

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА

УДК 541(64 + 515):547.458

Г. В. Абагян

Исследование механизма механической деструкции ДНК методом ЭПР

(Представлено чл.-кор. НАН РА А.А.Шагиняном 20/VIII 2008)

Ключевые слова: *ДНК, механическая деструкция, электронный парамагнитный резонанс*

1. Введение. Механические воздействия на органические соединения — резание, вальцевание, шприцевание и др. — сопровождаются разрывами химических связей и иницированием свободнорадикальных реакций. Так как упругая энергия может поглощаться только достаточно протяженной системой химических связей, то механические напряжения избирательно действуют на высокомолекулярные соединения ($M > 1000$); в низкомолекулярных соединениях образования свободных радикалов не наблюдается. Основные закономерности образования свободных радикалов под действием механических напряжений были выявлены при работе с синтетическими [1] и органическими [2-4] соединениями. Исследования механической деструкции органических макромолекул (полисахаридов, ДНК) имеют большое самостоятельное значение, связанное как с возможностями анализа повреждений макромолекул под действием механических напряжений в естественных условиях, так и с практическим применением механохимических процессов, начиная с методов выделения и приготовления проб природных полимеров и кончая промышленным использованием продуктов механической деструкции этих полимеров (полисахаридов и др.). В настоящее время механохимические технологии широко применяются в твердофазном органическом синтезе [5] и получении новых органических материалов [6]. Известно, что одним из прямых методов исследования природы свободных радикалов, возникающих при механических воздействиях на природные полимеры, является метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Поражение молекулы ДНК при действии механических напряжений мало исследовано. Предварительные данные, полученные при механическом измельчении ДНК, приведены в [2].

Целью данной работы было исследование механизма механической деструкции ДНК методом электронного парамагнитного резонанса.

2. Методика эксперимента. Концентрации свободных радикалов, возникающих при однократных механических воздействиях, сравнительно малы [3], что затрудняет качественное, а тем более количественное изучение их природы, свойств и реакционной способности. Для получения необходимых концентраций свободных радикалов был использован метод многократных механических воздействий. С этой целью диспергирование образцов осуществлялось в вибрационной лабораторной микромельнице со стеклянным рабочим сосудом и стеклянными шарами [4]. Данная методика обладает рядом преимуществ: позволяет работать в высоком вакууме или на воздухе, в широком интервале температур – от 77 до 500 К; после измельчения, без контакта образцов с атмосферой, можно измерять спектры ЭПР. Для предотвращения вторичных реакций образующихся свободных радикалов был использован метод деструкции изолированных макромолекул, заключающийся в диспергировании разбавленных замороженных (77 К) растворов ДНК.

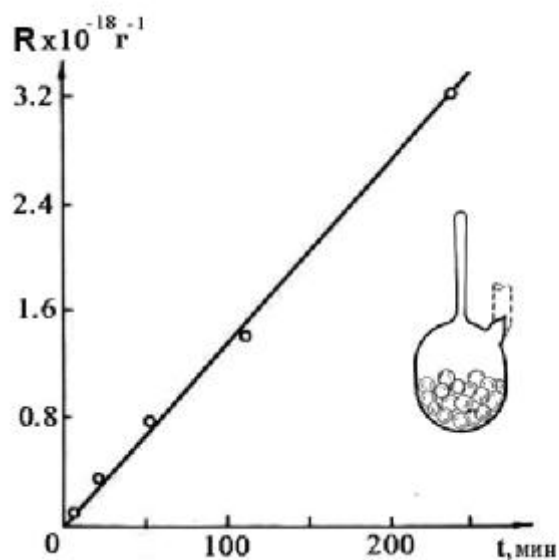


Рис. 1. Рост концентрации парамагнитных центров во время измельчения ДНК 1 при 80 К в атмосфере гелия. Описание реакционного сосуда см. в разделе *Методика эксперимента*.

