).
40. A. Yu. Ivanov, A. M. Plokhotnichenko, V. Izvekov, G. G. Sheina, and Yu. P. Blagoi, *J. Mol. Struct.* **408**, 459 (1997).
41. S. G. Stepanian, I. D. Reva, E. D. Radchenko, M. T. S. Rosado, M.L.T.S. Duarte, R. Fausto, and L. Adamowicz, *J. Phys. Chem.* **102A**, 1041 (1998).
42. S. G. Stepanian, I. D. Reva, E. D. Radchenko, and L. Adamowicz, *J. Phys. Chem.* **102A**, 4623 (1998).
43. P. Klaeboe, *Conformational Studies by Vibrational Spectroscopy: a Review of Various Methods. Vibr. Spectr.* **9**, 3, (1995).
44. М. П. Лисица, А. М. Яремко, *Ферми резонанс*, Наукова Думка, Киев (1984).
45. S. A. Krasnokutski, A. Yu. Ivanov, V. Izvekov, G. G. Sheina, and Yu. P. Blagoi, *J. Mol. Struct.* **482–483**, 249 (1998).
46. G. Ziuzdak, *Mass Spectrometry for Biotechnology*, Academic Press, San Diego (1996).
47. *Mass Spectrometry in Biomedical Research*, S. J. Gaskell (ed.), J. Wiley and Sons, Chichester (1986).
48. *Mass Spectrometry: Clinical and Biological Applications*, D. M. Desidero (ed.), vol. **2**, Plenum, New York (1994).
49. T. Matsuo, *Biological Mass Spectrometry: Present and Future*, Wiley, Chichester and New York (1994).
50. J. Michl, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **53**, 255 (1983).
51. M. V. Kosevich, *Europ. Mass Spectrom.* **4**, 251 (1998).
52. О. А. Боряк, М. В. Косевич, В. С. Шелковский, *ПТЭ* № **6**, 176 (1993).
53. O. A. Boryak, M. V. Kosevich, V. S. Shelkovsky, and Yu. P. Blagoy, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 978 (1995).
54. О. А. Боряк, М. В. Косевич, В. С. Шелковский, Ю. П. Благой, *Биофизика* **41**, 1207 (1996).