Реакционный сосуд (рис. 1), в котором проводилось диспергирование, и шары были изготовлены из молибденового стекла. Узкая пробирка в верхней части рабочего сосуда предназначена для измерения спектров

ЭПР: для нее подбирались стекла, которые не обнаруживали сигнала ЭПР поглощения. Для обезгаживания образцов и удаления влаги рабочий сосуд с исследуемым веществом подсоединялся к вакуумной установке (вакуум порядка $1.3 \times 10^{-2} - 1.3 \times 10^{-3}$ Па). Для диспергирования рабочий сосуд с помощью пенопластовых держателей жестко закреплялся на стойках вибратора, совершающего вертикальные колебания. Для поддержания постоянной температуры при диспергировании рабочий сосуд погружали в сосуд Дьюара с термостатирующей жидкостью. Большинство опытов было выполнено при температуре жидкого азота (77 К). Сразу после диспергирования измельченное вещество пересыпали в узкую пробирку в верхней части реакционного сосуда и моментально переносили в сосуд Дьюара специальной формы с жидким азотом, помещенным в резонаторе спектрометра ЭПР. За время этой процедуры (несколько секунд) температура реакционного сосуда не успевала измениться. Таким образом все операции, начиная от измельчения вещества и кончая регистрацией спектров ЭПР, можно было выполнять в вакууме при температуре жидкого азота. Более подробно эта методика описана в [4].

Спектры ЭПР регистрировались на радиоспектрометре РЭ-1306 с частотой СВЧ колебаний 9.4 ГГц. Чувствительность 5×10^{10} спин/Гс. Эталонами ширины линии ЭПР служили поликристаллические образцы парамагнитных ионов Mn^{2+} в кубической решетке MgO. Спектр этого соединения состоит из 6 компонент сверхтонкой структуры (стс) с шириной отдельной компоненты 0.2 мТ и расстоянием между 3-й и 4-й линиями 8.74 мТ.

Данные, полученные нами ранее [7] при диспергировании препаратов ДНК с содержанием белка более 2%, показали, что в спектрах ЭПР преобладают линии, наблюдаемые при диспергировании препаратов чистых белков. Поэтому в данной работе использовали препараты ДНК, специально очищенные от белка. Из тимуса теленка согласно методикам, приведенным в [8,9], были выделены препараты ДНК 1 (содержание белка 1.6%) и ДНК 2 (содержание белка 0.1%), процентное содержание белка определяли согласно [10].

Были выполнены две серии измерений спектров ЭПР:

1) при диспергировании обезгаженных и тщательно высушенных препаратов ДНК. Образцы обезгаживали до остаточного равновесного давления водяных паров 0.13 Па;

2) при диспергировании замороженных водных растворов ДНК (деструкция изолированных макромолекул). Во всех опытах образцы диспергировались в вакууме при 77 К. Спектры ЭПР регистрировались при той же температуре. Концентрация ДНК в растворах составляла 0.5 мг/мл.

3. Результаты эксперимента. После механической обработки высушенных препаратов концентрация свободных радикалов в образцах достигала значений $10^{18} - 10^{19} \text{г}^{-1}$. При продолжительном диспергировании (до 7 ч и более) параметры спектров ЭПР оставались без изменений, а концентрация радикалов росла по линейному закону (см. рис. 1). Скорость образования свободных радикалов в ДНК была 10^{18} спин /час, выход механического разрыва связей 10^{-2} радикал/100 эВ (т.е. число радикалов на 100 эВ затраченной механической энергии). Спектр ЭПР в продуктах диспергирования сухого препарата ДНК 1 при 77 К – плохо разрешенный сигнал с $g = 2.003$ (рис. 2,а). В процессе размораживания и дальнейшего прогревания образца в вакууме вблизи 310 – 350 К сначала уменьшаются, а затем исчезают крайние компоненты, находящиеся друг от друга на расстоянии 6.0 мТ. В интервале 340 – 400 К форма спектра мало меняется и состоит в основном из двух сигналов: дублета с $\Delta = 1.6 \pm 0.1$ мТ и одиночной линии с $\Delta = 1 \pm 0.1$ мТ (рис. 2,б). При 420 К сохраняются только наиболее стабильные радикалы, соответствующие одиночной линии. Изменение концентрации радикалов при ступенчатом нагревании образцов на воздухе и в вакууме приведено на рис. 3.

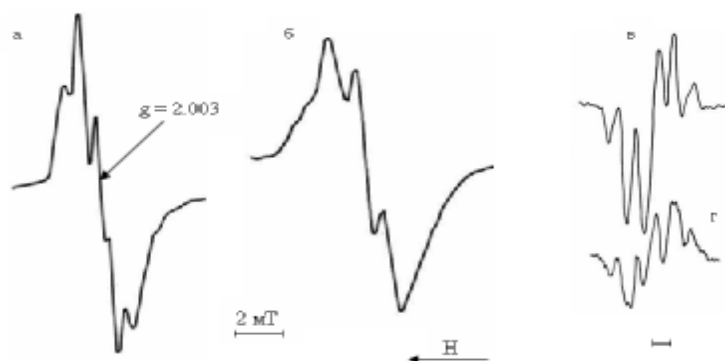


Рис. 2. Спектры ЭПР продуктов диспергирования ДНК: а – сухого препарата ДНК 1 при 77 К в вакууме; б – его превращение при повышении температуры до 353 К в вакууме; в – после диспергирования водного раствора ДНК 2 при 77 К в вакууме; г – после прогрева в вакууме до 195 К водного раствора ДНК 2, диспергированного при 77 К.

Спектры ЭПР в замороженных водных растворах ДНК (рис. 2, в,г) отличаются от спектров в высушенных образцах – они лучше разрешены и содержат линии сигнала из 5 компонент стс с расщеплением $\Delta = 1.8 \pm 0.1$ мТ. Выше температуры 220 К спектр ЭПР этих радикалов не наблюдается. При размораживании на воздухе радикалы в водных растворах ДНК при 170 К присоединяют молекулу кислорода и спектр превращается в анизотропный

сигнал перекисных радикалов, параметры спектра которого характерны для радикала $\text{COO}\cdot$ [11]. Это указывает на то, что в исходном радикале вероятнее всего свободная валентность локализована на атоме углерода звена дезоксирибозы.

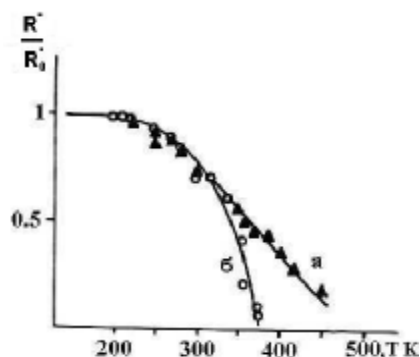


Рис. 3. Относительная устойчивость свободных радикалов в препарате ДНК 1 при нагревании в вакууме (а) и на воздухе (б).

4. Обсуждение результатов. В фрагменте цепи ДНК образование алкилзамещенных радикалов с локализацией свободной валентности на атоме углерода звена дезоксирибозы возможно при разрыве сахарно-фосфатных связей при атомах углерода С(3) или С(5) дезоксирибозы. Проведение детального анализа конформаций с использованием данных, полученных методами рентгеноструктурного анализа, как это выполнено для глюкопиранозного кольца [12], не представляется возможным, так как в радикале с локализацией неспаренного электрона на С(5), ввиду относительной свободы вращения группы С(5)Н₂ вокруг С(4) – С(5) связи, угол поворота по этой связи установить нельзя и, соответственно, трудно продемонстрировать расщепление на β-протоне. В случае локализации неспаренного электрона на С(3) точная оценка вклада β-протонов у С(2) также невозможна, так как значения конфигурационных углов β-протонов у С(2) методами кристаллографии не определяются. Спектр ЭПР из 5 компонент стс с общей шириной около 8 мТ может соответствовать как радикалам, где неспаренный электрон локализован на атоме С(5), так и на атоме С(3). В первом случае константа стс у β-протона должна быть примерно вдвое больше константы стс у α-протона, равной $a_H[\alpha] \approx 2.0$ мТ. Во втором случае константа стс для β-протона при атоме углерода С(4) должна быть близка к $a_H[\alpha] \approx 2.0$ мТ, а из двух β-протонов дезоксигруппы вклад в стс одного должен быть минимальным и составлять несколько десятых мТ, а другого – максимальным и близким к 3.5 мТ. И в том, и в другом случае структура спектра будет одинакова и близка к квинтиплету, с соотношением интенсивностей 1:2:2:2:1 и расстоянием между линиями около 2.0 мТ.