55. O. A. Boryak, M. V. Kosevich, V. S. Shelkovsky, and Yu. P. Blagoy, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 197 (1996).
56. O. A. Boryak, I. O. Stepanov, M. V. Kosevich, V. S. Shelkovsky, V. V. Orlov, and Yu. P. Blagoy, *Europ. Mass Spectrom.* **2**, 329 (1996).
57. M. V. Kosevich, O. A. Boryak, I. O. Stepanov, and V. S. Shelkovsky, *Europ. Mass Spectrom.* **3**, 11 (1997).
58. M. V. Kosevich, O. A. Boryak, V. S. Shelkovsky, and P. J. Derrick, *Europ. Mass Spectrom.* **4**, 31 (1998).
59. M. V. Kosevich, *Europ. Mass Spectrom.* **3**, 320 (1997).
60. O. A. Boryak, M. V. Kosevich, and V. S. Shelkovsky, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **163**, 177 (1997).
61. M. V. Kosevich, G. Czira, O. A. Boryak, V. S. Shelkovsky, and K. Vekey, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1411 (1997).
62. M. V. Kosevich, G. Czira, O. A. Boryak, V. S. Shelkovsky, and K. Vekey, *J. Mass Spectrom.* **33**, 843 (1998).
63. M. B. Косевич, *Вісник Харківського університету* № 422. *Біофізичний вісник*, вип. **2**, 5 (1998).
64. A. Benninghoven, F. G. Rudenauer, and H. W. Werner, *Secondary Ion Mass Spectrometry: Basic Concepts, Instrumental Aspects, Applications and Trends*, J. Willey and Sons, New York (1987).
65. V. Cherepin, *Secondary Ion Mass Spectrometry of Solid Surfaces*, Utrecht, Science Press (1987).
66. В. А. Покровский, В. В. Мосин, *Теорет. и эксперим. химия* **23**, 62 (1987).
67. Т. Н. Юрченко, В. Ф. Козлова, Б. А. Скорняков, В. И. Строна, Н. В. Репин, *Влияние криопротекторов на биологические системы*, Наукова Думка, Киев (1989).
68. L. D. Detter, O. W. Hand, R. G. Cooks, and R. A. Walton, *Mass Spectrom. Rev.* **7**, 465 (1988).
69. Ф. Франкс, *Вода и водные растворы при температуре ниже* $0^{\circ}C$, Наукова Думка, Киев (1985).
70. А. М. Белоус, Е. А. Гордиенко, Л. Ф. Розанов, *Замораживание и криопротекция,* Высшая школа, Москва (1987).
71. О. А. Боряк, М. В. Косевич, В. С. Шелковський, В. В. Орлов, Ю. П. Благий, *Тези Доповід. II З'їзду Укр. Біофіз. Тов.* (29 чер.–3 лип. 1998), 37 (1998).
72. M. V. Kosevich, O. A. Boryak, and V. S. Shelkovsky, *Abstr. 14th Intern. Mass Spectrometry Conf., Tampere, Finland, 25–29 Aug. 1997*, (1997), p. 180.
73. O. A. Boryak, I. K. Galetich, M. V. Kosevich, V. S. Shelkovsky, and Yu. P. Blagoy, *Abstr. 14th Intern. Mass Spectrometry Conf., Tampere, Finland, 25–29 Aug. 1997*, (1997), p. 164.
74. *Физико-химические свойства нуклеиновых кислот.* Н. М. Эмануэль (ред.), Мир, Москва (1976).
75. Ю. В. Рубин, в кн. *Люминесцентный анализ в медико-биологических исследованиях*, Изд-во Рижского Мед. Ин-та, Рига (1983), с. 246.
76. Ю. В. Рубин, Ю. П. Благой, *Оптический криостат.* Авт. свидетельство № 134 3212 от 08.07.1987.
77. M. Stewart, J. Leszczynski, Yu. V. Rubin, and Yu. P. Blagoi, *J. Phys. Chem.* **101**, 4753 (1997).
78. Yu. V. Rubin and J. Leszczynski, *Nucleosides and Nucleotides* **18**, 78 (1999).
79. Yu. V. Rubin, Yu. V. Morozov, D. Venkateswarlu, and J. Leszczynski, *J. Phys. Chem.* **102**, 2194 (1998).
80. Ю. В. Рубин, Ф. А. Савин, в кн.: *Люминесцентный анализ в медико-биологических исследованиях*, Изд-во Рижского Мед. Ин-та, Рига (1990), с. 135.
81. Yu. V. Rubin, F. A. Savin, and Yu. P. Blagoi, *Studia Biophys.* **123**, 205 (1988).
82. Yu. V. Rubin, V. A. Bokovoy, and Yu. P. Blagoi, *J. Fluorescence* 5, 263 (1995).
83. Yu. V. Rubin and J. Leszczynski, in: *Jablonski Centennial Confrence on Luminescence and Photophysics.* Abs. book, Poland-Torun, (1998), p. 303.
84. Yu. V. Rubin, Yu. P. Blagoi, and E. A. Leibina, *Studia Biophys.*, **85**, 89 (1981).
85. Yu. V. Rubin, V. A. Bokovoy, and Yu. P. Blagoi, R. G. Lee, *Int. J. Quant. Chem., Quant. Biol. Symp.* **21**, 187 (1994).
86. Yu. V. Rubin, Yu. P. Blagoi, and E. A. Leibina, *Studia Biophys.* **71**, 2 133 (1978).
87. Ю. В. Рубин, С. А. Егупов, *Биофизика* **32**, 373 (1987).
88. Yu. P. Blagoi, I. A. Levitsky, and Yu. V. Rubin, *J. Mol. Struct.* **294**, 123 (1993).
89. Yu. P. Blagoi, I. A. Levitsky, Yu. V. Rubin, and V. V. Slavin, *Chem. Phys. Lett.* **203**, 263 (1993).
90. A. Favre, in: *Bioorganic Photochemistry : Biophotochemisry and the Nucleic Acids,* Vol **1**, H. Morrison (ed.), L-N-Y, J. Willey and Sons. (1990), p. 379 .
91. K. M. Meisenheimer and T. H. Koch, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **32**, 101 (1997).
92. А. В. Зинченко, В. В. Манк, В. А. Моисеев, Ф. Д. Овчаренко, А. И. Прохватилов, *ДАН СССР* **269**, 144 (1983).

Low-temperature experimental studies in molecular biophysics

Yu. P. Blagoi, G. G. Sheina, A. I. Ivanov, E. D. Radchenko, M. V. Kosevich, V. S. Shelkovsky, O. A. Boryak, and Yu. V. Rubin

In the jubilee year of B. I. Verkin we recall once again his tremendous contribution to the foundation of the scientific biophysical school in Kharkov. The development and realization of his ideas for the last twenty-years period at the Molecular Biophysics Department of the Institute for Low Temperature Physics and Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine is reviewed. The main results of the studies of physical and chemical properties of biopolymer fragments and biologically active compounds, obtained by the methods of low-temperature electron-vibrational spectroscopy, low-temperature secondary-emission mass-spectrometry and low-temperature luminescence spectroscopy are given.