Механическая деструкция ДНК в принципе может осуществляться по различным механизмам. В [13] была высказана гипотеза о том, что механический разрыв различных по природе химических связей (ионные, ковалентные) будет осуществляться преимущественно по гомолитическому механизму, с образованием свободных радикалов. Возникновение ионных (ионрадикальных) состояний на граничных (концевых) атомах энергетически менее выгодно, так как на разделение зарядов необходимо затратить дополнительную энергию, равную $I - A$, где I – потенциал ионизации, A – сродство к электрону граничных атомов.

Для объяснения механоэмиссионных явлений – выброса электронов, люминесценции и др., которые развиваются одновременно с механической деструкцией, в [14] был предложен автоионизационный механизм разрыва связей, приводящий к образованию ионрадикалов под действием механических напряжений. Согласно [15,16] при механическом деформировании химических связей снижается их потенциал ионизации и создаются благоприятные условия для перехода электрона в структурную ловушку или к молекулам-примесям, обладающим электроноакцепторными свойствами.

Баланс энергии при автоионизационном механизме определяется соотношением

$$\Delta E \geq I - A - E_P - E_Q. \quad (1)$$

Здесь I – потенциал ионизации деформированной связи, A – сродство к электрону акцептора, E_P – энергия поляризации, E_Q – кулоновская энергия взаимодействия разделенных зарядов. В том случае, когда ΔE больше суммы в правой части уравнения, становится возможным перенос электрона с деформированной связи на акцептор; тогда в акте деструкции будет распадаться образовавшийся катион радикал $\sim C^{\bullet} \sim$.

В ДНК роль примеси-акцептора электронов могут играть боковые группы, такие как тимин, которые, как было установлено в [17], захватывают и стабилизируют электрон, возникающий при облучении водных растворов ДНК. Тем самым в ДНК существуют благоприятные условия для осуществления автоионизационного механизма. Данных о снижении потенциалов ионизации различных типов связей в основной цепи ДНК, а также о величине других параметров, входящих в соотношение (1), в литературе нет, поэтому невозможно заранее предсказать, какой механизм деструкции будет осуществляться.

Как следует из результатов выполненного исследования процесса механической деструкции ДНК в водных растворах, при автоионизационном механизме деструкции следовало ожидать возникновения анион-радикалов, образующихся при захвате электрона основанием, и их дальнейшего прев-

ращения в радикалы присоединения со спектром ЭПР шириной более 10 мТ. Следов крайних линий этих радикалов в спектре ЭПР продуктов механической деструкции изолированных молекул в водном растворе не обнаружено, и поэтому можно утверждать, что в ДНК реализуется не автоионизационный, а гомолитический механизм деструкции. Вклад автоионизационного механизма если и есть, то не превышает нескольких процентов.

Таким образом, следует полагать, что при воздействии на ДНК механических напряжений имеет место гомолитический механизм деструкции, в результате которого поражаются фосфодиэфирные связи основной цепи ДНК с локализацией свободной валентности у С(3) или С(5) атомов углерода звена дезоксирибозы.

Институт физических исследований НАН РА

Г. В. Абагян

Исследование механизма механической деструкции ДНК методом ЭПР

Методом электронного парамагнитного резонанса исследован механизм деструкции ДНК при механических воздействиях. Показано, что деструкция ДНК осуществляется по гомолитическому механизму. Под действием механических напряжений поражаются С(3) или С(5) фосфодиэфирные связи основной цепи ДНК.

Ն. Ո. ԱԲԱԴՅԱՆ

ԴՆԹ-ի մեխանիկական դեսպրուկցիայի մեխանիզմի հետազոտումը ԷՊՐ մեթոդով

ԷՊՐ մեթոդով հետազոտված է ԴՆԹ-ի դեսպրուկցիայի մեխանիզմը մեխանիկական ազդեցությունների ժամանակ: Ցույց է փրված, որ ԴՆԹ-ի դեսպրուկցիան փրեղի է ունենում հոմոլիտիկ մեխանիզմով: Մեխանիկական լարումների ազդեցության ներքո վնասվում են ԴՆԹ-ի հիմնական շղթայի С(3) կամ С(5) ֆոսֆոդիէթերային կապերը:

G. V. Abaghyan

Investigation of Mechanism of DNA Mechanical Destruction by ESR Method

The mechanism of mechanical destruction of DNA has been investigated by the ESR method. It is shown that the destruction of DNA takes place according to the homolitic

mechanism. Under the influence of mechanical action, the C(3) or C(5) phosphodietheric bonds of DNA main chain are damaged.

Литература

1. *Бутягин П.Ю., Берлин А.А., Калмансон А.Э, Блюменфельд Л.А.* - ВМС. 1959. Т. 1. N 6. С. 865-868.
2. *Абагян Г.В., Бутягин П.Ю.* - Биофизика. 1965. Т. 10. N 5. С. 763-765.
3. *Бреслер С.Е., Казбеков Э.Н., Саминский Е.М.* - ВМС. 1959. Т. 1. N1. С. 132-137.
4. *Абагян Г.В.* Свободнорадикальные процессы при различных физических воздействиях на твердые углеводы и ДНК. Автореф. докт. дис. М. Ин-т хим.физики, АН СССР. 1985. 345 с.
5. *Huang J., Moore J.A., Acquaye J.H., Kaner R.V.* - Macromolecules. 2005. V. 38. P. 317-321.
6. *Dushkin A.V.* - Chemistry for Sustainable Development. 2004. V. 12. N3. P. 251-274.
7. *Абагян Г.В., Бутягин П.Ю.* - В сб.: Свободнорадикальные процессы в биологических системах. Труды МОИП. М. Наука. 1966. С. 126-133.
8. *Zubay G., Doty P.* - J. Molec. Biology. 1959. V. 1. N1. P. 1-20.
9. *Schwander H., Singer R.* - Helv. Chim. Acta. 1950. V. 33. N6. P. 1521-1526.
10. *Lowry O.H., Roserbrough N. J., Farr A. L., Randal R.J.* - J. Biol. Chem. 1951. V. 193. N1. P. 265-277.
11. *Цветков Ю.Д., Молин Ю.Н., Воеводский В.В.* - ВМС.1959. Т. 1. N12. С. 1805-1811.
12. *Абагян Г.В., Абагян А.Г., Апресян А.С.* - Изв. НАН Армении. Физика. 1998. Т. 33. N1. С.41-48.
13. *Бутягин П.Ю.* - Успехи химии. 1971. Т. 40. N11. С. 1935-1960.
14. *Закревский В.А., Пахотин В.А.* - Механика композитных материалов. 1981. Т. 1. С. 139-142.
15. *Закревский В.А., Пахотин В.А., Вайткевич С.К.* - Физика тв. тела. 1979. Т. 21. N3. С. 723-729.
16. *Губанов А.И.* В сб.: Механика полимеров. 1978. Т. 5. С. 771-775.
17. *Абагян Г.В., Бутягин П.Ю.* - Биофизика. 1969. Т. 14. N5. С. 785-791.